

تأثیر سطوح مختلف کودهای زیستی و شیمیایی نیتروژن بر عملکرد کورم و میزان کلشی سین در گیاه دارویی *Colchicum kotschy Bioss* تحت شرایط رویشگاه

مرتضی علیرضایی نغندر^{۱*}، حسین آروئی^۲، شمسعلی رضازاده^۳، محمود شور^۲

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳- استادیار پژوهش، گروه فارماکوتکوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تلفن: ۸۷۹۵۶۱۸ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۷۸۷۴۳۰ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: mortezaalirezaie@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۲

چکیده

مقدمه: کشت و کار و اهلی سازی گیاهان دارویی در رویشگاه طبیعی به حفظ تنوع ژنتیکی و برداشت پایدار کمک می کند. تحت چنین شرایطی نوع اقلیم و خاک گیاهان کشت شده همچون شرایط عرصه است در حالی که کود و نور آفتاب نسبت به عرصه بهتر است. از آنجایی که آکالوئیدها ترکیبات نیتروژنی هستند، انتظار می رود که افزایش دسترسی نیتروژن با کاربرد کود بتواند نقش مهمی در بیوستز و تجمع آکالوئیدها در گیاهان دارویی داشته باشد.

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی نیتروژن بر عملکرد کورم و کلشی سین در گیاه دارویی *C. kotschy* تحت شرایط رویشگاه بود.

روش بررسی: آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار و هشت تیمار شامل سه سطح کود شیمیایی نیتروژن از منبع اوره (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره)، سه سطح کود زیستی نیتروکسین (۲۰، ۴۰ و ۶۰ لیتر در هکتار)، تیمار تلفیقی (۱۰۰ کیلوگرم اوره + ۴۰ لیتر نیتروکسین در هکتار) و تیمار شاهد (بدون کوددهی) طی سال زراعی ۸۹ - ۸۸ در زمینی واقع در رویشگاه طبیعی *Colchicum kotschy* انجام شد. صفاتی همچون وزن تر و خشک، درصد وزن خشک، طول و قطر کورم در بوته و عملکرد تر و خشک کورم در واحد آزمایشی، وزن تر و خشک بذر در بوته و میزان کلشی سین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که در کاربرد ۴۰ لیتر در هکتار نیتروکسین بیشترین عملکرد خشک کورم در واحد آزمایشی با میزان ۱۰۱/۴ گرم حاصل شد و کمترین میزان در تیمار شاهد (۴۲/۳۹ گرم) به دست آمد. عملکرد کلشی سین در واحد آزمایشی در تیمارهای ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار اوره و ۴۰ لیتر نیتروکسین به ترتیب با میزان ۴۰/۴۴ و ۳۷/۵۸ گرم، بیشتر از تیمارهای دیگر بود و کمترین میزان آن در تیمار شاهد (۱۵/۵۶ گرم) به دست آمد. بیشترین و کمترین وزن خشک بذر در بوته در تیمارهای شاهد و ۱۵۰ کیلوگرم اوره به ترتیب با میزان ۲/۲۰۳ و ۰/۶۵۳ گرم به دست آمد.

نتیجه گیری: به طور کلی سطوح متوسط کودهای شیمیایی و زیستی (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۴۰ لیتر نیتروکسین در هکتار) بهترین نتایج را بر عملکرد وزن خشک کورم و عملکرد کلشی سین نسبت به تیمارهای دیگر داشتند.

گل واژگان: اهلی سازی، آکالوئید، کود زیستی، *C. kotschy*



مقدمه

جنس *Colchicum* متعلق به خانواده Colchicaceae بوده و رشد ۱۰۰ گونه از این جنس در دنیا گزارش شده است [۱]. گونه‌های مختلف جنس کلشیکوم به داشتن آلکالوئیدهای کلشیسینوئیدی (Colchicinoid alkaloids) مخصوصاً کلشی‌سین شناخته شده‌اند. کلشی‌سین در تمام قسمت‌های گیاه همچون کورم، بذر، برگ و گل وجود دارد اما بذرها و کورم‌ها حاوی مقادیر بیشتری از کلشی‌سین می‌باشند. *Colchicum kotschy Bioss* یکی از ۱۶ گونه‌ی جنس کلشیکوم بومی ایران است [۲] که دارای مقادیر قابل توجهی کلشی‌سین می‌باشد [۳]. *C. kotschy* گونه‌ای پاییز گل است و گلدهی‌اش در رویشگاه (ناحیه‌ی نغندر در شمال شرقی ایران، ارتفاع ۱۴۰۰ متری از سطح دریا، عرض جغرافیایی ۲۲° و ۳۶' و طول جغرافیایی ۵۹° ۱۷') از اواخر شهریور شروع شده و تا اواخر مهر ادامه دارد [۴]. دارای سه تا چهار برگ پهن می‌باشد که به صورت هیستراتنوس (*Hysteranthous*) پس از گلدهی و در اواسط بهمن ظاهر می‌شوند و و کپسول‌های حاوی بذر نیز در اوایل فروردین بر روی بوته ظاهر می‌شوند. پراکنش این گونه از نواحی مختلفی در ایران و عراق گزارش شده است. در شیب‌های کوهستانی، اغلب در شیب‌های شمالی یا شرقی، بر روی زمین‌های صخره‌ای یا سنگی و عموماً در شرایط خشک و ارتفاعات ۱۴۰۰ تا ۳۰۰۰ متری رشد می‌کند [۲].

هر ساله ده‌ها تن از کورم‌های گونه‌های مختلف جنس *Colchicum* از جمله *C. jesdianum* توسط افراد محلی از عرصه برداشت شده و از طرق مختلف از کشور خارج می‌شود و به قیمت نازلی به فروش می‌رسد [۵]. برداشت بیرویه گونه‌های گیاهی از عرصه به ویژه در کشورهای در حال توسعه باعث کاهش تنوع ژنتیکی و نابودی سکونتگاه گیاهان می‌شود و این گونه‌ها را در معرض خطر نابودی و انقراض قرار داده است. با درک این مسأله که تعداد زیادی از گونه‌های دارویی و معطر در معرض برداشت بیش از حد می‌باشند راهکارهای



مختلفی برای حفظ گونه‌های گیاهی در معرض خطر مطرح شده است. عده‌ای توصیه می‌کنند که گونه‌های وحشی به سیستم‌های کشت و کار انتقال یابند [۶،۷]. دیگران اعتقاد دارند که برداشت قابل تحمل اصلی‌ترین استراتژی حفاظتی برای اغلب گونه‌های وحشی باشد تا ضمن حمایت از اقتصاد افراد بومی بتواند در طولانی مدت منافع بیشتری را نصیب برداشت‌کنندگان گرداند [۸].

کشت و کار بومی (*Domestic cultivation*) روشی از اهلی‌سازی توده‌های وحشی گیاهان دارویی است که در چین رواج دارد. در این روش کیفیت محصولات می‌تواند به نحو مطلوبی برقرار باشد مشروط بر آنکه شرایط رشدی مناسب همچون اقلیم، خاک و بذرها قابل اعتماد تأمین باشند [۹]. عموماً در کشت بومی گیاهان دارویی دو حالت وجود دارد: یکی اهلی‌سازی در رویشگاه طبیعی (*In situ domestication*) و دیگری اهلی‌سازی خارج از رویشگاه طبیعی (*Ex situ domestication*). اهلی‌سازی خارج از رویشگاه طبیعی حالتی است که بذرها و وحشی برداشت شده به ناحیه‌ی دیگری با نوع خاک و اقلیم متفاوت آورده و کشت شوند. در این حالت کیفیت محصولات می‌تواند تحت اعمال کشاورزی مطلوب تأمین شود [۱۰،۱۱،۱۲]. این روش از اهلی‌سازی گیاهان دارویی باعث حفظ جمعیت وحشی این گیاهان از طریق کاهش برداشت از عرصه می‌شود ولی می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی شود [۱۳]. اهلی‌سازی از این طریق همیشه از لحاظ تکنیکی امکان‌پذیر نیست، چرا که بسیاری از گونه‌ها به دلیل داشتن نیازهای اکولوژیکی و بیولوژیکی خاص به سختی با شرایط کشت و کار سازگار می‌شوند [۱۴].

اهلی‌سازی در رویشگاه طبیعی به این معنی است که بذرها و وحشی از کوه و عرصه جمع‌آوری شده و در زمین محلی کشت شوند. تحت چنین وضعیتی نوع اقلیم و خاک گیاهان کشت شده همچون عرصه است با این تفاوت که کود و نور آفتاب بهتر از عرصه می‌باشد. گزارش‌های زیادی وجود

دارد مبنی بر آنکه در چنین شرایطی کیفیت محصولات کشت شده بهتر یا مشابه با محصولی است که به طور وحشی از عرصه برداشت می‌شود [۱۰، ۱۵، ۱۶]. روش حفاظت در محل طبیعی این مزیت را دارد که به ادامه‌ی تکامل و تنوع گونه‌های در معرض خطر یا گونه‌هایی با دامنه‌ی انتشار محدود در سکونتگاه طبیعی شان کمک می‌کند [۹]. بنابراین در این روش علاوه بر حفظ تنوع ژنتیکی می‌توان با کاربرد کود و دیگر نهاده‌ها به عملکرد مناسبی از لحاظ کمی و کیفی دست یافت. همان‌طور که ذکر شد کشتی سین که ماده مؤثره اصلی جنس گل حسرت است، از دسته‌ی آلکالوئیدها می‌باشد. از آنجایی که آلکالوئیدها ترکیباتی نیتروژنی هستند انتظار می‌رود تا دسترسی نیتروژن نقش مهمی در بیوسنتز و تجمع آلکالوئیدها در گیاهان داشته باشد. تأثیر نیتروژن به عنوان عامل افزایش دهنده‌ی کشتی سین در کلشیکوم گزارش شده است [۱۷، ۱۸]. همچنین نیتروژن باعث افزایش آلکالوئید در برخی از گیاهان دارویی و غیردارویی مثل تنباکو، جو، داتوره، شاهبیزک و خشخاش شده است [۱۹].

در دهه‌های اخیر تولید محصولات کشاورزی عمدتاً متکی به مصرف نهاده‌های شیمیایی بوده که منجر به مشکلات عمده زیست محیطی شده است. یکی از راهکارهای رفع این مشکل استفاده از اصول کشاورزی پایدار می‌باشد [۲۰]. کشاورزی پایدار یک نظام تلفیقی مبتنی بر اصول اکولوژیک است که به جای استفاده از نهاده‌های خارجی نظیر کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها از بقایای گیاهی، کودهای دامی، کودهای آلی و زیستی و کنترل زیستی آفات استفاده می‌شود تا ضمن ذخیره مواد غذایی در خاک، علف‌های هرز و آفات کنترل شده [۲۱، ۲۲] و همچنین تنوع زیستی افزایش یابد [۲۳]. از آنجا که مدیریت خاک از عوامل اصلی در نیل به اهداف کشاورزی پایدار محسوب می‌شود لذا جایگزینی تدریجی کودهای زیستی با کودهای شیمیایی خصوصاً کودهای نیتروژن و فسفات، بشر را در دستیابی به این هدف و تولید پایدار محصولات کشاورزی یاری می‌نماید. کودهای زیستی شامل انواع مختلف میکروارگانیسم‌هایی هستند [۲۴] که طی فرایندهای بیولوژیکی

توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از حالت غیرقابل دسترس به شکل قابل دسترس دارند [۲۵، ۲۶] و منجر به توسعه بهتر سیستم ریشه‌ای می‌گردند [۲۴]. کود زیستی نیتروکسین از جمله کودهای زیستی است که حاوی باکتری‌های محرک رشد و تثبیت کننده نیتروژن از جنس ازتوباکتر (*Azotobacter*) و آزوسپریلیوم (*Azospirillum*) می‌باشد. ازتوباکتر و آزوسپریلیوم در محیط ریشه گیاه توانایی ساخت و ترشح مقداری مواد بیولوژیکی فعال مانند اسید نیکوتینیک، اسید پنتوتیک، بیوتین، ویتامین‌های B، اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و غیره را دارند که در افزایش رشد ریشه نقش مفید و مؤثری دارند [۲۷]. آزوسپریلیوم علاوه بر قابلیت تثبیت نیتروژن، با تولید مواد محرک رشد، سبب بهبود رشد ریشه و متعاقب آن افزایش سرعت جذب آب و عناصر غذایی شده و از این طریق در افزایش عملکرد تأثیرگذار می‌باشد [۲۸]. تأثیر کودهای زیستی روی گیاهان دارویی از جمله شوید [۲۹]، سیاهدانه [۳۰]، رازیانه [۲۹]، ریحان [۳۱] و آرتمیسیا [۳۲] مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین نقش مفید کودهای زیستی در بهبود ویژگی‌های رشد، عملکرد اندام‌های هوایی و خصوصیات کیفی گیاه دارویی زوفا گزارش شده است [۳۳]. در گیاه دارویی پروانش (*Caharanthus roseus*) تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری سودوموناس فلورسسنس (*Pseudomonas fluorescens*) باعث افزایش میزان بیوماس تولیدی و میزان آلکالوئید گیاه در شرایط تنش آبی شود [۳۴]. همچنین کاربرد تلفیقی قارچ میکوریزا با باکتری‌های آزوسپریلیوم و باسیلوس باعث افزایش میزان بیوماس تولیدی در گونه‌ای گیاه دارویی علف لیمو شد [۳۵].

کشت و کار و اهلی سازی گیاهان دارویی به علت برداشت بیرویه آنها از طبیعت امری ضروری می‌نماید، بدین‌منظور مطالعه‌ی نیازهای اکولوژیکی و خاکی گیاه در اولویت قرار دارد. بنابراین انجام تحقیقات در زمینه استفاده از روش‌های جایگزین مصرف کودهای شیمیایی مخصوصاً اثر کاربرد کودهای زیستی بر رشد و عملکرد گیاهان دارویی ضروری به نظر می‌رسد، از طرفی شرایط محیطی بایستی به نحوی باشد



در عمق ۱۵ سانتی متری سطح خاک در داخل هر کرت (۱۰) کورم در هر کرت) و به فواصل ۳۰ سانتی متر از یکدیگر قرار گرفتند. کوددهی در سه مرحله انجام شد به این ترتیب که مقادیر کودی در هر کدام از تیمارها به سه قسمت تقسیم شدند و اولین تیمار کودی ۳۰ روز پس از انتقال کورم‌ها به خاک (زمانی نزدیک به آغاز فعالیت ریشه در اواسط آبان) صورت گرفت. مرحله دوم کوددهی در اواخر بهمن ماه (زمان ظهور جوانه‌های رویشی در سطح خاک) و مرحله سوم در اوایل بهار (زمانی که برگ‌ها کاملاً پدیدار گشته بودند) انجام شد. در پایان رشد رویشی (اواخر اردیبهشت) کپسول‌های حاوی بذر از روی بوته‌ها جمع‌آوری شدند. همچنین کورم‌ها در زمانی که برگ‌ها کاملاً زرد شده بودند (اواسط خرداد) برداشت شدند. صفات مورد بررسی شامل وزن تر، خشک، درصد وزن خشک، طول و عرض کورم، عملکرد تر و خشک کورم در هر واحد آزمایشی، وزن تر و خشک بذر در هر بوته، میزان کلشی سین در یک گرم ماده خشک کورم، میزان کلشی سین کل کورم و عملکرد کلشی سین در واحد آزمایشی بودند.

برداشت کورم‌ها و اندازه‌گیری صفات مربوط به عملکرد کورم

قطر و طول کورم‌ها پس از برداشت و شستشو با استفاده از کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی متر اندازه‌گیری شد. وزن تر و خشک کورم در بوته نیز با ترازوی دیجیتالی ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. درصد وزن خشک کورم از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{وزن تر کورم} \times \frac{\text{وزن تر کورم}}{\text{وزن خشک کورم}} = \text{درصد وزن خشک کورم}$$

تا مسیر تنوع زیستی گونه‌های وحشی در جهت تحقق اهداف کشاورزی پایدار هموار باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر کودهای شیمیایی و زیستی نیتروژن بر عملکرد کورم و میزان کلشی سین در گیاه دارویی تحت شرایط رویشگاه طبیعی بود.

مواد و روش‌ها

به منظور جمع‌آوری کورم‌های *C. kotschy* در اواسط تیرماه سال ۱۳۸۸ در زمانی که گیاهان هنوز در فاز استراحت بسر می‌بردند از ناحیه‌ی رویشگاهی شان (ناحیه‌ی نغندر در شمال شرقی ایران و حوالی شهر مشهد، عرض جغرافیایی $36^{\circ} 22'$ و طول جغرافیایی $59^{\circ} 17'$ در ارتفاع ۱۴۰۰ متری از سطح دریا) به تعداد مورد نیاز جمع‌آوری شدند. زمینی صاف در نزدیکی محلی که گیاهان به طور طبیعی رشد می‌کردند انتخاب شد و کرت‌هایی به ابعاد $1/5 \times 1/5$ متر (با فواصل $1/5$ متر بین کرت‌ها و ۲ متر بین بلوک‌ها) آماده شدند. آنالیز خاک صورت گرفت تا تیمارهای کودی بر اساس نتایج آنالیز خاک صورت گیرد (جدول شماره ۱). کود شیمیایی اوره و کود زیستی نیتروکسین (حاوی 10^8 سلول زنده از هر یک از جنس‌های باکتری آزوسپیریلیوم و ازتوباکتر در هر میلی‌لیتر نیتروکسین) در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل سه سطح کود شیمیایی اوره (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار)، سه سطح کود زیستی نیتروکسین (۲۰، ۴۰ و ۶۰ لیتر در هکتار)، تیمار تلفیقی (۱۰۰ کیلوگرم اوره + ۴۰ لیتر نیتروکسین در هکتار) و تیمار شاهد (بدون کوددهی) با سه تکرار انجام شد. کشت کورم‌ها در اواخر تیر ماه انجام شد. کورم‌های تقریباً یکنواخت از لحاظ اندازه و وزن (با وزن تقریبی ۱۸ گرم) انتخاب شدند و

جدول شماره ۱ - برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر

بافت خاک	پتاسیم (ppm)	فسفر (ppm)	نیتروژن قابل دسترس (ppm)	ماده آلی درصد	EC (دسی زیمنس بر متر)	اسیدیته (pH)
شنی رسی	۲۳۷	۳۳/۷	۱۱/۱	۰/۶۳	۲/۰۲	۷/۵۸



(۲۳:۷۷) بود. سرعت جریان حلال (Flow rate) برابر با ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم هر بار تزریق برابر ۵۰ میکرولیتر بود. ستون (۳/۹×۳۰۰) Bondapck C18 و آشکارساز ماوراء بنفش با طول موج ۲۴۳ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت.

رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد آلکالوئید کلشی سین

برای تهیه‌ی غلظت‌های استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون، ابتدا ۱۰ میلی‌گرم از استاندارد کلشی سین وزن کرده، سپس با متانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از روی این محلول غلظت‌های استاندارد ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و منحنی کالیبراسیون استاندارد برای کلشی سین رسم شد (شکل شماره ۱). مقدار کلشی سین کورم از حاصلضرب میزان کلشی سین در هر گرم نمونه خشک × وزن خشک کورم در هر تیمار به دست آمد. عملکرد کلشی سین نیز از حاصلضرب عملکرد خشک کورم × میزان کلشی سین در هر گرم نمونه خشک محاسبه شد.

تجزیه آماری

آنالیز تجزیه‌ی واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای آزمایشی ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و ترسیم نمودارها و جداول با نرم‌افزار Excel انجام شد.

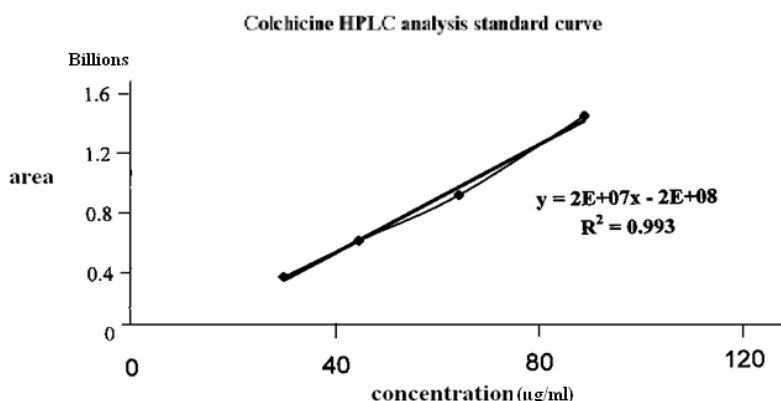
اعداد به دست آمده از این رابطه پیش از عمل تجزیه واریانس با استفاده از رابطه $\text{Arc sin } \sqrt{x}$ ، به توزیع نرمال تبدیل شدند ولی در جدول‌ها، درصد‌های تبدیل نشده گزارش شده‌اند. عملکرد تر و خشک کورم در واحد آزمایشی (کرت) نیز به ترتیب از حاصلضرب تعداد بوته‌ها در هر تکرار یا کرت (۱۰ بوته) × میانگین وزن تر و خشک کورم در بوته محاسبه شد.

عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی بلافاصله پس از برداشت، تمیز و خرد شده سپس در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند. عصاره‌گیری از نمونه‌ها و تعیین میزان کلشی سین در عصاره‌ها، در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کرج انجام شد. عصاره‌گیری مطابق با روش توضیح داده شده الالی و همکاران [۳۶] انجام شد.

مراحل کار HPLC

به منظور تعیین میزان کلشی سین در عصاره‌ی آلکالوئیدی، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) استفاده شد. دستگاه HPLC مدل Knauer، دستگاه گاززدا Degasser knauer، پمپ HPLC pump K-1001، دستگاه تزریقی اتوماتیک Auto smaller knauer و دستگاه چمبر Dynamic mixing chamber، فاز متحرک به کار برده شده شامل بافر فسفات و استونیتریل با نسبت



شکل شماره ۱ - منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر سطح زیر منحنی کلشی سین



نتایج

بر اساس نتایج تجزیه‌ی واریانس تأثیر سطوح مختلف کودی بر تمام صفات اندازه‌گیری شده به جز صفت طول کورم در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول شماره ۲).

وزن تر، خشک و درصد وزن خشک کورم

در تمام تیمارهای کودی وزن تر و خشک کورم نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (جدول شماره ۳) با اینحال بیشترین درصد وزن خشک کورم در تیمار شاهد به دست آمد (جدول

شماره ۳). بیشترین وزن تر کورم در تیمارهای ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن و ۴۰ لیتر نیتروکسین به ترتیب به میزان ۳۷/۵۹ و ۳۸/۴۷ گرم به دست آمد و کمترین وزن تر کورم در تیمار شاهد با میزان ۱۶/۰۲ گرم مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار وزن خشک کورم به ترتیب در تیمار ۴۰ لیتر نیتروکسین و شاهد با میزان ۱۰/۱۳ و ۴/۲۳ گرم مشاهده شد (جدول شماره ۳). بیشترین و کمترین درصد وزن خشک کورم به ترتیب در تیمار شاهد و ۱۰۰ کیلوگرم به ترتیب با میزان ۲۶/۴۴ و ۲۰/۷۲ درصد به دست آمد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲ - جدول تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف کودهای شیمیایی و زیستی بر صفات مورد بررسی در *C. kotschy*

صفات						
F.C.Y	C.D	C.L	% D.M	D.W	F.W ^۱	منبع تغیر / درجه آزادی
۱۴۸۷/۴۶ ^{ns}	۰/۷۷۶ ^{**}	۰/۳۶۵ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۹۱ ^{ns}	۱۴/۹۲ [*]	تکرار ۲
۱۶۷۲۳/۰۶ ^{**}	۰/۷۰۲ ^{**}	۰/۰۶ ^{ns}	۱۱/۵۸ ^{**}	۱۰/۴۷ ^{**}	۱۶۷/۳ ^{**}	تیمار ۷
۳۹۷/۷۵	۰/۰۶۳	۰/۱۳۴	۰/۶۷۵	۰/۷۰۹	۳/۹۷۸	خطای آزمایش ۱۴
۶/۸۳	۶/۸۵	۷/۳۵	۳/۴۶	۱۲/۴۴	۶/۸۳	ضرب تغییرات درصد

F.C.Y، C.D، C.L، %D.M، D.W، F.W به ترتیب نشانگر وزن تازه کورم، وزن خشک کورم، درصد وزن خشک کورم، طول کورم، قطر کورم و عملکرد تر کورم در واحد آزمایشی می‌باشند.

ns، * و ** به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد می‌باشند.

ادامه جدول شماره ۲ - تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف کودهای شیمیایی و زیستی بر صفات مورد بررسی در *C. kotschy*

صفات						
D.W.S	F.W.S	Col.Y	Col.C	Col.Con	D.C.Y	منبع تغیر / درجه آزادی
۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۲۲/۲۴ ^{ns}	۰/۲۲۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱ ^{ns}	۸۴/۰۸ ^{ns}	تکرار ۲
۰/۷۵ ^{**}	۴/۰۵ ^{**}	۲۴۴/۵۸ ^{**}	۲/۴۳ ^{**}	۰/۰۲۷ ^{**}	۹۳۵/۷۶ ^{**}	تیمار ۷
۰/۰۲۸	۰/۰۴	۱۱/۷۴	۰/۱۱۷	۰/۰۰۱	۲۸/۸۴	خطای آزمایش ۱۴
۱۴/۰۴	۷/۳۴	۱۲/۱۹	۱۲/۱۹	۸/۲۲	۷/۷۹	ضرب تغییرات درصد

D.W.S، F.W.S، Col.Y، Col.C، Col.Con، D.C.Y به ترتیب نشانگر عملکرد خشک کورم در واحد آزمایشی، میزان کلسی سین در واحد وزن خشک کورم، میزان کلسی کل کورم، میزان کلسی سین در واحد آزمایشی، وزن تر بذر و وزن خشک بذر در بوته می‌باشند.

ns، * و ** به ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد می‌باشند.



جدول شماره ۳ - مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف کودهای شیمیایی و زیستی بر میانگین صفات اندازه گیری شده در *C. kotschy*

تیمار	F.W ^۱ (g)	D.W (g)	%D.M	C.L (cm)	C.D (cm)	F.C.Y (g/unit)	D.C.Y (g/unit)	Col.Con (mg/g)	Col.C (mg/corn)	Col.Y (mg/unit)	F.W.S (g/p)	D.W.S (g/p)
اوره (kg/h)												
شاهد (بدون کود)	۱۶/۰۲d	۴/۲۳ve	۲۶/۴۴a	۵/۰۱a	۲/۹۸b	۱۶۰/۳d	۴۲/۳۹d	۰/۴۸۱ab	۲/۰۳۹d	۲۰/۰۴d	۲/۷a	۲/۲۰۳a
۵۰	۲۶/۴۸c	۶/۲۱۳cd	۲۳/۴۴bc	۴/۹۵a	۳/۳۰b	۲۶۴/۹c	۶۲/۱۳c	۰/۳۰۴e	۱/۸۸۴d	۱۸/۴۴d	۱/۴۶e	۰/۸۱de
۱۰۰	۳۷/۵۹a	۷/۷۸b	۲۰/۷۲d	۵/۲۹a	۴/۲۵a	۳۷۵/۹a	۷۷/۸۵b	۰/۵۲۱a	۴/۰۳a	۴۰/۴۴a	۳/۲۷b	۱/۴۷b
۱۵۰	۲۶/۲۰c	۵/۰۲de	۲۲/۹۹bc	۵/۰۷a	۳/۴۱b	۲۶۱/۹c	۶۰/۳۰c	۰/۲۵۷e	۱/۵۶d	۱۵/۵۶d	۱/۰۳f	۰/۶۵e
نیتروکسین (L/h)												
۲۰	۳۲/۱۰b	۷/۸۳b	۲۴/۳۹b	۴/۹۱a	۴/۰۲a	۳۱۹/۹b	۷۸/۳۲b	۰/۴۰۱cd	۳/۱۴bc	۳۱/۴۵bc	۱/۹۷d	۱/۱۱cd
۴۰	۳۸/۴۷a	۱۰/۱۳a	۲۶/۳۷a	۴/۹۴a	۴/۲۰a	۳۸۴/۶a	۱۰۱/۴a	۰/۳۷۱d	۳/۷۶ab	۳۷/۵۸ab	۳/۲۴b	۱/۴۰bc
۶۰	۲۴/۲۵c	۵/۷۵cde	۲۳/۷۳b	۴/۸۲a	۳/۲۲b	۲۴۲/۴c	۵۷/۵۴c	۰/۴۹۷ab	۲/۸۷c	۲۸/۶۶c	۲/۶۵c	۱/۰۹d
اوره و نیتروکسین (L) *۴۰	۳۲/۵۴b	۷/۱۸bc	۲۲/۱۲cd	۴/۹۲a	۳/۸۶a	۳۲۵/۳b	۷۱/۹۰b	۰/۴۴۴bc	۳/۱۹bc	۳۱/۹۴bc	۲/۴۵c	۰/۸۰de
۱۰۰(kg)												

D.W.S و F.W.S به ترتیب نشانگر وزن تازه کورم، وزن خشک کورم، درصد وزن خشک کورم، طول کورم، قطر کورم، عملکرد تر کورم در واحد آزمایشی، عملکرد خشک کورم در واحد آزمایشی، میزان کلشی سین در واحد وزن خشک کورم، میزان کلشی سین کل کورم، میزان کلشی سین در واحد آزمایشی، وزن تر بذر و وزن خشک بذر در بوته می باشند. میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی داری ندارند.

طول و قطر کورم

بین تیمارهای مختلف در صفت طول کورم اختلاف معناداری دیده نشد ولی بیشترین و کمترین قطر کورم به ترتیب در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم و شاهد به ترتیب با میزان ۴/۲۵ و ۲/۹۸ سانتی متر به دست آمد (جدول شماره ۳). برای صفت قطر کورم تفاوت معنی دار ($p \leq 0.05$) بین تیمار شاهد با تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن و ۶۰ لیتر نیتروکسین دیده نشد (جدول شماره ۳).

وزن تر و خشک بذر در بوته

اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف در صفات وزن تر و خشک بذر در هر بوته مشاهده شد به نحوی که بیشترین مقدار وزن تر و خشک بذر در تیمار شاهد به ترتیب با میزان ۲/۷ و ۲/۲۰۳ گرم و کمترین میزان وزن تر و خشک بذر در

عملکرد تر و خشک کورم در واحد آزمایشی

بیشترین عملکرد تر کورم در واحد آزمایشی در تیمارهای ۴۰ لیتر نیتروکسین و ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن به ترتیب با میزان ۳۸۴/۷ و ۳۷۵/۹ گرم و کمترین میزان در تیمار شاهد با میزان



تیمار ۱۵۰ کیلوگرم به ترتیب با میزان ۱/۰۳۳ و ۰/۶۵۳ گرم به دست آمد (جدول شماره ۳).

میزان کلشی سین در واحد وزن خشک، کلشی سین کل کورم و عملکرد کلشی سین در واحد آزمایشی

بیشترین و کمترین میزان کلشی سین در واحد وزن خشک به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن به ترتیب با میزان ۰/۵۲۱ و ۰/۲۵۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. با این حال اختلاف معنی داری ($p \leq 0/05$) برای میانگین این صفت در تیمار شاهد با تیمار ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن مشاهده نشد (جدول شماره ۳). بیشترین و کمترین مقدار کلشی سین کورم در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن به ترتیب با میزان ۴/۰۲۷ و ۱۵/۵۶ میلی گرم در کورم مشاهده شد (جدول شماره ۳). بیشترین و کمترین عملکرد کلشی سین در واحد آزمایشی در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن به ترتیب با میزان ۴۰/۴۴ و ۱۵/۵۶ میلی گرم در واحد آزمایشی به دست آمد (جدول شماره ۳).

بحث

به طور کلی نتایج نشان داد که سطوح مختلف کودهای شیمیایی و زیستی نیتروژن تأثیر مثبتی بر اکثر صفات مورد مطالعه به جز درصد وزن خشک کورم و وزن تر و خشک بذر داشته‌اند. سطوح متوسط کودهای شیمیایی یا زیستی (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۴۰ لیتر نیتروکسین) نتایج بهتری را بر افزایش وزن تر و خشک و عملکرد تر و خشک کورم نسبت به سطوح پایین تر (۵۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۲۰ لیتر نیتروکسین) یا بالاتر (۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۶۰ لیتر نیتروکسین) این کودها به دنبال داشتند. تیمار شاهد علیرغم داشتن کمترین عملکرد خشک کورم، بیشترین درصد وزن خشک کورم را به خود اختصاص داد. از آنجایی که طول و قطر کورم در اکثر تیمارهای کودی مورد استفاده نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود، به نظر می‌آید که افزایش حجمی که در نتیجه افزایش این صفات در تیمارهای کودی به وجود می‌آید باعث کاهش تراکم

ماده خشک در کورم‌ها می‌شود و این امر کاهش درصد وزن خشک کورم را در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد به دنبال دارد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که احتمالاً در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای کودی، تراکم سلولی در واحد سطح بیشتر ولی حجم تک تک سلول‌ها کمتر است. در تیمارهای کودی نسبت به تیمار شاهد با توجه به نتایج به دست آمده نمی‌توان به طور دقیق رابطه‌ای بین سطوح کودی با نوسانات درصد وزن خشک کورم پیدا نمود اما می‌توان گفت که اگر چه سطوح مختلف کودی باعث افزایش عملکرد خشک کورم می‌شوند اما سطوح مختلف کود نیتروکسین نسبت به سطوح مختلف کود نیتروژن کاهش کمتری را در صفت درصد وزن خشک کورم در مقایسه با تیمار شاهد باعث می‌شوند. در آزمایشی تأثیر کودهای بیولوژیک و شیمیایی نیتروژن در زعفران مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که بیشترین وزن کورم در کاربرد کود زیستی به دست آمد. کود زیستی باعث فراهمی ترکیبات متعدد برای رشد ریشه می‌شود که این امر موجب افزایش رشد و وزن کورم می‌شود [۳۷]. باکتری‌های موجود در کود زیستی نیتروکسین، علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا و متعادل کردن جذب عناصر اصلی پرمصرف و ریز مغذی مورد نیاز گیاه، با سنتز و ترشح مواد محرک رشد گیاه نظیر انواع هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین، همچنین ترشح اسیدهای آمینه مختلف و انواع آنتی‌بیوتیک موجب رشد و توسعه ریشه و قسمت‌های هوایی می‌شوند [۳۸]. بنابراین می‌توان گفت که کود زیستی نیتروکسین باعث تولید مواد فتوسنتزی بیشتر و انتقال آنها به اندام‌های زیرزمینی می‌شود و در نتیجه افزایش وزن کورم را در مقایسه با تیمار شاهد باعث می‌شود. در این آزمایش تیمار تلفیقی (۱۰۰ کیلو نیتروژن همراه با ۴۰ لیتر نیتروکسین) اگر چه باعث افزایش وزن تر و خشک و عملکرد کورم نسبت به تیمار شاهد شد با این حال تأثیر به کار بردن هر کدام از سطوح ۴۰ لیتر نیتروکسین یا ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن به تنهایی، تأثیر مثبت بیشتری بر افزایش میزان صفات ذکر شده به دنبال داشت. همچنین کاربرد سطوح بالاتر نیتروژن یا نیتروکسین باعث کاهش میزان صفات ذکر شده نسبت به



سطوح متوسط کودی شد. در آزمایشی که به منظور تعیین سطوح مناسب نیتروژن، فسفر و کود زیستی روی رشد، عملکرد و اجزاء اسانس در نوعی آرتمیزیا (*Artemisia pallens* Wall.) انجام شد، نشان داده شد که سطوح ۹۳/۷۵ نیتروژن + ۹۳/۷۵ فسفر و ۲ کیلوگرم در هکتار آزوسپریلوم تأثیر مثبت و معنی‌داری روی عملکرد وزن تر و خشک و اسانس داشت. کاربرد آزوسپریلوم میزان کود پیشنهادی نیتروژن و فسفر را تا ۲۵ درصد کاهش می‌دهد و از طرفی رشد و عملکرد را افزایش می‌دهد. بنابراین کاربرد ۷۵ درصد از میزان کود پیشنهادی نیتروژن و فسفر همراه با آزوسپریلوم برای کاشت اقتصادی در آرتمیزیا است [۳۹]. بنابراین به نظر می‌رسد که در تیمار تلفیقی (۱۰۰ کیلو نیتروژن همراه با ۴۰ لیتر نیتروکسین) همچون سطوح بالاتر کودی (۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۶۰ لیتر نیتروکسین) غلظت نیتروژن در محیط ریشه خاک بالاتر از حد مطلوب است و از این‌رو تیمارهای ذکر شده تأثیری نامطلوب بر اکثر صفات مورد مطالعه می‌گذارند. غلظت‌های بالاتر نیتروژن احتمالاً تأثیر منفی بر متابولیسم گیاه دارند. کاهش رشد در غلظت‌های بالای نیتروژن در خشخاش گزارش شده است [۴۰]. کاربرد سطوح ۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی نیتروژن بر روی سیر باعث شده تا بالاترین عملکرد در سطح ۱۲۰ کیلوگرم به دست آید و با افزایش سطح کود به ۲۴۰ کیلوگرم عملکرد به شدت کاهش یافت [۴۱]. در رابطه با اثرات مضر ازت اضافی توسعه ضعیف ریشه و اندام زیرزمینی گزارش شده است [۴۲].

سطوح مختلف کودی تأثیر معنی‌داری بر صفت طول کورم نداشت ولی در غالب موارد قطر کورم در تیمارهای کودی نسبت به تیمار شاهد ($P \leq 0.05$) بیشتر بود. بیشترین وزن تر و خشک بذر در تیمار شاهد به دست آمد در حالی که تمام تیمارهای کودی باعث کاهش وزن تر و خشک بذر نسبت به تیمار شاهد شدند و در این میان سطوح بالاتر نیتروژن و نیتروکسین باعث کاهش بیشتر این صفات نسبت به تیمار شاهد گشتند. نمی‌توان گفت که رابطه‌ی معکوسی بین عملکرد خشک کورم با وزن تر و خشک بذر است ولی از نتایج

پیداست که سطوح بالاتر کودهای شیمیایی و زیستی (۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن و ۶۰ لیتر نیتروکسین) باعث کاهش بیشتر وزن تر و خشک بذر نسبت به تیمار شاهد می‌شوند. کاهش وزن تر و خشک بذر در کاربرد تیمارهای کودی نسبت به تیمار بدون کود، ممکن است به علت افزایش رقابت بین کورم‌ها و کپسول‌های حاوی بذر برای دریافت مواد فتوسنتزی در این تیمارها باشد. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر آنکه در شرایط کشت و کار *C. autumnale*، رقابت بین اندام‌های مختلف گیاه برای دریافت مواد فتوسنتزی، باعث می‌شود تا وزن خشک بذر در گیاهان کشت شده نسبت به گیاهانی که در شرایط رویشگاه رشد کرده‌اند کاهش یابد که این امر خود به علت پر شدن ناقص کپسول‌ها تحت شرایط کشت و کار می‌باشد [۴۳]. همچنین تأثیر زیان آور ازت اضافی بر گلدهی [۴۲] و به تبع آن کاهش تشکیل بذر می‌تواند از دلایل دیگر کاهش وزن بذر در کاربرد سطوح بالاتر کودی باشد.

بیشترین میزان کلشی سین در واحد وزن خشک و نیز عملکرد کلشی سین در سطوح متوسط کود نیتروژن و نیتروکسین (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن و ۴۰ لیتر نیتروکسین) حاصل شد و افزایش سطوح کودی (۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۶۰ لیتر نیتروکسین) کاهش شدید صفات مذکور را باعث شد. تأثیر مثبت کوددهی در افزایش میزان و عملکرد کلشی سین بر روی دو گونه کلشیکوم در آزمایشی دیگر نشان داده شده است در آنجایی که بهترین عملکرد کلشی سین در نسبت ۷۵:۱۰۰:۷۵ از عناصر ازت، فسفر و پتاس مشاهده شد [۱۸]. همچنین گزارش شده است که کوددهی با نیتروژن، میزان آلکالوئید را در برگ‌ها و ریشه‌های ژنوتیپ‌های پروانش به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [۴۴]. به نظر می‌رسد که افزایش سطوح عناصر غذایی بالاتر از حد مطلوب بازدارنده تولید کلشی سین است. باهاراتی و فیلومیندا در آزمایشی به منظور بررسی تأثیر فاکتورهای غذایی بر تولید کلشی سین در کشت درون شیشه‌ای گلوپیوزا نشان دادند که بیشترین میزان کلشی سین با سطوح ۴۰، ۱/۵ و ۱/۵ میلی‌مولار به ترتیب از نترات آمونیوم، پتاسیم هیدروژن فسفات و کلرید کلسیم، به



به طور کلی آنچه از نتایج برمی آید این است که در کشت *C. kotschy* تحت شرایط رویشگاه طبیعی، می توان با کاربرد سطوح متوسط کودهای شیمیایی یا زیستی (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن یا ۴۰ لیتر نیتروکسین در هکتار) به عملکرد کمی و کیفی بهتری دست یافت. استفاده از سطوح بهینه کود زیستی علاوه بر کاهش مصرف کود، امکان گام برداشتن در جهت اهداف توسعه ای پایدار را فراهم می کند، در حالی که سطوح بالاتر کودی اثر نامطلوبی بر عملکرد کمی و کیفی گیاه می گذارد. به منظور تحقیقات آتی پیشنهاد می شود که تأثیر کودهای زیستی دیگر در تلفیق با کودهای شیمیایی، بر روی صفات کمی و کیفی گونه های دیگر جنس *Colchicum* بومی ایران مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و مساعدت ریاست و پرسنل پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی سپاسگزاری می نمایم.

دست می آید و با افزایش غلظت این عناصر به ۱/۵، ۱۰۰ و ۱۰ میلی مولار (به ترتیب نیترات آمونیوم، پتاسیم فسفات هیدروژن و کلرید کلسیم) از تولید کلشی سین جلوگیری به عمل آمد ضمن اینکه وزن خشک نیز کاهش می یابد [۴۵]. لزوم کاربرد سطوح بهینه نیتروژن و اثرات مضر غلظت های بیش از حد بهینه بر میزان ماده مؤثره در گونه های دارویی دیگری نیز گزارش شده است. در آزمایشی میزان آلکالوئید در کاربرد سطوح مختلف نیتروژن (۲/۷۵، ۵/۵، ۱۱، ۲۲ و ۳۲ میلی مولار) در کشت بدون خاک پروانش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان آلکالوئید در غلظت ۱۱ میلی مولار مشاهده شد و افزایش نیتروژن به سطوح بالاتر از ۱۱ میلی مولار اثر آنتاگونیستی بر تولید آلکالوئید داشت [۴۶]. همچنین در جین سنگ (*Ginseng*) حداکثر تولید ساپونین و پلی ساکارید در غلظت ۴۰ میلی مولار ازت حاصل می شود و سطوح ۲۰ و ۸۰ میلی مولار باعث تولید ساپونین و پلی ساکارید کمتر می شوند [۴۷]. به نظر می آید که در سطوح بهینه نیتروژن حداکثر تجمع آلکالوئید ایجاد می شود و کاربرد سطوح کمتر یا بیشتر نیتروژن می تواند منجر به کاهش میزان آلکالوئید شود.

منابع

1. Nordenstam B. Colchicaceae. In: Kubitzki, K. (eds). The families and genera of vascular plants, Vol. 3. Springer-Verlag, Berlin. 1998, pp: 175 - 85.
2. Persson K. *Liliaceae* III. Subfam. I. *Wurmbaeoideae*. In: Rechinger K. H. (eds). Flora Iranica. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Graz. 1992, pp: 1 - 40.
3. Alirezaie Noghondar M, Arouiee H, Rezazadeh Sh and Shoor M. Determination of Colchicine Content in Two *Colchicum* Spices (*Colchicum kotschy* and *C. robustum*). [Abstract]. Scientific conference on medicinal plants industry development in Iran. 28 February & 1 March. Tehran. Iran. 2010, 339: 358.
4. Alirezaie Noghondar M, Arouiee H, Rezazadeh Sh and Shoor M. Study on Different Phonological Stages of Tow Medicine *Colchicum* Spices (*colchicum kotschy* and *c.robustum*) [Abstract]. Scientific conference on medicinal plants industry development in Iran. 28 February & 1 March. Tehran. Iran. 2010, 134: 358.
5. Gharaee M. The investigation of *colchicum jesdianum* alkaloids. Doctoral thesis, University of Tehran. 1986, pp: 107 - 6.
6. Lambert J, Srivastava J and Vietmeyer N. Medicinal plants: rescuing a global heritage. In: World Bank Technical Paper. Washington, DC. USA. 1997, pp: 61 - 5.



7. WHO. Guidelines on the conservation of medicinal plants. World Health Organization, Geneva. Switzerland. 1993, pp: 29 - 31.
8. Hardalova R, Evstatieva L and Gushev C. Wild medicinal plant resources in Bulgaria and recommendations for their long-term development. In: Meine, C. and Sakalian, M. (eds). Bulgaria's biological diversity: conservation status and needs assessment. 1998, pp: 528 - 61.
9. Guo HB, Song ZP, Liang ZS and Zhang YJ. Domestic cultivation may abate the contradiction between sustainable utilization and genetic diversity conservation of medicinal plants. *JMPR*. 2009; 3 (13): 1184 - 8.
10. Li DX, Gao M, Meng QG, Wang JY, Sun H and Wang Q. Comparative study on the quality of natural and cultivated *Radix Scutellariae*. *Tianjin J. Tradit. Chin. Med.* 2007; 24 (4): 332 - 5.
11. Ma SZ, Chen ZG, Li Y, Zhang DX and Ma JM. Study on changes of Astragaloside in *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* (Bunge) Hsiao grown at different cultivation regions of Longxi County. *J. Anhui Agrl. Sci.* 2004; 32 (3): 518 - 9.
12. Song PS, Wei YL, Zhao JB and Ding YH. HPLC determination of Gastrodin in cultivated *Gastodia elata* BL. from different regions. *Gansu J. TCM*. 2008; 21 (10): 52 - 3.
13. Schippmann U, D. Leaman and AB. Cunningham. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. In: R.J. Bogers, L.E. Craker, and D. Lange (eds.), Medicinal and aromatic plants. Proc. Frontis Workshop on Medicinal and Aromatic Plants, Wageningen, The Netherlands, 17-20, April 2005. Nucleus for Strategic Expertise Wageningen University and Research Centre, Wageningen. 2006, pp: 75 - 95.
14. Cunningham AB. Management of medicinal plant resources: an Africa-wide overview. In: Seyani JH and Chikuni AC (eds). Proceedings of the 13th Plenary Meeting of AETFAT, Zomba, Malawi, 2-11 April, 1991, Vol. 1. Montfort, Limbe. 1994, pp: 173 - 89.
15. Guo M, Gao HQ, Yu XH, Li ZH, Zhang YX, Sheng KH and Gao CY. Quality comparison between cultivated and wild materials of *Tussilago farfara* L. *J. Chinese Med Materials* 2001; 24 (11): 787 - 8.
16. Wang SM, Yang Y and Zhang SH. Comparison of chemical compounds between materials of wild and cultivated *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. *Shanxi J. Trad. Chin. Med.* 1990; 6 (8): 35 - 6.
17. Al-Fayyad M, Alali F and Al-Tell A., Effect of NPK fertilizer levels on morphological characteristics and productivity of *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum*. *J. Herbs. Spices. Med. Plants*. 2003; 4 (10): 11 - 7.
18. Al-Fayyad M, Alali F, Alkofahi A and Tell A. Determination of colchicine content in *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum* under cultivation. *Nat. Prod. Lett.* 2002; 16: 395 - 400.
19. Waller GR and Nowacki EK. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants, Plenum Press, New York and London. 1978, p: 294.
20. Nassiri Mahallati M, Koocheki A, Rezvani Moghadam P and Beheshti A. Agroecology (Translated Book). Ferdowsi University of Mashad Pub. Iran. 2001, pp: 459 - 3.
21. Koocheki A, Nakhforoush A and Zarif Ketabi H. Organic Farming (Translated Book). Ferdowsi University of Mashad Pub. Iran. 1997, pp: 331 - 89.
22. Rigby D and Caceres D. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agr. Syst.* 2001; 68: 21 - 40.
23. Elsen TV. Species diversity as a task for organic agriculture in Europe. *Agr Ecosyst Environ.* 2000; 77: 101 - 9.
24. Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 2003;



255: 571 - 86.

25. Chen J. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. October, 16 - 20. Thailand. 2006, 11 pp.

26. Rajendran K and Devaraj P. Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farm land. *Biomass Bioenerg.* 2004; 26: 235 - 49.

27. Kader MA. Effects of *Azotobacter* inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. *J. Biol. Sci.* 2002; 2: 259 - 61.

28. Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena A K, Shekhar Nautiyal C, Shilpi Mittal A, Tripathi K and Johri BN. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 2005; 89: 136 - 50.

29. Kapoor R, Giri B and Mukeri KG. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens*) and carum (*Trachyspermum ammi*). *World J. Microbiol Biotechnol.* 2002; 18: 459 - 63.

30. Shaalan MN. Influence of biofertilizers and chicken manure on growth, yield and seed quality of *Nigella sativa* plants. *Egyptian J. Agric. Res.* 2005; 83: 811 - 28.

31. Copetta A, Lingua G and Berta G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs and essential oil production in *Ocimum basilicum*. *Mycorrhiza* 2006; 16: 485 - 94.

32. Kapoor R, Chaudhary V and Bhatnagar AK. Effect of *Arbuscular mycorrhiza* and phosphorus application on Artemisinin concentration in *Artemisia annua*. *Mycorrhiza* 2007; 17: 581 - 7.

33. Koochehi A, Tabrizi L and Ghorbani R. Effect of biofertilizers on agronomic and quality criteria of Hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Iranian J. Field Crop Res.* 2008; 6 (1): 127 - 38.

34. Abdul-Jaleel C, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundaram R and Panneerselvam R. *Pseudomonas fluorescens* enhance biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress, *Colloid. Surface B.* 2007; 60: 7 - 11.

35. Ratti N, Kumar S, Verma HN and Gautams SP. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martini* by rhizobacteria, AMF and azospirillum inoculation. *Microbiol. Res.* 2001; 156: 145 - 9.

36. Alali F, El-Alali A, Tawaha Kh and Al Elimat T. Seasonal variation of colchicine content in *Colchicum brachyphyllum* and *Colchicum tunicatum* (Colchicaceae). *Nat. Prod. Res.* 2006; 20: 1121 - 8.

37. Omid H, Naghdi Badi H, Golzad A, Torabi H and Footukian MH. The effect of chemical and bio-fertilizer source of nitrogen on qualitative and quantitative yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants* 2009; 8 (30): 98 - 110.

38. Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehrouachi J, Tadeo FR and Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacilluslicheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 2001; 111: 206 - 11.

39. Senthil Kumar T, 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. *EJEAFChe.* 2009; 8 (2): 86 - 95.

40. Ruminska A, Suchorska K and Weglarz Z. The changes in the yield and morphine content in the medical poppy (*Papaver somniferum* L.) as affected by nitrogen fertilizers. Proc. FIP Congress. 1976. Warsaw.

41. Kilgori MJ, Magagi MD and Yakubu AI. Productivity of two Garlic (*Allium sativum* L.) cultivars as affected different levels of nitrogen



- and phosphorous fertilizers in Sokoto, Nigeria. *AEJAES* 2007; 2 (2): 158 - 62.
42. Tandon HLS. Fertiliser recommendations for oilseed crops. Development and Consultation Organisation Fertiliser. New Delhi. India. 1993, pp: 95 - 11.
43. Poutaraud A and Girardin P. Seed yield and components of alkaloid of meadow saffron (*Colchicum autumnale*) in natural grassland and under cultivation. *Can. J. Plant Sci.* 2003; 83: 23 - 9.
44. Sreevalli Y, Kulkarni RN, Baskaran K and Chandrashekar RS. Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. *Ind Crop Prod.* 2004; 19: 191 - 5.
45. Bharathi P and Philomina D. Effect of nutritional factors and precursors on formation of colchicine in *Gloriosa superba* in vitro. *Res. in Biotechnol.* 2010; 1: 29 - 37.
46. Abdolzadeh A, Hosseinian F, Aghdasi M and Sadgipoor H. Effects of nitrogen sources and levels on growth and alkaloid content of Periwinkle, *Asian. J. Plant. Sci.* 2006; 5 (2): 271 - 6.
47. Zhong J and Wang S. Effects of nitrogen sources on the production of ginseng and polysaccharide by cell cultures of panax quinuefolium. *Process Biochem.* 1998; 33: 71 - 675.

