بررسی تغییرات میزان آتروپین واسکوپولامین و ویژگی‌های رشدی گیاه دارویی *Atropa belladonna* L. تحت تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی

محمد اینانلوفر[۱]، مصطفی حیدری[۲]، حسنعلی نقدی‌بادی[۳]*، مجید تولیت ابوالحسنی[٤]، حسن مکاریان[۲]، محمدرضا عامریان[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

[۲]دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

[۳]دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.

[٤]استادیار، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۵

چکیده

امروزه بکارگیری باکتری‌های محرک رشد (PGPR)[۲] یکی از راهکارهای بهبود رشد و ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاهان دارویی می‌باشد. این تحقیق در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در سال ۱۳۹۵ به‌صورت فاکتوریل و بر پایه طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. باکتری‌های محرک رشد شامل عدم تلقیح، سودوموناس، ازتوباکتر، سودوموناس+ ازتوباکتر، تیوباسیلوس+ گوگرد به‌عنوان عامل اول، و کود شیمیایی شامل عدم مصرف کود شیمیایی یا شاهد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده به عنوان عامل دوم این آزمایش بودند.آلکالوئیدهای گیاه در مرحله گلدهی و با استفاده از حلال‌های کلروفرم، متانول و آمونیاک استخراج و مقدار آتروپین و اسکوپولامین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که کودهای زیستی و شیمیایی و اثر متقابل آنها بر صفات رشدی و میزان آتروپین و اسکوپولامین برگ و ریشه تأثیر معنی‌داری داشته‌اند ($p<0.01$). بیشترین مقدار عملکرد بیولوژیک در تیمار سودوموناس با ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده مشاهده شد. بیشترین میزان آتروپین و اسکوپولامین در برگ به‌ترتیب مربوط به تیمارسودوموناس با ۵۰ درصد کود توصیه شده و تیمار عدم استفاده از کود زیستی با ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده بود. بیشترین میزان آتروپین ریشه مربوط به تیمار سودوموناس با عدم استفاده از کود شیمیایی توصیه شده بود و بیشترین میزان اسکوپولامین ریشه در تیمار سودوموناس با ۱۰۰ درصد کود توصیه شده مشاهده شد. بنابراین بیشترین عملکرد بیولوژیک و میزان آتروپین در برگ و ریشه و همچنین میزان اسکوپولامین ریشه در گیاه شابیزک با کاربرد باکتری سودوموناس حاصل شده است.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید، آتروپین، اسکوپولامین، باکتری‌های محرک رشد، شابیزک.

*نویسنده مسئول: naghdibadi@yahoo.com

2. Plant growth-promoting rhizobacteria

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری‌ها با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است. اگر چه در ۵۰ سال گذشته استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی رواج زیادی یافته، ولی آثار زیانبار آنها بر سلامت انسان سبب گرایش مجدد به کاربرد گیاهان دارویی شده است. بنابراین در طول تاریخ، استفاده از گیاهان دارویی یکی از روشهای مهم در درمان بیماری‌ها بوده است (Omidbeigi, 2015). اگرچه مصرف گیاهان دارویی با توسعه صنایع شیمیایی محدود شده است، اما چشم‌انداز مقدار استفاده از این گیاهان رو به افزایش است و پژوهش‌های علمی، اثربخشی و ایمنی برخی از روش‌های طب مکمل از جمله گیاهان دارویی را در درمان برخی بیماریها به اثبات رسانده است (Nourhosseini et al., 2017).

تیره سیب‌زمینی نزدیک به ۲۰۰۰ گونه دارد که برخی از آن‌ها دارای آلکالوئیدهای مهمی مانند آتروپین و اسکوپولامین هستند (Ghahreman, 2008). گیاه شابیزک (*Atropa belladonna* L.) یکی از گیاهان این تیره است که به دلیل داشتن آلکالوئیدهای مهم به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود (Zhang et al., 2004). شابیزک با نام‌های انگلیسی Death cherries، Devil's berries، Belladona، Deadly nightshade گیاهی است پایا، چند ساله، که از قدیم به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی استفاده شده است. خواص دارویی آن مربوط به آلکالوئیدهای موجود در این گیاه است. شابیزک با بوی نامطبوع، دارای آلکالوئیدهای مشتق از تروپان ($C_8H_{15}N$) شامل آتروپین و اسکوپولامین است (Latif and Gray, 2006). آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین جزء مهمترین آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند که به عنوان داروهای ضدکولیک و اسپاسمولیتیکی در دستگاه گوارش و دفع ادرار مورد استفاده قرار می‌گیرند. آتروپین، آلکالوئید اصلی در ریشه‌های گیاه شابیزک *Atropa belladonna* است و بیشتر به خاطر اثرات آنتیکولینرژیک (Anti-cholinergic) که روی گیرندگان موسکارین (Muscarinic receptors) عمل می‌کند، شناخته می‌شود. اسکوپولامین نیز مانند آتروپین به‌عنوان آنتی‌موسکارین (Anti- Muscarin) عمل می‌کند، اما تأثیر بیشتری روی سیستم عصب مرکزی دارد (Navasi et al., 2019).

امروزه باکتری‌ها توجه زیادی را به عنوان تقویت کننده رشد گیاه به خود جلب کرده‌اند. این ریزوباکتری‌ها اثر متقابل بر خاک و ریشه گیاه دارند و بر رشد گیاه تأثیر مثبت دارند و به همین دلیل به آنها تحریک کننده‌های رشد (PGPR) می‌گویند. این باکتری‌ها مستقیماً باعث تحریک رشد می‌شوند و یا بصورت غیرمستقیم از طریق کنترل بیماری‌ها به عملکرد گیاه کمک می‌کند. به‌دلیل این ویژگی‌های مهم، امروزه به عنوان راهبردی مطمئن برای افزایش عملکرد، حفاظت از گیاهان زراعی، جایگزینی مناسب و بوم سازگار برای کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌های شیمیایی برای آینده معرفی می‌شود. باکتری‌های آزادزی در برخی فرآیندهای کلیدی بوم نظام مانند فرآیندهای دخیل در کنترل بیولوژیکی پاتوژن‌های گیاهی، چرخه عناصر غذائی و استقرار گیاهچه نقش دارند (Wu et al., 2005). بنابراین بکارگیری مواد بیولوژیک، دارای کارکردهای چند منظوره‌ای در بوم نظام‌های زراعی هستند بطوریکه بالقوه سبب بهبود کیفیت فیزیکی خاک (از طریق گسترش ریسه‌های قارچ یا کلنی‌های باکتریایی)، کیفیت شیمیائی خاک (از طریق افزایش جذب عناصر غذائی) و کیفیت بیولوژیکی خاک (از طریق شبکه غذائی خاک) می‌گردند (Emam, 2007). بهرحال مصرف کودهای زیستی روی ذرت، اثر مثبت بر جذب عناصر غذایی و عملکرد دارد (Ehteshami et al., 2008).

کودهـای زیسـتی نیتـروژن از طریـق ترشـحات حل‌کننده و کاهش pH، عناصر مختلف غذایی بیشتر را به صورت محلول در اختیار گیاه قرار داده و بـا تولیـد بیشتر مواد فتوسـنتزی در افـزایش تولیـد مـؤثر واقـع می‌شود (Han et al., 2006). اگرچه این عنصر می‌تواند به صورت کوددهی شیمیایی و زیستی در اختیار گیـاه قرار گیرد ولی مصرف نامتناسب و بـی‌رویـه کودهـای شـیمیایی نیتـروژن، نتیجـه‌ای جـز کـاهش کیفیـت محصول، افزایش هزینه تولید و افزایش آلودگی منابـع آب زیرزمینی در بر نخواهد داشت (Mohammedvarzi, 2010). فـلاح نصـرت‌آبـاد و همکـاران (Fallah Nosratabad et al., 2014) در بررسـی تـأثیر کودهـای زیسـتی و شـیمیایی نیتـروژن بـر عملکـرد و اجـزای عملکرد گندم نشان دادند که برهمکنش کـود زیسـتی حـاوی ازتوبـاکتر، آزوسـپیریلوم، سـودوموناس و باسیلوس با کود شیمیایی نیتروژن، به‌طور قابل توجهی منجر به افزایش عملکرد دانه شده‌است.

باکتری‌های حل کننـده فسـفات، گروهـی از ریـز موجـودات را در بـر مـی گیرنـد کـه قادرنـد فسـفر نامحلول در خاک را به فرم محلول قابل دسترس گیـاه تبدیل کنند. از مهم‌ترین جنس‌های ایـن خـانواده مـی توان به *Bacillus* و *Pseudomonas* اشاره کرد. گونه‌های مختلـف جـنس *Pseudomonas* در کنتـرل قـارچ‌هـای بیماریزا مـؤثر بـوده و *P.fluorescens* از طریـق سـاز و کارهای مختلفی از جملـه تولیـد سـیدروفورها، سـنتز آنتی بیوتیک‌ها، تولید هورمـون‌هـای گیـاهی، افـزایش جذب فسفر، تثبیت نیتروژن و سـنتز آنـزیم‌هـایی کـه مقدار اتیلن در گیاه را تنظیم می‌کننـد، سـبب تحریـک رشـد گیـاه مـی‌گـردد (Abdul-Jaleel et al., 2007). در مطالعـه‌ای کـه گیـاه عـدس بـه سـویه‌هـای بـاکتری سودوموناس فلورسنس و قارچ میکوریزای آربسـکولار تلقیح شده بود مشخص گردید که یک رابطه همکاری مثبت بین قارچ‌های میکوریزای و بعضی از سویه‌هـای باکتری وجود دارد سبب افزایش عملکرد گیـاه عـدس شده‌است (Zarei et al., 2006).

بـاکتری‌هـای جـنس تیوباسـیلوس از مهمتـرین و رایجترین انواع باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد است و گوگرد موجود در خاک را به‌صورت SO_4 قابل جـذب برای گیاهـان در مـی‌آورد (Ravichandra et al., 2007). تیوباسیلوس‌ها اثرات قابـل ملاحظـه‌ای بـر pH محـیط دارند و با تولید اسید توسط، حلالیت عناصر افـزایش یافتـه و قابلیـت دسترسـی آنهـا تسـهیل مـی‌گـردد (Fallah et al., 2010). بهرحال کـاهش اسـیدیته خـاک، یکـی از روشـهای مـؤثر مقابلـه بـا کمبـود فسـفر و ریزمغذیها در خـاک‌هـای آهکـی و قلیـایی بـه شـمار می‌رود (Doroudian et al., 2010).

با توجه به اهمیت آلکالوئیـدهای مهـم موجـود در گیاه دارویی شابیزک و از آنجاییکـه تـاکنون پژوهشـی زراعی در خصوص اثر کودهای زیستی و مصرف توام آنها با کودهای شـیمیایی بـر آلکالوئیـدهای ایـن گیـاه انجام نشده است، این تحقیق در راستای تولید پایـدار ایـن گیـاه بـا هـدف ارزیـابی خصوصـیات رشـدی و فیتوشیمیایی گیاه شابیزک در شـرایط مزرعـه‌ای انجـام شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سـال ۱۳۹۵ در مزرعـه تحقیقـاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهـاد دانشـگاهی واقـع در کرج انجام شده است. قبل از انجام آزمایش، از خـاک نمونه برداری و خصوصـیات فیزیکـی و شـیمیایی آن تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه تا عمق ۳۰ سانتی‌متری

کلاس بافت خاک	درصد اجزاء رس	سیلت	شن	اسیدیته (pH)	شوری (dS/m)	ازت کل (درصد)	مواد آلی (درصد)	فسفر قابل جذب ($mg.kg^{-1}$)	پتاسیم قابل جذب ($mg.kg^{-1}$)
لوم سیلتی	۸	۱۳	۷۹	۸/۲	۰/۹۵	۰/۰۷۱	۰/۸۲	٤٨/٩	٣٣/٦

جدول ۲: مشخصات اقلیمی و جغرافیایی مزرعه تحقیقاتی

میانگین سالیانه دما (سانتی‌گراد)	میانگین بارندگی (میلی‌متر)	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱۳/۲۱	۲٦۳	۱٤۲٦	۳٥º ۳٦´	٥۰º ٥٦´

جدول ۳: میانگین برخی شاخص‌های آب و هوایی منطقه کشت گیاه شابیزک در طول دوره رشد گیاه (سال ۲۰۱۸-۲۰۱۷)

ماه	میانگین دمای ماهانه (°C)	ماکزیمم دمای ماهانه (°C)	مینیمم دمای ماهانه (°C)	مجموع بارش ماهانه mm
January	2.1	13.3	-8.6	46.4
February	0.9	13.2	-12.3	77.7
March	7.2	17.9	-3.1	81.8
April	13.1	25.2	-1.8	97.1
May	20.6	31.1	8.3	35.2
June	24.9	35.2	9.1	0
July	27.4	37.8	12.9	0.6

این آزمایش به‌صورت 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 P_5; S)، ازتوباکتر (*Azotobacter vinelandii* strain O_4; A)، سودوموناس + ازتوباکتر(SA)، تیوباسیلوس (*Thiobacillus* spp.) +گوگرد (T) به عنوان عامل اول و کود شیمیایی در سه سطح : عدم مصرف کود شیمیایی «شاهد» (F_1)، ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده (F_2) و ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده (F_3) به‌عنوان عامل دوم بودند. بذر گیاه شابیزک در تاریخ ۱۳۹۵/۱۱/۰۱ در بستر گلخانه کشت و در تاریخ ۱۳۹٦/۰۱/۱۵ نشاءها به زمین اصلی مزرعه منتقل گردیدند. در این آزمایش کرتهای آزمایش به ابعاد ۲×۲ متر ایجاد و نشاهای شابیزک در فواصل ۵۰ ×۲۰ سانتی‌متر کشت گردیدند در نهایت در مرحله گلدهی، گیاهان جهت اندازه‌گیری صفات برداشت شدند.

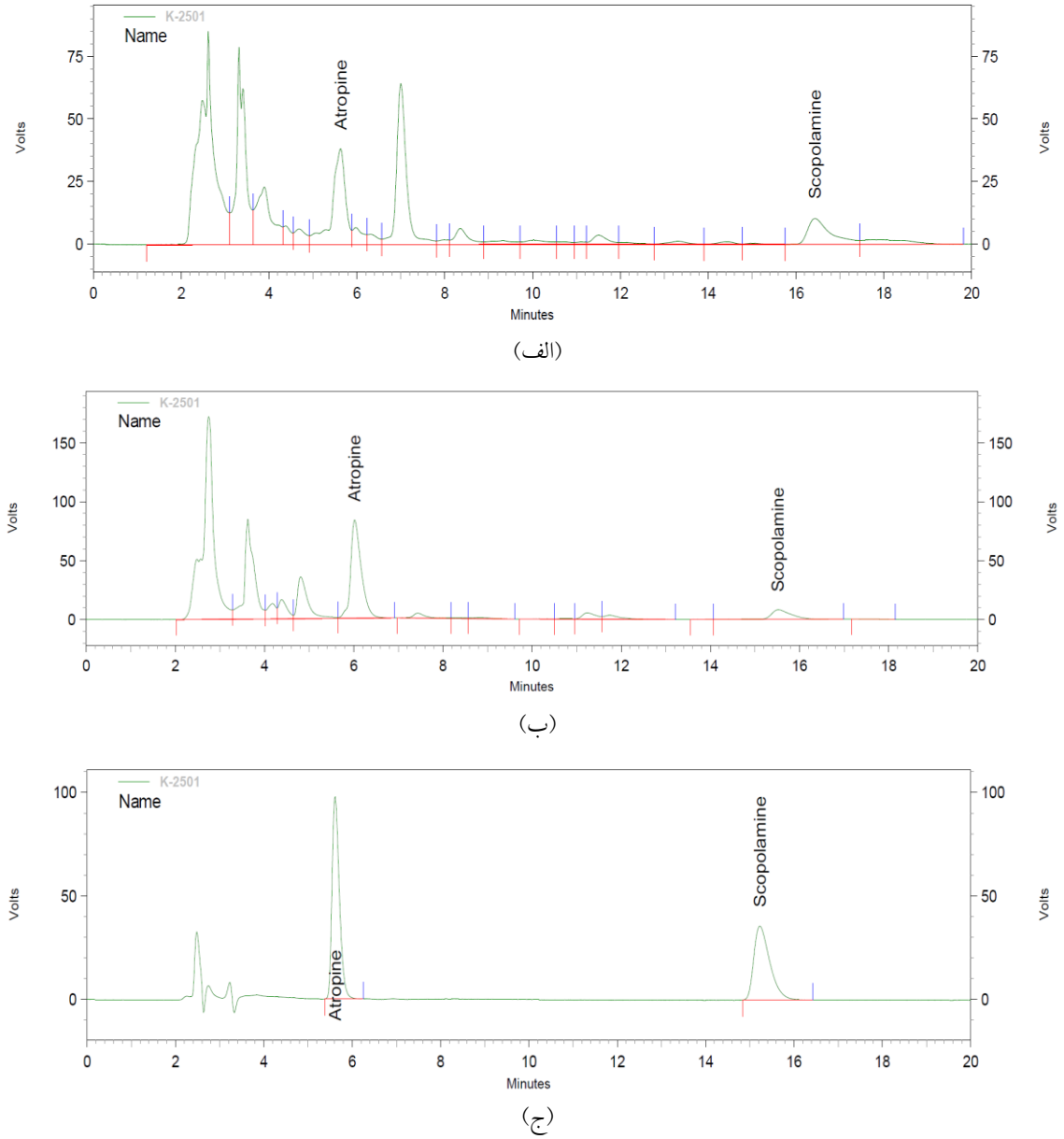
در آخرین مرحله آماده سازی مزرعه برای کاشت نشاء شابیزک و همزمان با آماده سازی کرت‌ها، مقدار ۵۰ درصد توصیه کودی هر تیمار به خاک اضافه شد. اعمال تیمار تلقیح با باکتری‌های محرک رشد در تاریخ ۱۳۹٦/۰۱/۱۵ همزمان با کشت نشاء صورت پذیرفت. ۵۰ درصد توصیه کودی نیز در ۱۳۹٦/۰۲/۳۰ قبل از شروع مرحله گلدهی به مزرعه داده شد. در این آزمایش، سایر عملیات زراعی برحسب نیاز انجام شد. نمونه برداری و اندازه گیری صفات نیز با به گل رفتن گیاه در تیرماه ۱۳۹٦ آغاز گردید. صفات مورد اندازه‌گیری شامل ارتفاع بوته، طول برگ، عرض برگ، عملکرد بیولوژیک، قطر ساقه، میزان سبزینگی برگ، میزان آتروپین و اسکوپولامین گیاه بودند. برای خشک

کـردن انـدام هـوایی گیـاه جهـت محاسـبه عملکـرد بیولوژیـک و نیـز حفـظ کیفیـت، نمونـه‌هـا بصـورت یکنواخت در قفسه‌ها پخش گردیده و در دمـای اتـاق خشک گردید. میزان سبزینگی بـرگ‌هـا بـا اسـتفاده از دستگاه SPAD (مدل MINOLTA-502 JAPAN) تعیـین شد.

بـرای سـنجش آتـروپین و اسـکوپولامین بـرگ و ریشـــه از عصـــاره نمونـــه‌هـــا از روش فـــاچینی و دلوکـا(Facchini and De Luca, 1995) و فریـک و همکاران (Frick *et al.*, 2004) استفاده شـد. بـر اسـاس این روش، مقدار یک گرم از پودر گیاه شـابیزک را بـه ارلـن ۲۵۰cc انتقـال داده و بـه آن ۵cc آمونیـاک ۲۵ درصد، cc ۲۵ متانول و cc ۷۵ کلروفـرم بـه آن اضـافه شد و درب آن بسته و به مدت ۱۰ دقیقـه در دسـتگاه اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به مـدت ۳۰ دقیقـه در مکانی تاریک قرار نگهداری شد و بعـد بـه وسـیله کاغـذ صـافی و پنبـه صـاف شـد و بـه کمـک ۱۰cc کلروفـرم محتویـات باقیمانـده در ارلـن نیـز از کاغـذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده، در یک بـالن ۲۰۰cc به دستگاه روتاری متصل شد تـا حلالهـای آن تبخیر و خارج شود. به رسوب حاصل، ۲۵cc کلروفرم و ۱۰cc اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شـد. بـرای بهتر حل شدن رسوب میتوان از دستگاه اولتراسـونیک برای مدت زمان کوتاهی استفاده کرد. محلول فـوق را به یک دکانتور منتقـل کـرده و پـس از ایجـاد دو فـاز مجزا، فاز پایینی کـه فـاز کلروفرمـی بـود، از دکـانتور خارج و فاز بالایی را که فاز آبی بود، نگه داشـته شـد. در صورت ایجاد اینترفاز (یک لایه بین دو فـاز آبـی و کلروفرمی) از چند میلی‌لیتر محلـول آب نمـک اشـباع برای جداسازی بهتر دو فاز استفاده گردید. با اسـتفاده از چند قطره محلول آمونیاک pH محلول بین ۱۱ – ۱۰ تنظیم شد. در این مرحله فاز کلروفرمی (فـاز پـایینی) در بالنهای کوچکتر جمع‌آوری و فـاز آبـی مجـدداً بـا ۱۰cc کلروفـرم اسـتخراج و جمـع‌آوری شـد. بـرای آبگیری از محلول حاصل، به محلول کلروفرمی جمع-آوری شده، سدیم سولفات انیدرید اضافه و سپس بـه وسـیله کاغـذ صـافی صـاف شـد. سـپس بـا دسـتگاه روتاری، حلال آن کاملاً خارج شـد و مـواد باقیمانـده بـا ۵cc متـانول ویـژه HPLC جمـع‌آوری شـد. بـرای انحلال کامل رسوب در متانول، به مدت چند دقیقه در اولتراسونیک قرار داده شد. بـه ایـن ترتیـب نمونـه‌هـا برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع بـا کـارایی بـالا (HPLC): روش کروماتوگرافی مـورد اسـتفاده جهـت جداسـازی و تعیـین مقـدار آتـروپین و اسـکوپولامین موجـود در گیـاه شـابیزک، روش کروماتوگرافی مـایع بـا کـارایی بـالا (HPLC) (performance High chromatography liquid) بـود. در بـین روش‌هـای گونـاگون آنـالیز آلکالوئیـدها، روش HPLC با ردیاب ماورای بنفش، به دلیل گزینش‌پذیری مناسـب و حساسـیت بـالا، بیشـتر مـورد توجـه قـرار می‌گیرد. در این تحقیق برای آنالیز عصـاره از دسـتگاه HPLC مدل Knauer با Flow rate، ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده، آمونیوم استات 100 mM ،دی‌اکسـان، اسـتونیتریل، بـه نسـبت (۴۰:۵۰:۵۰:۸۶۰) با استیک اسـید ۵/۶ =pH و دتکتـور UV با طـول مـوج ۲۵۴ nm سـتون CN 5micrometer (4.9*250) اسـتفاده شـد. حجـم هـر بـار تزریـق ۵۰ میکرولیتـر بـود. میـزان دو آلکالوئیـد آتـروپین و اسـکوپولامین در نمونـه‌هـای گیـاه براسـاس سـطح زیرمنحنی به دست آمـده (شـکل۱) و بـا اسـتفاده از منحنـی اسـتاندارد آنهـا محاسـبه شـد. منحنـی اسـتاندارد نیـز براسـاس سـطح زیـرمنحنـی دو ترکیـب استاندارد (آتروپین سولفات و اسـکوپولامین هیدروبرومایـد) در ٤ غلظـت ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترسیم شد.

تجزیه داده‌ها: مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح ۵ درصد و آنالیز داده‌های این تحقیق توسط نرم‌افزار SAS ver 9.1 انجام شد.



شکل ۱: نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین اندام هوایی (الف)، ریشه (ب) و محلول استاندارد (ج)

نتایج

صفات رشدی: نتایج آزمایش بیانگر آن بود که کودهای زیستی و شیمیایی و همچنین اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری ($p\leq0.01$) بر صفات کمی شامل ارتفاع بوته، قطر ساقه، طول برگ، عرض برگ، عملکرد بیولوژیکی و میزان سبزینگی برگ داشت (جدول ٤). بیشترین مقدار ارتفاع بوته (٦٤ سانتی‌متر) در تیمار F_2S (سودوموناس + ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین مقدار ارتفاع بوته (به‌ترتیب ۳۷ و ۳٦ سانتی‌متر) در تیمارهای F_1T (تیوباسیلوس+ گوگرد و

عدم استفاده از کود شیمیایی) و F_1A (ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین و کمترین مقدار قطر ساقه (به‌ترتیب ۱۵/۳۳ و ۸/۵۱ میلی‌متر) مربوط به تیمارهای F_2S (سودوموناس + ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_1A (ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) بود (جدول ۵). بیشترین مقدار طول برگ و عرض برگ (به‌ترتیب ۲۳/۹٤ و ۱۲/۷۵ سانتی‌متر) از تیمار F_3T (تیوباسیلوس+گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین مقدار طول برگ و عرض برگ (به‌ترتیب ۱٤/۹۷ و ۷/۷۸ سانتی‌متر) از تیمار F_1A (ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) حاصل گردید (جدول ۵). بیشترین عملکرد بیولوژیک (۸۷۰۱ و ۸٦۷٤ کیلوگرم در هکتار) به‌ترتیب در تیمار F_3S (سودوموناس و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_3SA (سودوموناس + ازتوباکتر و ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین عملکرد بیولوژیک (۵۰۲۲ کیلوگرم در هکتار) در تیمار F_1A (ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) مشاهده گردید (جدول ۵). حداکثر میزان سبزینگی برگ (٤٦/۲) در تیمار F_2A (ازتوباکتر و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین میزان سبزینگی برگ مربوط به تیمارهای F_1T (تیوباسیلوس + گوگرد و عدم استفاده از کود شیمیایی)، F_3T (تیوباسیلوس+گوگرد و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده)، F_1N (عدم تلقیح کود زیستی و عدم استفاده از کود شیمیایی)، F_1A (ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) و F_1S (سودوموناس و عدم استفاده از کود شیمیایی) بود (جدول ۵).

صفات فیتوشیمیایی: کودهای زیستی و شیمیایی و همچنین اثر متقابل آنها بر میزان آتروپین برگ، آتروپین ریشه، اسکوپولامین برگ و اسکوپولامین ریشه تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0.01$) داشتند (جدول ٤). بیشترین میزان آتروپین برگ (۲۷/۵ میلی‌گرم/گرم ماده خشک) در تیمار F_2S (سودوموناس و ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (٤/۰۵ میلی-گرم/گرم ماده خشک) در تیمار F_3SA (سودوموناس + ازتوباکتر و ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین و کمترین میزان آتروپین ریشه (۱۱/۵ و ۷/۵ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) به‌ترتیب در تیمار F_1S (سودوموناس و عدم استفاده از کود شیمیایی) و تیمار F_2N (عدم تلقیح کود زیستی و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل گردید (جدول ۵).

بیشترین میزان اسکوپولامین برگ (۱۰/٤ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) در تیمار F_2N (عدم تلقیح کود زیستی و ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (۰/۰۳ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) از تیمارهای F_2T (تیوباسیلوس+گوگرد و ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_1SA (سودوموناس + ازتوباکتر و عدم استفاده از کود شیمیایی) مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین میزان اسکوپولامین ریشه (۱/۷۷ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) در تیمار F_3S (سودوموناس و ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و کمترین آن (۰/٥٦ و ۰/٤۸ میلی‌گرم/ گرم ماده خشک) به ترتیب از تیمارهای F_2N (عدم تلقیح کود زیستی و ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_2S (سودوموناس و ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) حاصل گردید (جدول ۵).

جدول ٤: تجزیه واریانس پاسخ‌های رشدی و فیتوشیمیایی گیاه شابیزک به کودهای زیستی و شیمیایی در شرایط زراعی

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (D.F)	میانگین مربعات (MS)					
		ارتفاع بوته	قطر ساقه	طول برگ	عرض برگ	عملکرد بیولوژیک	میزان سبزینگی برگ
تکرار (R)	۲	۰/۰۱۱^{ns}	۰/۳۹^{ns}	۰/٤۳^{ns}	۰/۰٦۲^{ns}	۰/۰۵۳^{ns}	۰/۷۳^{ns}
کود زیستی (B)	٤	۱۳/۵۳**	٤۵/۱۲**	۳۸/۰۱**	۲۸/۷۵**	۵/۱۲**	۵/٤۵**
کود شیمیایی (F)	۲	۹/۱۲**	۱۱/۰٦**	۱۱/۷۰**	۵/۳۷**	۸/۲۵**	۲/۹۳**
اثر متقابل F × B	۸	۲۸/٤۱**	۵۱/٤۲**	۵٤/٦۲**	۱۱/۰۸**	٤/۱۷**	۱/۱۵**
خطا (E)	۲۸	۰/۱۱٤	۰/۰۸۹	۰/۳۱۱	۰/۲۲۱	۰/۱٤۳	۰/۰٤۵
ضریب تغییرات (C.Vدرصد)	---	۱۵/۸٦	۱۵/۳٤	۱۳/۲۵	۱٦/٤۹	۱۲/۹٦	۱۱/۸٦

** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌داری

ادامه جدول ٤:

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (D.F)	میانگین مربعات (MS)			
		آتروپین برگ	آتروپین ریشه	اسکوپولامین برگ	اسکوپولامین ریشه
تکرار (R)	۲	۰/۰٤۲^{ns}	۰/٦۳^{ns}	۰/۵۲^{ns}	۰/۱۹^{ns}
کود زیستی (B)	٤	۱۳/۲۷**	۲۵/۰۸**	٦/۱۲**	۱۹/٤۱**
کود شیمیایی (F)	۲	۳/۰۹**	٦/٤۳**	٤/۷۵**	۱۰/۱۳**
اثر متقابل F × B	۸	۰/۸٤۳**	۷/۱۲**	۲/۲٦**	۳۰/۰٤**
خطا (E)	۲۸	۰/۳۱۵	۰/۳٤٤	۰/۲۸٦	۰/۲۰٤
ضریب تغییرات (C.Vدرصد)	---	۱۳/۹۷	۱٤/٦۲	۱۱/۷۳	۱۲/۰٦

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

جدول شماره ۵- اثر متقابل باکتری‌های محرک رشد و کودهای شیمیایی بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه دارویی شابیزک در شرایط زراعی

تیمار	صفات مورد بررسی									
	ارتفاع بوته(cm)	قطر ساقه (mm)	طول برگ(cm)	عرض برگ(cm)	عملکرد بیولوژیک(kg/ha)	میزان سبزینگی برگ	آتروپین برگ (mg/g)	آتروپین ریشه (mg/g)	اسکوپولامین برگ (mg/g)	اسکوپولامین ریشه (mg/g)
F_1N	٥٦c	١١/٩٧gh	٢١/٢٢c	١١/١٩f	٧٤٠٨c	٣٧/٨g	٢٤/٥f	٨/٦h	٠/١٦jk	١/٣d
F_2N	٥٦c	١٣/٠٥bcd	٢٢/٧٨b	١٢/٤٢b	٦٩٨٦d	٤٢/٥de	١٨/١j	٧/٥k	١٠/٤a	٠/٥٦i
F_3N	٥١d	١١/٣٢i	١٩/٨٦d	٩/٩٧h	٦١٢٨g	٤٤/٧b	٢٦/٥c	٨/٨g	١/٧e	٠/٨٢h
F_1S	٥١d	١٣/١٢bc	٢٠/٨٣c	١١/٤٢e	٨٠٢٧b	٣٦/٩g	٢٠/٤i	١١/٥a	٠/٣٦i	١/٧٦ab
F_2S	٦٤a	١٥/٣٣a	٢٠/٠٣d	١١/٨٩c	٦٣٣٢f	٤٤/٣bc	٢٧/٥a	٨/٧g	٠/٥٧h	٠/٤٨i
F_3S	٤٦f	١٢/٤٦efg	١٨/٨٣e	٩/٨٩h	٨٧٠١a	٤٤/٥bc	٢٥/٦d	٧/٨j	٣/٢٤c	١/٧٧a
F_1A	٣٦h	٨/٥١k	١٤/٩٧i	٧/٧٨k	٥٠٢٢j	٣٧/٤g	٢٣/٨g	١٠/٣b	١/٦٣f	٠/٨٨h
F_2A	٥٦c	١٢fgh	١٦/٠٦h	٨/٨١j	٦٦٠٤e	٤٦/٢a	٢١/١h	١٠/٤b	٠/٢١j	١/٢٨e
F_3A	٤٢g	١٢/٥٣efd	١٩/١٤e	٩/٨٦h	٧٣٩٧c	٤٣cde	١٣/٥l	٩/٢f	١/٣٢g	٠/٨١h
F_1SA	٥٧c	١٣/١٨bc	١٩/٨١d	١١/٦٧d	٧١٤٧d	٤١/٧ef	٢٦/٨b	١٠/٢c	٠/٠٣l	١/٤٧cd
F_2SA	٥٩b	١٣/٥b	١٧/٩٢f	٩/٦١i	٧٠٤٨d	٤٣/٥bcd	١٧/٩k	٨/٢i	٠/١١kl	١/٤٩c
F_3SA	٤٩e	١٢/٣٥efgh	٢١/٣٣c	١٠/٦٩g	٨٦٧٤a	٤٠/٦f	٤/٠٥n	٩/٤e	٥/٣b	١/٦٨b
F_1T	٣٧h	١٠/٦٥j	١٨/٧٥e	١٠/٥٣g	٥٦٤٠i	٣٨/٤g	٢٥/٤e	٩/٧d	٢/٣d	١/١٣f
F_2T	٤٧f	١٢/٧٤cde	١٧/١٩g	٩/٥٦i	٧٤٧٨c	٤٤/٩ab	٢٦/٩b	٩/٤e	٠/٠٣l	١/٠٦fg
F_3T	٤٢g	١١/٩١h	٢٣/٩٤a	١٢/٧٥a	٥٨٠٨h	٣٨/١g	١٣/٢m	٩/٣f	٠/٣١i	١/٠٤g

میانگین‌های دارای حروف مشترک مطابق آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

N: عدم تلقیح باکتری، S: باکتری سودوموناس، A: باکتری ازتوباکتر، SA: باکتری سودوموناس+ باکتری ازتوباکتر، T: باکتری تیوباسیلوس+گوگرد، F_1: عدم استفاده از کود شیمیایی، F_2: تیمار ۵۰٪ کود شیمیایی توصیه شده، F_3: تیمار ۱۰۰٪ کود شیمیایی توصیه شده

بحث

نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین میزان ارتفاع بوته و قطر ساقه مربوط به تیمار سودوموناس با ۵۰درصد کود شیمیایی توصیه شده بود (جدول ۵). سودوموناس با تأثیر بر روی سیستم ریشه سبب افزایش جذب آب و مواد غذایی در گیاه می‌شود، همچنین از طریق تولید هورمونهایی مانند جیبرلین که روی رشد طولی سلولها به ویژه میانگره‌های ساقه نقش دارد و یا اکسین و سیتوکنین که روی تقسیم سلولی نقش دارند، تاثیر گذاشته و در نتیجه سبب افزایش ارتفاع گیاه شده است. باکتری‌های محرک رشد بخصوص سودوموناس‌ها ممکن است از طریق مکانیسمهای دیگری همچون تولید آنزیم ACC دآمیناز یا افزایش فراهمی فسفر موجب تحریک رشد و افزایش ارتفاع و قطر بوته گیاهان شوند (Ehteshami et al., 2014). به‌هرحال ریزجانداران حل کننده فسفات موجب تحریک رشد و افزایش ارتفاع گیاه می‌شوند (Larsen et al., 2009). افزایش ارتفاع و قطر بوته‌های گندم در پاسخ به استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات نیز قبلا گزارش شده است (Ramezanian, 2005).

این تحقیق نشان داد که بیشترین طول و عرض برگ گیاه شابیزک مربوط به تیمار تیوباسیلوس + گوگرد با ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده می‌باشد (جدول ۵). تأثیر کاهش pH محیط و اسیدی شدن آن بر اثر استفاده از تیوباسیلوس و در نتیجه افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی گزارش شده‌است (Fallah et al., 2014). بنابراین افزایش طول و عرض برگ ممکن است ناشی از افزایش جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن به سبب تاثیر باکتری‌های تیوباسیلوس باشد. زیرا افزایش نیتروژن باعث افزایش پروتوپلاسم و تقسیم سلولی و در نتیجه اندازه سلول و سطح برگ شده و در نهایت با بالا رفتن فعالیت فتوسنتزی، رشد رویشی گیاه افزایش یافته است (Saikia et al., 2010). در مطالعه‌ای بر روی گیاه نعناع فلفلی مشخص شد که بیشترین میزان طول و عرض برگ در استفاده از تیمار تیوباسیلوس حاصل شده است (Kheiry et al., 2018).

بیشترین میزان عملکرد بیولوژیک (وزن خشک گیاه) نیز از تیمار سودوموناس با ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده حاصل گردید (جدول ۵). افزایش عملکرد بیولوژیک در گیاهان تحت تیمار باکتری سودوموناس عمدتاً ممکن است به دلیل تولید مواد تحریک کننده رشد گیاه مانند اکسین و سایتوکینین باشد که موجب توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه شده و در نتیجه گیاه توانسته از حجم بیشتری از خاک استفاده کند و موجب افزایش بازده جذب آب و مواد غذایی شده‌است (Alipour and Sobhanipour, 2012). در مطالعه‌ای، تلقیح گندم با باکتری سودوموناس تحت شرایط تنش محیطی موجب کاهش جذب یون‌های سمی، افزایش تولید هورمون اکسین و پروتئینهای مخصوص در گیاه شد و در نتیجه سبب تحریک رشد گیاه و افزایش عملکرد بیولوژیک گردید (Davoodifard et al., 2011).

در این آزمایش، بیشترین میزان سبزینگی برگ از تیمار ازتوباکتر با ۵۰ درصد کود شیمیایی توصیه شده بدست آمد (جدول ۵). از باکتری‌های موجود در کودهای زیستی می‌توان به ازتوباکتر به‌عنوان باکتری تثبیت کننده نیتروژن اشاره کرد که دارای میکروارگانیسم‌های مفید برای تامین مواد مغذی به ویژه نیتروژن است. بارزترین ویژگی آن نیز قابلیت تثبیت نیتروژن جو از طریق فرآیند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن است. علاوه بر این از طریق سنتز مواد محرک رشد گیاهی سبب بهبود رشد گیاه می‌شود. ازتوباکترها مواد مغذی خاص مانند کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد را از طریق تسریع معدنی شدن از بقایای آلی

خاک در دسترس گیاه قرار داده و از جذب فلزات سنگین نیز جلوگیری می‌کنند (Zhang et al., 2013).

نیتروژن به سبب تأثیر قابل توجهی که در تشکیل رنگدانه‌های فتوسنتزی فعال از طریق افزایش مقدار استروما و پروتئین تیلاکوئید در برگ دارد سبب افزایش میزان کلروفیل گیاهان می‌شود. همچنین اثرات مثبت منابع نیتروژن بر تشکیل کلروپلاست برگ نیز گزارش شده است (Hong et al., 2012). در تحقیقی نیز مشخص شد که تیمار تلقیح با ازتوباکتر به تنهایی و همچنین به صورت توأم با کود نیتروژن باعث افزایش معنی‌داری در غلظت کلروفیل برگها در گندم گردید (Haji Boland et al., 2013).

بیشترین میزان آتروپین ریشه از تیمار سودوموناس در عدم استفاده از کود شیمیایی و بیشترین میزان اسکوپولامین ریشه نیز از تیمار سودوموناس بعلاوه ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده حاصل گردید. بیشترین میزان آتروپین برگ از تیمار سودوموناس به همراه ۵۰درصد از کود شیمیایی توصیه شده و بیشترین میزان اسکوپولامین برگ نیز از تیمار عدم استفاده از کود زیستی به همراه ۵۰درصد از کود شیمیایی توصیه شده بدست آمد (جدول ۵). سنتز آتروپین و اسکوپولامین ابتدا در ریشه گیاه بوده و پس از تولید مقدار توجهی از آن به اندام هوایی گیاه منتقل شده و تجمع می‌یابد (Samanani and Facchini, 2006). این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم خود، نقش اساسی در رشد و فیزیولوژی گیاه بازی می‌کنند. این مکانیسم‌ها مانند افزایش انحلال عناصر غذایی کم‌محلول مانند فسفر، تولید ACC–دآمیناز، تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن)، ترشح هورمون‌های رشد از قبیل اکسین، سیتوکنین و جیبرلین می‌باشند که مراحل مختلف رشد گیاه یا آنزیم‌هایی که رشد و نمو گیاه را تنظیم می‌کنند تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. این نتایج در راستای گزارش بسیاری از محققان مبنی بر تأثیر مثبت باکتری‌های ریزوسفری روی شاخص‌های رشد گیاهان تحت تلقیح آنها می‌باشد (Glick et al., 2007). گزارش‌های متعددی از آثار مثبت سودوموناس بر عملکرد کتان، ذرت، گندم، جو، تنباکو و خردل وجود دارد که نشان داده این باکتری‌ها موجب افزایش تثبیت نیتروژن، افزایش جذب عناصری چون فسفر، پتاسیم و آهن، بهبود وضعیت آب گیاه و تولید فیتوهورمون‌ها در این گیاهان شده‌اند (Ehteshami et al., 2008).

نتیجه‌گیری نهایی

بطورکلی نتایج نشان داد که بیشترین عملکرد بیولوژیک مربوط به تیمارهای F_3S (کاربرد باکتری سودوموناس+ ۱۰۰درصد کود شیمیایی توصیه شده) و F_3SA (باکتری سودوموناس + ازتوباکتر و ۱۰۰ درصد کود شیمیایی) است. همچنین بیشترین میزان آتروپین برگ و ریشه و همچنین اسکوپولامین ریشه گیاه شابیزک با کاربرد باکتری سودوموناس حاصل شده‌است. با توجه به اینکه میزان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در برگ بسیار بیشتر از ریشه می‌باشد، نتایج نشان می‌دهد که بیشترین عملکرد بیولوژیک و فیتوشیمیایی از کاربرد سودوموناس حاصل شده است.

تشکر و قدردانی

از گروه محترم پژوهشی کشت و توسعه گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی که تجهیزات و امکانات لازم را در اجرای انجام این تحقیق و پژوهش فراهم آوردند تشکر می‌گردد.

References

1. Abdul-Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007. *Pseudomonase fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces, 60: 7-11.
2. Alipour, Z.T. and Sobhanipour, A. 2012. The Effect of *Thiobacillus* and Pseudomonas fluorescens inoculation on maize growth and Fe uptake. Annals of Biological Research, 3: 1661-1666.
3. Davoodifard, M., Habibi, D., Paknejad, F., fazeli, F. and Farhanipad F. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and foliar application of amino acids and silicic acid on antioxidant enzyme activity of wheat under drought stress. Journal of Agriculture and Plant Breeding, 4: 11-36.
4. Doroudian, H.R., BesharatiKelayeh, H., FallahNosrat Abad, A.R., Heidary Sharif Abadi, H., Darvish, F. and Allahverdi, A. 2010. Study of absorbable *phosphorus* changes in lime soils and its impact on corn yield. Agricultural Modern Knowledge (Modern Knowledge of Sustainable Agriculture), 6(18): 27-35.
5. Ehteshami, S.M.R., AghaAlikhani, M., Khavazi, K. and Chaichi, M.R. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms on quantitative and qualitative of corn under water deficit stress. Iranian Journal of Crop Science, 40(1): 15-27.
6. Ehteshami, S.M., Kashani, M. and Yousefi Rad, M. 2014. Effect of Seed inoculation with *Pseudomonas* and *Azotobacter* bacteria on quantitative and qualitative yield of two sesame cultivars. Iranian Journal of Seed Science and Research, 3(3): 47-57.
7. Ehteshami, S.M., Agha Alikhani, R.M., Chaichi, M.R. and Khavazi, K. 2008. Effect of biological phosphate fertilizer on qualitative and quantitative properties of maize (*Zea mays L.*)(SC 704) in the water deficit stress condition. Iranian Journal of Field Crops Research, 40(1): 15-26.
8. Emam, Y. 2007. Cereal production. 3rd edition. Shiraz University Press, 190 P.
9. Facchini, P.J. and De Luca, V. 1995. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. The Plant Cell, 7(11): 1811-1821.
10. Fallah Nosratabad, A., Momeni, S. and Shariati, S. 2015. The effect of bio-fertilizers and nitrogen on yield and yield components of wheat in greenhouse condition. Journal ofAgricultural Engineering, 37(2): 73-86.
11. Fallah, A., Besharati, H. and Khosravi, H. 2009. Soil Microbiology. 2nd edition. Abizh press: Tehran, Iran, 136 P.
12. Frick, S., Chitty, J.A., Kramell, R., Schmidt, J., Allen, R.S., Larkin, P.L. and Kutchan, T.M. 2004. 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 Research, 13: 607-613.
13. Ghahreman, A. 1994. Plant Systematics: Chromophytes of Iran. Volume 3. Iran University Press, 775 P.
14. Glick, B.R., Todorovic, B., Czamy, J., Cheng, Z., Duan, J. and McConkey, B. 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences, 26: 227-242.
15. Haji Boland, R., Aliasgharzadeh, N. and Mehrfar, Z. 2013. Ecological study of *Azotobacter* in two Zrbayhan Highland region and its effect on growth and mineral nutrition of plants inoculated wheat. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2(8): 75-89.
16. Han, H., Supanjani, S. and lee, K.D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium soluble bacteria on mineral uptake and growth of popper and cucumber. Plant Soil and Environment, 52: 130-137.

17. Hong, L., Li, M., Luo, J., Cao, X., Qu, L., Gai, Y., Jiang, X., Liu, T., Janz, H., Bai, D., Polle, A., Peng, C. and Luo, Z.B. 2012. N fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fast-growing Populus species. Journal of experimental botany, 63: 6173-6185.
18. Kheiry, A., Babakhani, R., Sanikhani, M. and Razavi, F. 2018. Effects of Nitroxine and Thiobacillus biofertilizers on morphological and phytochemical properties of *Mentha pipertita* L. Journal of Plant Ecophysiology, 10(33): 34-42.
19. Larsen, J., Cornejo, P. and Míguel Barea, J. 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P.macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. Soil Biology and Biochemistry, 41: 286-292.
20. Sarker, S.D., Latif, Z. and Gray, A.I. 2006. Natural Product Isolation. Humana Press: Totowa, New Jersy, USA, 507 P.
21. Mohammedvarzi, R. 2010. The effect of microbial fertilizers (Nitroxin and Biospher) and nitrogen on the qualitative and quantitative characteristics of sunflower, MSc. Thesis, Islamic Azad University of Karaj, Iran.
22. Navasi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Rezazadeh, S., Mustafavi, S. and Ghorbanpour, M. 2019. A Comprehensive Overview on Valuable Tropane Alkaloids: Scopolamine, Atropine, and Hyoscyamine. Journal of Medicinal Plants, 2(70): 21-44.
23. Noorhosseini, S.A., Fallahi, E., Samizadeh, M. and Beheshtipoor, N. 2017. The relative priority of medicinal plants, herbal and chemical medicines by consumers based on economic and treatment criteria: Case study of Rasht district. Journal of Agricultural Economics Research, 9: 71-99.
24. Omidbeigi, R. 2015. Production and processing of medicinal plants. Volume 1. Astan Ghods Razavi press, Mashhad, Iran, 348 P.
25. Ramezanian, A. 2005. Role of reproducer ACC deaminase enzyme rhizobium bacteria on moderation the adverse effect of ethylene stress in wheat. M.Sc. Thesis in soil science, University of Tehran.
26. Ravichandra, P., Gopal Mugeraya, A., Gangagni Rao, M., Ramakrishna, V. and Annapurna Jetty, Y. 2007. Isolation of *Thiobacillus* sp. from aerobic sludge of distillery and dairy effluent treatment plants and its sulfide oxidation activity at different concentrations. Journal of Environmental Biology, 28(4): 819-823.
27. Saikia, S.P., Dutta, S.P., Goswami, A., Bhau, B.S. and Kanjilal, P.B. 2010. Role of *Azospirillum* in the improvement of legumes. Microbes for Legume Improvement, 389-408.
28. Samanani, N. and Facchini, P.J. 2006. Compartmentalization of plant secondary metabolism. In: Romeo, J.T. (ed) Recent advances in phytochemistry, vol 40. Elsiever Ltd., Amsterdam, 54 P.
29. Wu, S.C., Caob, Z.H., Lib, Z.G., Cheunga, K.C. and Wong, M.H. 2005. Effects of biofertolizer containing N-fixer, P and Ksolubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma, 125: 155-166.
30. Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Alikhani, H.A. and Aliasgharzadeh, N. 2006. Responses of lentil to co-Inoculation with phosphate-solubilizing rhizobial strains and arbuscular mycorrhizal fungi. Journal Plant Nutrition, 29: 1509-1522.
31. Zhang, W., Franco, C., Curtin, C. and Conn, S. 2004. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5: 264-271.
32. Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q. and Zhang, R. 2013. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere - associated bacterial strains. Plant and Soil, 374: 689-700.

Study on Changes of Atropine and Scopolamine Content and Growth Characteristics of *Atropa belladonna* L. affected by Bio-fertilizers and Chemical-fertilizers

Inanloo Far, M.[1], Heidari, M.[2], Naghdi Badi H.[3*], Tolyat Abulhassani, S.M.[4], Makarian, H.[2], Amerian, M.R.[2]

[1]Ph.D. student., Department of Plant Physiology, Faculty of Agronomy, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
[2]Associate Prof., Faculty of Agronomy, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
[3]Associate Prof., Medicinal Plants Research Centre, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.
[4] Assistant Prof., Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.

Received: 2019-8-9 ; Accepted: 2019-12-16

Abstract

Nowadays, the use of Plant Growth Promoting Rhizobacter (PGPR) as a biofertilizers is one of the ways to improve growth and phytochemical characteristics of medicinal plants. This study was carried out as a factorial experiment based on randomized complete block design with a randomized complete block design with 3 replications in the research farm of the Institute of Medicinal Plants - ACECR in 2017.The growth-promoting bacteria as a first factor were non-inoculation, Pseudomonas, Azotobacter, Pseudomonas + Azotobacter, and Thiobacillus + Sulfur. The chemical fertilizers as a second factor were no fertilizer or control, 50% recommended fertilizer and 100% recommended fertilizer. At flowering stage, the alkaloids were extracted by using chloroform, methanol and ammonia solvents. The amount of atropine and scopolamine was measured by High-performance liquid chromatography (HPLC). The biological and chemical fertilizers, as well as their interaction effect had significant effect ($p<0.01$) on growth traits, atropine and scopolamine content of leaf and root. The maximum biological yield was observed in Pseudomonas with 100% of recommended fertilizer. The highest amount of leaves atropine and scopolamine was related to Pseudomonas with 50% fertilizer and non-biofertilizer treatment with 50% recommended fertilizer, respectively. The highest amount of root atropine was related to Pseudomonas without chemical fertilizer application. The highest content of root scopolamine was observed in treatment of Pseudomonas with 100% recommended. Therefore, the highest biological yield and the amount of atropine in leaves and roots, as well as the scopolamine content of the root were obtained using Pseudomonas application.

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

*Corresponding author; naghdibadi@yahoo.com