

بررسی تغییرات محتوی و عملکرد تروپان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) تحت تاثیر باکتری‌های ریزوسفری سودومونادس و تنش کم آبی

منصور قربانپور^{۱*}، ناصر مجنون‌حسینی^۲، شمسعلی رضازاده^۳، منصور امیدي^۲، کاظم خاوازی^۴، مهرناز حاتمی^۵

۱- استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران

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

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، موسسه خاک و آب، کرج

۵- دانشجوی دکترای باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

*آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهان دارویی،

کدپستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

پست الکترونیک: m_ghorbanpour@Araku.ac.ir ، m_ghorbanpour@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۱

چکیده

مقدمه: علاوه بر نقش عوامل فیزیکی از قبیل تنش‌های اسمزی در تولید ترکیبات ثانویه، مسیرهای خاص ساخت این متابولیت‌ها با تلقیح میکروارگانیسم‌ها نیز تحریک می‌شود.

هدف: هدف این مطالعه، بررسی اثرات محرک رشدی سویه‌های فلورسنس و پوتیدا به همراه تنش کم آبی روی رشد ریشه‌ها و افزایش محتوی و عملکرد هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذرالبنج می‌باشد.

روش بررسی: ۲ گرم از ماده خشک گیاهی با ترکیب کلروفرم- متانول- آمونیاک ۲۵ درصد به نسبت ۱: ۵: ۱۵ و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال به آن اضافه و کاملاً هم زده شد. پس از استخراج آلکالوئیدها، نمونه حاصل قبل از آنالیز با دستگاه GC در ۱ میلی‌لیتر متانول HPLC حل شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیشترین مقادیر محتوی آلکالوئید در ریشه (هیوسیامین: ۰/۲۶ درصد ماده خشک و اسکوپولامین: ۰/۱۲ درصد) و شاخساره (هیوسیامین: ۰/۸۵ درصد و اسکوپولامین: ۰/۴۸ درصد) در گیاهان تحت تیمار فلورسنس در شرایط تنش شدید کم آبی (تخلیه ۹۰ درصد رطوبت مزرعه) به دست آمد. در مقابل، حداکثر عملکرد آلکالوئیدها در ریشه (هیوسیامین: ۱/۹۲ میلی‌گرم در گیاه و اسکوپولامین: ۰/۸۳ میلی‌گرم در گیاه) و شاخساره (هیوسیامین: ۵/۸۸ میلی‌گرم در گیاه و اسکوپولامین: ۳/۰۶ میلی‌گرم در گیاه) در گیاهان تحت تیمار پوتیدا در شرایط تنش خفیف کم آبی (تخلیه ۳۰ درصد رطوبت مزرعه) حاصل شد.

نتیجه‌گیری: باکتری‌های ریزوسفری با تولید هورمون‌های رشد به عنوان محرک در سنتز تروپان آلکالوئیدها عمل می‌کنند که در نتیجه آن محتوی و عملکرد آلکالوئیدها افزایش پیدا می‌کند.

کل واژگان: بذرالبنج، تروپان آلکالوئیدها، هیوسیامین، اسکوپولامین، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد، تنش کم آبی



مقدمه

اقتصادی به نظر می‌رسد. تاکنون محرک‌های زیادی از قبیل تنش‌های محیطی و غیره به منظور دستیابی سریع به آکالوئیدها گزارش شده است. اگر چه این تنش‌ها، رشد و نمو گیاهان زراعی را به طور معکوس تحت تاثیر قرار می‌دهند اما محتوی متابولیت‌ها اکثراً از طریق اثرات مثبتی که تنش‌ها روی مسیرهای متابولیسی ساخت ترکیبات موثره گیاهان دارویی دارند افزایش می‌یابد [۷]. همچنین تلقیح گیاهان با میکروارگانسیم‌ها مانند باکتری‌های ریزوسفری مسیرهای خاص متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌کنند [۸]. این باکتری‌ها می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی به طور مستقیم در افزایش رشد و عملکرد گیاه ایفای نقش کنند. افزایش انحلال عناصر غذایی کم محلول مانند فسفر، تولید ACC - دآمیناز، تولید هورمون‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور از مهم‌ترین مکانیسم‌های مورد استفاده در این روش می‌باشند. در سال‌های اخیر، بسیاری از آزمایش‌ها روی نقش میکروبی و همزیستی قارچ‌های میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد تحت شرایط تنش خشکی در برخی گیاهان زراعی انجام شده است [۹]، اما مطالعه جامعی که اثرات این باکتری‌ها را تحت تنش کم آبی روی گیاهان دارویی و تولید متابولیت‌های ثانویه نشان دهد انجام نشده است. پیشینه تحقیق نشان می‌دهد که در اکثر مطالعات انجام شده، عملکرد متابولیت‌های ثانویه تحت تیمارهای مربوطه مورد توجه قرار نگرفته و صرفاً محتوی و غلظت این متابولیت‌ها در یک اندام خاص بررسی شده است. از آنجا که یکی از مشکلات اساسی صنعت داروسازی ایران تهیه مواد اولیه مورد نیاز این صنعت می‌باشد، تحقیق روی مواد موثره موجود در گیاهان دارویی بومی کشور و افزایش مقدار آنها کمک ارزنده‌ای در رسیدن به خودکفایی دارویی است. هدف این مطالعه بررسی اثرات محرک رشدی سویه‌های فلورسنس و پوتیدا (محرک‌های بیولوژیک) به همراه تنش کم آبی (محرک فیزیکی) روی رشد و افزایش محتوی و عملکرد آکالوئیدهای هیوسامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذربنچ می‌باشد.

گیاه بذربنچ (*Hyoscyamus niger*) از تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) گیاهی دارویی است که از نظر وجود آکالوئیدهای تروپان اهمیت به سزایی دارد. هیوسامین و اسکوپولامین دو آکالوئید اصلی تروپان در گیاهان خانواده سیب‌زمینی هستند [۱]. دایره محیطیه در ریشه‌های جوان و ریشه‌هایی که فاقد رشد ثانویه هستند مکان بیوستیزی این تروپان آکالوئیدها بوده و آنزیم‌های عمده مسیر ساخت آنها در این محل قرار دارند [۲]. مقدار زیادی از این تروپان آکالوئیدها پس از سنتز به اندام‌های هوایی منتقل و در واکوئل بافت‌های مختلف متمرکز می‌شوند [۳]. تروپان آکالوئیدهای هیوسامین و اسکوپولامین ترکیباتی با خاصیت پاراسمپاتولیتیک می‌باشند و به طور گسترده در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴]. از این ترکیبات برخی داروهای مهم از قبیل اسکوپولامین هیدروبرمید و هیوسامین سولفات که داروهای آنتی اسپاسمودیک، آنتی‌کلینژیک و مسکن هستند تولید شده است. سنتز صنعتی این ترکیبات به دلیل ساختمان شیمیایی پیچیده آنها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و این ترکیبات هنوز از برخی گیاهان متعلق به تیره سیب‌زمینی از قبیل شایبک، داتوره و سایر تیره‌های گیاهی مانند شب بو استخراج می‌شوند [۵]. تحقیقات بسیار زیادی در زمینه تولید درون شیشه‌ای آکالوئیدها و نیز مهندسی متابولیک آنها به منظور دستیابی به لاین‌های سلولی پر بازده (تولید اسکوپولامین بیشتر) در طی سال‌های گذشته صورت گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داده که میزان تولید تروپان آکالوئیدها در کشت سلول‌های تمایز نیافته (کشت کالوس و سوسپانسون سلولی) در گیاهان مختلف تیره سیب‌زمینی بسیار ناچیز بوده و یا مواد مذکور در این کشت‌ها اصلاً تولید نمی‌شود [۶]. امروزه تلاش‌های زیادی در زمینه کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های موئین گیاهان مذکور به منظور تولید تروپان آکالوئیدها انجام می‌شود ولی متأسفانه تلاش‌های مذکور هنوز به نقطه عطف اقتصادی مطلوب نرسیده است. بنابراین هنوز هم تولید این متابولیت‌ها در سطح وسیع و گیاه کامل تنها روش موفق و



مواد و روش‌ها

آماده سازی و جوانه زنی بذر

بذر گیاه بذرالبنج از مزرعه کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان فراهم شد. بذر این گیاه تحت شرایط طبیعی، جوانه زنی کم و غیریکنواختی دارد، بنابراین به منظور شکست خواب بذر، تسریع در جوانه زنی و همچنین داشتن درصد سبز یکنواخت، بذرها در دمای اتاق (25 ± 0.5) تحت تیمار اسید جیبرلیک (250 میلی گرم در لیتر به مدت 48 ساعت) قرار داده شدند. سپس بذرها به مدت 2 دقیقه با اتانول 70 درصد و 10 دقیقه با سفید کننده شیمیایی 25 درصد که حاوی 6 درصد هیپوکلریت سدیم بود استریل سطحی شدند. بذرها درون ظروف آزمایشگاهی پوشیده با دو لایه کاغذ صافی (شماره ۱) و مرطوب کشت شدند، بذرها بعد از 3 روز بیش از 90 درصد جوانه زنی داشتند و زمانی که طول ریشه چه به 1 تا 2 میلی متر رسید با سوپانسیون مایه تلقیح باکتری‌ها تیمار شدند.

سویه‌های باکتری و شرایط رشد

دو سویه سودوموناس فلورسنس 187 و پوتیدا 168 با خصوصیات محرک رشدی متفاوت انتخاب شدند (جدول شماره ۱). برای تهیه مایه تلقیح از این سویه‌ها، یک لوپ از هر سویه باکتری برداشته شد و به طور اسپتیک به ظروف 100 میلی‌لیتری حاوی 50 میلی‌لیتر محیط مایع (Tryptone Soybean Broth) (TSB) انتقال داده شد. سپس این ظروف روی شیکر با دور 120 و دمای 28 درجه قرار داده شدند. پس از 72 ساعت رشد باکتری‌ها در این محیط مایه تلقیح سویه‌ها آماده مصرف بودند. علاوه بر این، ظروف تلقیح نشده نیز در همان شرایط قرار داده شدند و از آنها به عنوان شاهد استفاده شد. در این آزمایش، ریشه‌چه‌ها به میزان 500 میکرولیتر از سوپانسیون مایه تلقیح سویه‌های مربوطه تیمار شدند.

آزمایش گلخانه‌ای

سوپانسیون مایه تلقیح باکتری‌ها با استفاده از سرنگ و به میزان 500 میکرولیتر برای هر گیاهچه، روی ریشه‌چه‌ها و

اطراف بستر کشت گیاهچه‌ها در گلدان (حفره‌های به عمق 1 سانتی‌متر) اعمال شد. بعد از تلقیح، دو گیاهچه درون گلدان‌های پلاستیکی (15×20 سانتی‌متر، حاوی 4 کیلوگرم خاک) کشت شدند. بعد از 45 روز پس از کشت گیاهان به مدت 45 روز نیز در معرض تنش کم آبی قرار گرفتند. میزان رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای (Field Capacity) با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Pressure Plate Apparatus) تعیین شد ($12/5$ درصد). برای اعمال تیمارهای تنش کم آبی، ابتدا وزن گلدان‌ها در حد رطوبت ظرفیت مزرعه و همچنین سطوح مختلف مصرف آب قابل استفاده خاک محاسبه و سپس تمام گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند تا به حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای رسیدند. پس از این مرحله و با توزین روزانه گلدان‌ها، مقدار آب مصرفی آنها محاسبه و پس از رسیدن رطوبت به حد مجاز تعیین شد. در هر تیمار، آبیاری گلدان برای رسیدن به حد ظرفیت مزرعه انجام گرفت. برای جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان‌ها توسط یونولیت پلاستیکی سفید رنگ پوشیده شد. پس از 90 روز از کشت، گیاهان برداشت و نمونه‌برداری‌های مربوطه انجام شد. این تحقیق بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو عامل تنش کم آبی در 3 سطح (30 ، 60 و 90 درصد تخلیه رطوبت از حد ظرفیت مزرعه‌ای) و 2 سویه سودوموناس به همراه تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) در سه تکرار به اجرا در آمد. تمام گلدان‌ها پس از کشت و قبل از اعمال تنش کم آبی در حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای تا 45 روز حفظ شدند.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه

ریشه

نیمی از کل گلدان‌ها در مرحله رشد رویشی، پس از 45 روز اعمال تنش کم آبی یعنی 90 روز پس از کشت برداشت شدند. (بقیه گلدان‌ها جهت بهاره‌سازی گیاهان و بررسی تیمارها در مرحله گلدهی، به مدت 30 روز به سردخانه 4 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند). بوته‌های برداشت شده، به بخش‌های ریشه و شاخساره جدا و ریشه پس از شستشوی کامل به دو قسمت ریشه‌های ظریف (با



جدول شماره ۱- برخی از خصوصیات محرک رشدی سویه‌های پوتندا ۱۶۸ و فلورسنس ۱۸۷ (بانک میکروبی موسسه خاک و آب)

ویژگی‌های محرک رشدی سویه‌های باکتری				حل کنندگی فسفات	منشای اکولوژیکی جداسازی سویه‌ها *	سویه‌های باکتری
تولید HCN	تولید اکسین (mg/l)	تولید سیدروفور (قطر هاله به کلونی)	فعالیت آنزیم ACC دی آمیناز			
نسبتاً زیاد	۱۷/۹۲۱	۲/۲۵	-	-	ریزوسفر گندم رقم گاسکوژن	پوتیدا - ۱۶۸
-	۵/۱۵۲	۱/۵۵	-	+	ریزوسفر گندم رقم آذر	فلورسنس - ۱۸۷

* رقم گاسکوژن یک رقم پاییزه و پا کوتاه بوده که به صورت آبی در مناطق سردسیر کشت می‌شود در حالی که رقم آذر یک رقم پاییزه و مقاوم به خشکی است که به صورت دیم در مناطق سردسیر و معتدل کشت می‌شود. (- و + به ترتیب فاقد و دارای ویژگی محرک رشدی).

میلی لیتر کلروفورم شستشو شد. فاز کلروفومی به کمک دستگاه تبخیر کننده دوار خشک شد. سپس ۲۵ میلی لیتر کلروفورم و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال به آن اضافه و کاملاً به هم زده شد. بعد فاز کلروفومی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوئیدها تا ۱۱ - ۱۰ pH با محلول آمونیاک ۲۵ درصد تنظیم شد. آلکالوئیدها یک بار با ۲۵ میلی لیتر و دو بار با ۱۰ میلی لیتر کلروفورم استخراج شدند. محلول حاصل با سدیم سولفات انیدر آگیری و صاف شد. روی صافی با ۲۰ - ۱۰ میلی لیتر کلروفورم شستشو و نمونه حاصل قبل از آنالیز با دستگاه GC در ۲ - ۱ میلی لیتر متانول HPLC حل شد. آلکالوئیدهای استخراج شده پس از آماده سازی به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC تزریق شدند تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آنها مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Acme 6000 GC با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5 MS بود. برنامه دمایی ستون شامل: دمای ابتدایی ۵۰ درجه سانتی گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد و سه دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاق تزریق ۲۹۰ درجه سانتی گراد، و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. شناسایی آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین بر اساس مقایسه زمان بازداری (Retention Time) دستگاه GC با داده‌های طیف جرمی (Mass Spectra) و استانداردهای مربوطه آنها انجام شد.

قطر مساوی و کمتر از ۱ میلی متر) و ضخیم (با قطر بیشتر از ۱ میلی متر) تقسیم و وزن تر و خشک آنها اندازه گیری شد.

تعداد و سطح برگ

بخش شاخساره به دو قسمت برگ‌های طوقه‌ای و دم‌برگ جدا شدند. پس از شمارش تعداد برگ‌ها، سطح آنها با دستگاه نوری اندازه‌گیری سطح برگ (LICOR Photoelectric Area Meter) تعیین شد.

برداشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های ریشه و شاخساره بلافاصله پس از برداشت در سایه در معرض خشک شدن قرار گرفتند. عمل خشک کردن باید تا زمان تسهیل در پودر شدن گیاه ادامه یابد. رطوبت اندام‌ها در این حالت حدود ۲ درصد است. پس از پودر کردن مواد گیاهی با آسیاب برقی، جهت الک کردن آن از توری (Mesh) آزمایشگاه (اندازه ۳۰ و قطر منافذ ۵۴۵ میکرومتر) استفاده شد.

استخراج و آنالیز آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئیدها به روش اختصاصی و به وسیله حلال‌های مختلفی انجام شد [۱۰]. در این روش ۲ گرم از ماده خشک گیاهی با ترکیب کلروفورم- متانول- آمونیاک ۲۵ درصد به نسبت ۱: ۵: ۱۵ و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض اولتراسونیک قرار گرفت. سپس نمونه به حمام آب گرم (۴۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۱ ساعت انتقال داده شد. عصاره حاصل، از کاغذ صافی عبور داده شد و روی صافی دو بار با ۱۰



عملکرد آلكالويدها با توجه به محتوي آنها و توليد بيوماس گياهي از رابطه زير به دست آمد.

(ميلي گرم) وزن خشك \times (درصد ماده خشك) محتوي آلكالوييد = (ميلي گرم در گياه) عملکرد آلكالوييد

روش تجزيه و تحليل اطلاعات و محاسبات آماری

برای تجزيه و تحليل داده‌های آماری حاصل از اندازه‌گيري صفات، تعيين انحراف استاندارد ($\pm SD$) و همچنين ضرايب همبستگي بين صفات مورد بررسی از نرم‌افزار SAS و MSTAT-C استفاده شد. مقايسات ميانگين صفات موردنظر به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج

توليد ماده خشك گياهي (بيوماس ريشه و شاخساره)

نتایج تجزيه واريانس نشان داد که پارامترهای رشد به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کم آبی و باکتری‌های سودوموناس قرار گرفتند. وزن خشك کل شاخساره (برگ + دم‌برگ) در شرایط تنش خفيف (W1) به طور معنی‌داری با تیمار سويه‌های پوتيدا (۳۳ درصد) و فلورسنس (۲۵ درصد) در مقايسه با تیمار بدون تلقیح باکتری (C) در همان شرایط رطوبتي (W1) افزایش یافت (جدول شماره ۲). این شاخص تحت شرایط تنش متوسط (W2) نیز با تیمار پوتيدا (۵۳ درصد) و فلورسنس (۶۰ درصد) در مقايسه با تیمار شاهد در شرایط رطوبتي مربوطه زیاد شد. در شرایط تنش شديد (W3) وزن خشك کل شاخساره در تیمارهای پوتيدا و فلورسنس به ترتیب ۶۲ و ۸۳ درصد در مقايسه با تیمار بدون تلقیح در همان شرایط رطوبتي افزایش یافت. وزن خشك کل شاخساره به طور معنی‌داری با افزایش سطوح تنش کاهش یافت. درصد کاهش در گیاهان تلقیح نشده (۴۸ درصد) در مقايسه با تیمارهای پوتيدا (۳۶ درصد) و فلورسنس (۲۳ درصد) خیلی محسوس و قابل توجه بود (جدول شماره ۲). وزن خشك کل ریشه (ریشه‌های ظريف + ریشه‌های

ضخيم) در گیاهان تحت تیمار پوتيدا و فلورسنس در همه تیمارهای تنش کم آبی به طور معنی‌داری بیشتر از وزن خشك کل شاخساره بود در حالی که این روند در گیاهان شاهد بدون تلقیح باکتری‌ها مشاهده نشد. استفاده از سويه‌های باکتری محرک رشد، اثرات منفي تمام سطوح تنش کم آبی روی گیاه را کاهش داد (جدول شماره ۲). نقش سودوموناس پوتيدا در تحريك رشد شاخساره در شرایط تنش کم آبی خفيف بسيار برجسته تر به نظر می‌رسد. در صورتی که در شرایط تنش شديد، حداکثر افزایش وزن خشك شاخساره در تیمار سودوموناس فلورسنس به دست آمد. در این شرایط (تنش شديد کم آبی، W3) تعداد برگ در گیاهان تحت تیمار فلورسنس به اندازه ۳۸/۵ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود و به همین دلیل وزن خشك شاخساره در این تیمار افزایش ۱/۸۳ برابری داشت. تنش کم آبی همچنین باعث کاهش وزن خشك ریشه شد اما نسبت ریشه به شاخساره را افزایش داد. تلقیح سويه‌های پوتيدا و فلورسنس در شرایط تنش کم آبی باعث افزایش معنی‌داری در رشد ریشه در مقايسه با تیمار بدون تلقیح باکتری شد. در شرایط حداکثر رطوبتي (W1) تیمار پوتيدا و فلورسنس در مقايسه با تیمار شاهد به ترتیب باعث افزایش ۵۸ درصد و ۵۱ درصد وزن خشك ریشه شد. در شرایط تنش شديد، تیمار پوتيدا و فلورسنس به ترتیب باعث افزایش ۹۲ درصد و ۱۱۵ درصد وزن ریشه در مقايسه با تیمار بدون تلقیح باکتری شد.

تغییرات معنی‌داری در وزن خشك ریشه‌های ظريف و ضخيم در ارتباط با تیمارهای مختلف مشاهده شد (جدول شماره ۲). وزن خشك ریشه‌های ظريف و ضخيم تحت تیمار تنش کم آبی کاهش یافت. تنش شديد در مقايسه با تنش خفيف برای ریشه‌های ظريف مضرتر بود. به عبارت دیگر وزن ریشه‌های با قطر کمتر از ۱ ميلي‌متر کاهش شديدتری (۵۳/۹ درصد) نسبت به ریشه‌های ضخيم (۳۴/۹ درصد) در گیاهان بدون تلقیح باکتری داشت. تلقیح سودوموناس‌های پوتيدا و فلورسنس اثر منفي تنش کم آبی روی رشد ریشه را تخفيف داد. درصد کاهش وزن ریشه‌های ظريف در تیمار پوتيدا و فلورسنس در شرایط تنش شديد در مقايسه با تنش خفيف به



جدول شماره ۲- میانگین اثرات متقابل تنش کم آبی و سودوموناس‌ها بر روی وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه بذرابنج (انحراف معیار \pm میانگین مربعات)

تیمار	وزن خشک (گرم در گیاه)			وزن خشک (گرم در گیاه)		
	برگ	دمبرگ	کل شاخساره	ریشه‌های ظریف	ریشه‌های ضخیم	کل ریشه
سودوموناس PP	۵/۳۴±۰/۱۰	۱/۷۳±۰/۰۴	۷/۰۷±۰/۱۴۰	۲/۷۴±۰/۱۴۰	۵/۱۷±۰/۱۶۹	۷/۹۰±۰/۳۰۸
تنش کم آبی W1	۵/۰۶±۰/۱۱	۱/۵۷±۰/۰۲	۶/۶۳±۰/۱۳۶	۲/۵۶±۰/۱۲۷	۴/۹۹±۰/۱۵۱	۷/۵۵±۰/۲۷۷
شاهد	۴/۰۷±۰/۱۳	۱/۲۳±۰/۱۱	۵/۳۰±۰/۲۳۴	۱/۶۳±۰/۲۴۸	۳/۳۵±۰/۳۲۰	۴/۹۸±۰/۵۵۶
سودوموناس PP	۴/۱۰±۰/۰۹	۱/۴۱±۰/۰۷	۵/۵۲±۰/۰۹۲	۲/۱۴±۰/۱۰۰	۴/۱۶±۰/۱۶۱	۶/۲۹±۰/۲۶۰
تنش کم آبی W2	۴/۲۹±۰/۰۵	۱/۴۶±۰/۰۳	۵/۷۵±۰/۰۸۵	۲/۳۲±۰/۱۱۳	۴/۵۸±۰/۱۱۷	۶/۹۰±۰/۲۳۰
شاهد	۲/۶۴±۰/۰۹	۰/۹۵±۰/۱۰	۳/۵۹±۰/۱۶۶	۰/۹۸±۰/۰۵۵	۲/۶۲±۰/۲۵۱	۳/۶۰±۰/۲۳۸
سودوموناس PP	۳/۴۷±۰/۱۷	۰/۹۹±۰/۰۳	۴/۴۶±۰/۱۴۰	۱/۷۸±۰/۰۹۲	۳/۸۷±۰/۰۹۱	۵/۶۵±۰/۱۰۹
تنش کم آبی W3	۳/۹۰±۰/۰۵	۱/۱۵±۰/۱۱	۵/۰۴±۰/۰۶۱	۲/۱۰±۰/۱۰۸	۴/۲۱±۰/۱۳۵	۶/۳۱±۰/۲۴۲
شاهد	۲/۰۹±۰/۰۸	۰/۶۶±۰/۱۱	۲/۷۵±۰/۱۶۴	۰/۷۵±۰/۰۵۵	۲/۱۸±۰/۱۹۰	۲/۹۳±۰/۱۹۹

W1، W2 و W3 به ترتیب تنش کم آبی تا تخلیه ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد رطوبت مزرعه‌ای
PP: *Pseudomonas putida* - ۱۶۸ و PF: *Pseudomonas fluorescence* - ۱۸۷

فلورسنس در شرایط تنش شدید مشاهده شده است. به عبارت دیگر با استفاده از تیمار فلورسنس در مقایسه با تیمار بدون تلقیح در شرایط تنش خفیف و تنش شدید محتوی اسکوپولامین شاخساره به ترتیب باعث افزایش ۳۵/۵ درصد و ۲۷/۳ درصد شد (جدول شماره ۳). عملکرد آلکالوئیدهای (هیوسیامین و اسکوپولامین) ریشه و شاخساره با افزایش تنش کم آبی تحت تیمارهای پوتیدا، فلورسنس و شاهد کاهش یافت (جدول شماره ۴). کاربرد سویه‌های سودوموناس در مقایسه با شاهد تا حدودی اثرات مضر تنش کم آبی روی رشد گیاه را تعدیل و پارامترهای رشد را تحت تنش کم آبی بهبود بخشید و باعث افزایش عملکرد آلکالوئیدها شد. میزان کاهش عملکرد کل آلکالوئیدهای (هیوسیامین + اسکوپولامین) ریشه در تیمار بدون تلقیح در مقایسه با تیمارهای پوتیدا و فلورسنس در شرایط تنش شدید به ترتیب ۲/۵ و ۳ برابر بود.

عملکرد آلکالوئیدهای (هیوسیامین + اسکوپولامین) شاخساره در گیاهان تحت تیمار پوتیدا در شرایط تنش خفیف و متوسط به ترتیب ۱/۷۵ و ۱/۹۳ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بدون تلقیح بود. بیشترین عملکرد آلکالوئیدهای ریشه، شاخساره و کل گیاه در تیمار پوتیدا و در شرایط تنش خفیف حاصل شد. نتایج نشان داد که تیمار پوتیدا ۱۶۸ یک سویه برتر در شرایط تنش کم آبی خفیف بوده در حالی که سویه

ترتیب ۳۵ و ۱۷/۹ درصد به دست آمد. در مورد ریشه‌های ضخیم، درصد این کاهش در تیمار پوتیدا و فلورسنس در شرایط تنش شدید در مقایسه با تنش خفیف به ترتیب ۲۵ درصد و ۱۵/۶ درصد شد. افزایش وزن خشک ریشه‌های ظریف در گیاهان تحت تیمار پوتیدا در مقایسه با گیاهان شاهد در شرایط تنش خفیف ۶۸ درصد برآورد شد.

تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره

اگر چه محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کم آبی و سویه‌های سودوموناس قرار گرفت، اما اثرات متقابل آنها از نظر آماری معنی‌دار نبود، در حالی که اثر متقابل تنش کم آبی و باکتری‌ها روی عملکرد آلکالوئیدهای ریشه و شاخساره معنی‌دار بود. محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه تحت شرایط تنش شدید در تیمار بدون تلقیح باکتری در مقایسه با شرایط تنش خفیف به ترتیب ۹/۶ و ۲۳/۸ درصد افزایش داشت (جدول شماره ۳). استفاده از سویه‌های پوتیدا و فلورسنس نیز جداگانه به ترتیب باعث افزایش محتوی هیوسیامین (۹/۴ و ۱۲/۱ درصد) و اسکوپولامین (۱۲/۲ و ۱۸/۴ درصد) ریشه شد. حداکثر محتوی هیوسیامین (۰/۸۵ درصد ماده خشک) و اسکوپولامین (۰/۴۸ درصد ماده خشک) شاخساره در گیاهان تحت تیمار



جدول شماره ۳- میانگین اثرات متقابل تنش کم آبی و سودوموناس‌ها بر روی محتوی هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذربنچ (انحراف معیار \pm میانگین مربعات)

تیمار	نسبت ریشه به شاخساره (R/S)	محتوی هیوسیامین (درصد ماده خشک)		محتوی اسکوپولامین (درصد ماده خشک)	
		شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه
سودوموناس PP	۱/۱۱۸±۰/۰۲۸	۰/۲۴۴±۰/۰۰۵	۰/۸۳۳±۰/۰۰۶	۰/۱۰۶±۰/۰۰۵	۰/۴۳۴±۰/۰۰۵
تنش کم آبی W1	۱/۱۳۸±۰/۰۳۱	۰/۲۳۹±۰/۰۰۵	۰/۸۲۸±۰/۰۰۶	۰/۱۰۳±۰/۰۰۴	۰/۴۳۱±۰/۰۰۷
شاهد	۰/۹۴۲±۰/۱۲۰	۰/۱۸۷±۰/۰۰۸	۰/۶۸۵±۰/۰۰۹	۰/۰۶۳±۰/۰۱۲	۰/۳۵۴±۰/۰۱۳
سودوموناس PP	۱/۱۴۱±۰/۰۵۶	۰/۲۵۴±۰/۰۰۵	۰/۸۳۷±۰/۰۰۵	۰/۱۱۱±۰/۰۰۲	۰/۴۴۱±۰/۰۰۴
تنش کم آبی W2	۱/۲۰۰±۰/۰۵۷	۰/۲۵۱±۰/۰۰۸	۰/۸۳۹±۰/۰۰۵	۰/۱۱۲±۰/۰۰۶	۰/۴۴۳±۰/۰۰۴
شاهد	۱/۰۰۶±۰/۱۰۵	۰/۱۹۲±۰/۰۱۰	۰/۷۰۱±۰/۰۱۱	۰/۰۷۰±۰/۰۱۳	۰/۳۶۳±۰/۰۰۸
سودوموناس PP	۱/۲۶۷±۰/۰۱۹	۰/۲۶۷±۰/۰۰۵	۰/۸۴۸±۰/۰۰۵	۰/۱۱۹±۰/۰۰۳	۰/۴۶۳±۰/۰۰۴
تنش کم آبی W3	۱/۲۵۱±۰/۰۶۱	۰/۲۶۸±۰/۰۰۶	۰/۸۵۵±۰/۰۰۵	۰/۱۲۲±۰/۰۰۶	۰/۴۸۰±۰/۰۰۴
شاهد	۱/۰۶۸±۰/۰۵۹	۰/۲۰۵±۰/۰۰۹	۰/۷۲۲±۰/۰۱۰	۰/۰۷۸±۰/۰۱۱	۰/۳۷۷±۰/۰۰۷

W1، W2 و W3 به ترتیب تنش کم آبی تا تخلیه ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد رطوبت مزرعه‌ای Pseudomonas fluorescence -۱۸۷: PF و Pseudomonas putida -۱۶۸: PP

جدول شماره ۴- میانگین اثرات متقابل تنش کم آبی و سودوموناس‌ها بر روی عملکرد هیوسیامین و اسکوپولامین ریشه و شاخساره گیاه بذربنچ (انحراف معیار \pm میانگین مربعات).

تیمار	عملکرد هیوسیامین (میلی گرم در گیاه)		عملکرد اسکوپولامین (میلی گرم در گیاه)		عملکرد کل آلکالوئید (هیوسیامین + اسکوپولامین) (میلی گرم در گیاه)
	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	
سودوموناس PP	۱/۹۲۷±۰/۱۱۵	۵/۸۸۷±۰/۱۴۹	۰/۸۳۵±۰/۰۵۶	۳/۰۶۷±۰/۰۹۵	۱۱/۷۱۶±۰/۴۰
تنش کم آبی W1	۱/۸۰۷±۰/۱۰۵	۵/۴۹۳±۰/۱۴۴	۰/۷۸۰±۰/۰۴۲	۲/۸۶۱±۰/۰۸۸	۱۰/۹۴۱±۰/۳۴
شاهد	۰/۹۳۳±۰/۱۴۵	۳/۶۳۰±۰/۱۹۲	۰/۳۱۶±۰/۰۹۲	۱/۸۷۸±۰/۰۹۸	۶/۷۵۷±۰/۴۳
سودوموناس PP	۱/۵۹۷±۰/۰۹۷	۴/۶۱۵±۰/۰۶۷	۰/۷۰۱±۰/۰۳۷	۲/۴۳۵±۰/۰۴۰	۹/۳۴۸±۰/۱۹
تنش کم آبی W2	۱/۷۳۵±۰/۱۱۱	۴/۸۲۵±۰/۰۴۱	۰/۷۷۳±۰/۰۴۴	۲/۵۵۰±۰/۰۱۲	۹/۸۸۳±۰/۰۹
شاهد	۰/۶۹۴±۰/۰۷۸	۲/۵۱۷±۰/۱۴۷	۰/۲۵۲±۰/۰۵۷	۱/۳۰۴±۰/۰۵۶	۴/۷۶۷±۰/۲۴
سودوموناس PP	۱/۵۱۰±۰/۰۵۷	۳/۷۸۴±۰/۱۴۱	۰/۶۷۳±۰/۰۳۲	۲/۰۶۵±۰/۰۸۲	۸/۰۳۲±۰/۳۰
تنش کم آبی W3	۱/۶۹۱±۰/۰۹۶	۴/۳۱۰±۰/۰۲۶	۰/۷۶۹±۰/۰۴۴	۲/۴۱۹±۰/۰۰۸	۹/۱۸۹±۰/۰۹
شاهد	۰/۶۰۰±۰/۰۵۶	۱/۹۸۳±۰/۰۹۰	۰/۲۳۰±۰/۰۴۳	۱/۰۳۶±۰/۰۴۵	۳/۸۴۹±۰/۱۷

W1، W2 و W3 به ترتیب تنش کم آبی تا تخلیه ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد رطوبت مزرعه‌ای Pseudomonas fluorescence -۱۸۷: PF و Pseudomonas putida -۱۶۸: PP

سطوح تنش می‌تواند به هورمون‌های گیاهی نسبت داده شود که الگوی تخصیص مواد فتوسنتزی در گیاهان را تغییر می‌دهند و از این طریق روی رشد ریشه تاثیر می‌گذارند و در نتیجه ریشه‌هایی انبوه با انشعاب زیاد حاصل می‌شوند و این ممکن است عامل اصلی افزایش بیوماس ریشه به شاخساره در تلقیح باکتری‌ها باشد، این نتایج با گزارش بسیاری از محققان مطابقت دارد [۱۱]. اثرات مفید باکتری‌های محرک رشد و مکانسیم‌های

فلورسنس ۱۸۷ بیشترین کارایی در بهبود رشد و تولید آلکالوئید گیاه را در شرایط تنش شدید اعمال می‌کند.

بحث

در این آزمایش افزایش وزن خشک ریشه در مقایسه با شاخساره در گیاهان تحت تیمار پوتیدا و فلورسنس در تمام



شرایط رشد تغییر می‌کنند. دلیل عمده افزایش تولید آلکالوئیدها در تیمار باکتری‌ها این است که این میکروارگانیسم‌ها با تولید هورمون‌های رشد به عنوان یک محرک در ساخت تروپان آلکالوئیدها عمل می‌کنند. طبق گزارش محققان، هورمون‌های رشد و تنش‌های اسمزی به ترتیب به عنوان محرک‌های شیمیایی و فیزیکی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی عمل می‌کنند [۲۰، ۲۱]. در این تحقیق مقدار ریشه‌های ظریف، در تیمار سودوموناس‌ها در مقایسه با تیمار عدم تلقیح بیشتر بود (جدول شماره ۲) و این ممکن است علت اصلی افزایش تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در تیمار سودوموناس‌ها باشد چونکه طبق گزارش ناکانیشی و همکاران (۲۰۰۰) رشد ریشه، یکی از عوامل مهم تعیین‌کننده ترکیب تروپان آلکالوئیدها بوده و میزان این ترکیبات بر مبنای قطر ریشه متفاوت می‌باشد [۲۲]. همچنین گیاهان تحت تیمار پوتیدا در شرایط تنش خفیف در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین نسبت از ریشه‌های ظریف را داشتند که ممکن است باعث عملکرد زیاد هیوسیامین و اسکوپولامین اندام‌ها شده باشد. دلیل دیگر افزایش این متابولیت‌ها در اندام‌های ریشه و شاخساره گیاهان تحت تیمار سودوموناس‌ها ممکن است افزایش فعالیت آنزیمی به واسطه تولید هورمون‌های گیاهی و تخفیف تنش باشد. تنش کم آبی نیز اثر مثبتی (اما نه به اندازه سودوموناس‌ها) روی محتوی آلکالوئیدهای اندام‌ها داشت. گزارش شده که افزایش اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های محلول از جمله عواملی هستند که در گیاهان تحت تنش کم آبی سبب افزایش محتوی آلکالوئیدها می‌شوند [۲۳]. اما تنش، به طور معنی‌داری باعث کاهش بیوماس گیاه (که نقش اصلی را در تعیین عملکرد آلکالوئید دارد) می‌شود. آزمایش‌های قبلی توسط محققان نشان داد که تولید ایندول آلکالوئیدها می‌تواند با محرک‌های قارچی تحریک شود [۲۴]. نتایج مشابهی از افزایش ایندول آلکالوئیدها مانند آجمالاسین در گیاه پروانش در نتیجه تیمار سودوموناس فلورسنس در شرایط تنش خشکی گزارش نموده‌اند [۲۵]. اثر متقابل بین محرک‌ها و گیرنده‌ها در سطح سلول از دلایل اصلی عمل ترشح متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود که در نتیجه آن تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد [۲۰]. در مطالعه

متداول سازش گیاهان به تنش کم آبی همیشه و به صورت متقابل با تغییرات استثنایی در مرفولوژی ریشه مانند طول ریشه، مساحت سطح ریشه، وزن خشک ریشه، رشد تارهای کشنده و انشعاب‌سازی ریشه مرتبط است [۱۲]. مارسلو و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که لویای تلقیح شده با آزوسپریلوم (*Azospirillum brasilense*) که به عنوان یک باکتری محرک رشد و تثبیت‌کننده نیتروژن است، طول و سطح ریشه را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داده و سیستم ریشه‌ای با ریشه‌های نازک تر و طویل‌تر حاصل شده است [۱۳]. طبق گزارش اسموکر (۱۹۹۳) گیاهانی که دارای ریشه‌های خیلی ظریف هستند به دلیل مساحت بیشتر سطح ویژه ریشه در جذب آب و مواد غذایی کارآمدتر هستند [۱۴]. علت عمده کاهش رشد ریشه (خصوصاً ریشه‌های ظریف) با افزایش شدت تنش کم آبی می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (*Reactive Oxygen Species (ROS)*) باشد که در شرایط تنش کم آبی ایجاد می‌شوند و به بافت‌های گیاهی مخصوصاً ریشه (به دلیل حساسیت زیاد فعالیت مرستم ریشه به گونه‌های فعال اکسیژن) آسیب می‌رسانند [۱۵]. به منظور کاهش اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن، سیستم‌های تقویت‌کننده آنتی‌اکسیدانت (مثل کاربرد باکتری‌های محرک رشد) ضروری می‌باشد [۱۶] و کاربرد این سویه‌ها اثرات منفی تنش کم آبی روی رشد ریشه‌های ظریف را کاهش می‌دهد. به این صورت که باکتری‌های محرک رشد، روی تارهای کشنده و اپیدرم ریشه گیاهان کلونیزه کرده [۱۷] و در نتیجه باعث تخفیف آسیب اکسیداتیوی از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت کاتالاز می‌شوند [۱۸]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سویه فلورسنس ۱۸۷ کارآیی بهتری نسبت به سویه پوتیدا ۱۶۸ در شرایط تنش متوسط و شدید داشته است. دلیل آن می‌تواند به ویژگی‌های چند گانه محرک رشد این سویه‌ها (جدول شماره ۱) نسبت داده شود. نتایج مشابه‌ای نیز از نقش منشای اکولوژیکی سویه‌ها به عبارت دیگر مناطقی که سویه‌ها از آن جداسازی می‌شوند، روی کارآیی آنها توسط مایاکا (۲۰۰۴) گزارش شده است [۱۹].

ریشه در گیاهان خانواده سیب‌زمینی مکان بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها است و این متابولیت‌ها با مراحل نموی گیاه و



در آزمایش حاضر یک رابطه خطی و معنی‌داری ($p < 0/05$) بین وزن خشک کل ریشه و محتوی آکالوئیدهای ریشه (هیوسیامین و اسکوپولامین) در مرحله رشد رویشی گیاه بذرالبنج تحت سطوح مختلف تنش کم آبی و سویه‌های سودوموناس یافت شد. بین عملکرد کل آکالوئیدها و وزن خشک کل شاخساره نیز یک رابطه خطی و معنی‌داری ($R^2 = 0/89$) مشاهده شد. همچنین بین عملکرد اسکوپولامین شاخساره و وزن خشک ریشه‌های ظرفیت‌های همبستگی مثبت مشاهده شد ($r = 0/99$, $p < 0/01$). بیشترین نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین ($0/53$) که معیاری از کیفیت آکالوئید است و همچنین بیشترین محتوی آکالوئیدهای ریشه و شاخساره، در تیمار فلورسنس تحت شرایط تنش شدید مشاهده شد. مطابق نتایج این آزمایش، افزایش ۶۳ درصد عملکرد اسکوپولامین شاخساره گیاه بذرالبنج در مرحله رشد رویشی با کاربرد سویه پوتیدا ۱۶۸ به همراه تخلیه ۳۰ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای قابل دستیابی است.

تشکر و قدردانی

از تمامی اعضای هیات علمی و کارمندان محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی و مؤسسه تحقیقات خاک وآب کشور قدردانی می‌شود.

حاضر اندام شاخساره بذرالبنج در تمام تیمارها تجمع آکالوئید بیشتری نسبت به ریشه داشت. بدیهی است که ریشه‌ها محل بیوستت و ذخیره آکالوئیدها محسوب می‌شوند اما ممکن است در اثر شرایط ایجاد شده، این متابولیت‌ها به اندام‌های هوایی گیاه منتقل شده باشند، در برخی موارد انتقال فعال این آکالوئیدها مشاهده شده اما عمدتاً از طریق آوند‌های چوبی صورت می‌گیرد [۲۶]. سویه‌های باکتری استفاده شده در این آزمایش از نظر تولید اکسین، سیدروفور و انحلال فسفر متفاوت بودند (جدول شماره ۱). ظرفیت زیاد در تولید اسید آلی (حلالیت زیاد فسفر) توسط سویه فلورسنس ممکن است یکی از مکانیسم‌های عمده افزایش محتوی آکالوئید در استفاده از این سویه در شرایط تنش باشد. نتایج مشابهی نیز در ارتباط با تولید ارگوت آکالوئید در ریشه‌های تلقیح شده گیاه فستوکای بلند که مستقیماً با فراهمی فسفر در خاک افزایش پیدا کرد بیشتر توسط مالدینوسکی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده است [۲۷]. همبستگی نزدیکی نیز بین محتوی فسفر و تحمل تنش کم آبی توسط سوبرامانیان و همکاران (۱۹۹۵) گزارش شده است [۲۸]. سویه پوتیدا در شرایط تنش متوسط و شدید در مقایسه با فلورسنس و شرایط تنش خفیف، ضعیف‌تر عمل نمود. آزمون بیوشیمیایی نشان داد که سویه پوتیدا یک سویه کارآمد در تولید اسید سیانیدریک است. هر چند این ماده در رشد و نمو گیاه نقشی اعمال نمی‌کند اما به عنوان یک عامل فیتوتوکسیک بوده که قادر به بازداری آنزیم‌های دخیل در فرآیندهای متابولیک است.

منابع

1. Nussbaumer P, Kapetanidis I, and Christen PH. Hairy roots of *Datura Candia* XD. Aurea: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant cell Reports*. 1998; 17: 405 - 9.
2. Oksman Caldentey KM, Hiltunen R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crop Res*. 1996; 45: 57 - 69.
3. Gritothe G and Drager B. Tropane alkaloids metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Sci*. 2002; 163: 979 - 85.
4. Zayed R and Wink M. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Z. Naturforsch* 2004; 59: 863 - 7.



5. Willaman JJ, Li HL. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. *J. Nat. Prod.* 1970; 30: 1 – 4.
6. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil.* 1999; 212: 155 - 64.
7. Selmar D. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Res.* 2008; 58: 139 - 44.
8. Sanchez BJ, Trinitario M, Ferradez M, Angeles M, Asuncio M, Juan JA. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* 2004; 161: 675 – 82.
9. Wu QS, Xi RX, Zou YN. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three *Arbuscular mycorrhizal* fungi under drought stress. *Europ. J. of Soil Biol.* 2008; 44: 122 - 8.
10. Kamada H, okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 1986; 5: 239 - 42.
11. Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science.* 2007; 12: 98 – 105.
12. Okon Y, Vanderleyden J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 1997; 63: 366 - 70.
13. Marcelo AG, Saul B, Okon Y, Jaime K. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biol. Fertil. Soils.* 2000; 32: 259 – 64.
14. Smucker AJM. Soil environmental modifications of root dynamics and measurement. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1993; 31: 191 – 212.
15. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Julia MD, Liam D. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 2003; 422: 442 - 6.
16. Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum.* 1994; 92: 696 – 717.
17. Campbell R, Greaves MP. Anatomy and community structure of the rhizosphere, In Lynch, JM., Ed., the rhizosphere. John Wiley and Sons Ltd: Chichester, 1990, pp: 11 - 34.
18. Kohler J, Hernandez JA, Caravaca F, Roldan A. PGPR and AM fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water stressed plants. *Funct. Plant Biol.* 2008; 35: 141 – 51.
19. Mayaka S, Tsipora T, Bernard R, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* 2004; 166: 525 – 30.
20. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 2007; 172: 861 – 75.
21. Jaleel CA, Gopi R, Panneerselvam R. Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *C. R. Biologies* 2008; 331: 272 - 7.
22. Nakanishi F, Sasaki K, Shimomura K. Kinetics of littorine content in various developing stages of regenerates of *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* 2000; 19: 1021 – 6.
23. Brodbeck B, Strong D. Amino acid nutrition of herbivorous insects and stress to host plants; In Barbosa P, Shultz JC., Eds., Insect Outbreaks. Academic Press: San Diego, CA, 1987, pp: 347-364.
24. Karthikeyan B, Jaleel CA, Gopi R, Deiveekasundaram M. Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seedpriming with native diazotrophs. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2007; 8: 453 – 7.



25. Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundaram, R, Panneerselvam R. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surf. B: Bio.* 2007; 60: 7 – 11.
26. Rafael Z, Bernardo H, Manuel C, Antonio T. Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica* plants. *J. of Chemical Ecol.* 1997; 23 (8): 2059 - 66.
27. Malinowski DP, Belesky NS, Hill VC, Baligar Fedders JM. Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil.* 1998; 198: 53 – 61.
28. Subramanian KS, Charest C. Influence of *Arbuscular mycorrhizae* on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza.* 1995; 5: 273 - 8.

