The effect of phosphate solubilizing bacteria on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids of *Papaver somniferum* L.

Samaneh Samavat[1*], Mahdiyeh Salehi Vozhdehnazari[2], Mahdi Yahyazadeh Balalami[3], Mahshid Rahimifard[3]

Introduction

So far, more than 40 different types of alkaloids have been known in poppy (*Papaver somniferum*) as a valuable medicinal plant, the most important of which are morphine, codeine, thebaine, noscapine, and papaverine. The biosynthesis of these alkaloids may be strongly influenced by a variety of biotic and abiotic elicitors. In fact, microbes as biotic elicitors can affect the production of poppy alkaloids. Among them, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can be noticed, which stimulate and improve plant growth through various mechanisms such as mineral phosphate solubilization, plant hormone production, siderophores secretion, nitrogen fixation, etc. The use of PGPR agents can not only lead to an increase in plant biomass, but simultaneously, due to their role as biotic elicitors, they cause to an increase in the biosynthesis of secondary metabolites in plants. These biotic elicitors target plants' defense mechanisms and result in triggering a series of metabolic changes throughout the plant. The use of PGPR agents to stimulate the plant to produce secondary metabolites has several advantages: First, in some plants, defensive metabolites are active biological compounds that lead to the induction of food production with high added-value in the plants. Secondly, physiologically, with the increase in the synthesis of secondary metabolites, the resistance of the plant against pathogens also increases. Accordingly, the present study was performed with the aim of investigating the effects of bacterial strains with the ability to solubilize inorganic phosphate as biotic elicitors on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in *P. somniferum*.

Materials and Methods

In this research, the solubility of inorganic phosphate by four bacterial strains including *Enterobacter xiangfangensis* S2, *Pantoea dispersa* S7, *Pantoea stewartii* S25, and *Pseudomonas canadensis* S36 was evaluated quantitatively using Sperber broth medium. Under greenhouse conditions, the effect of foliar spraying of *P. somniferum* plants with a suspension of the bacterial strains (10^8 CFU/ml) on the amount of morphine, papaverine, and noscapine in the plants' capsules, stems, and leaves was investigated. About three weeks after the appearance of capsules in poppy plants, the aerial parts of the plants (stems, leaves, and capsules) were sprayed with the bacterial suspensions. One week after foliar spraying, poppy plants were harvested in order to determine the amount of the desired alkaloids. Three pots were considered for each treatment and there were three poppy plants in each pot. Alkaloids were extracted based on an alcoholic method and detected using HPLC. Morphine and noscapine standards were prepared at a concentration of 1000 µg/ml and papaverine standard at a concentration of 250 µg/ml. Then the mixture was prepared in proportions of 1, 1:50, 1:10, 1:50 and 1:100 and injected into the HPLC set to draw the calibration curve. All the experiments were conducted in a form of completely randomized design with three replications for each treatment ($P<0.05$).

Results

The results showed that the highest (458.67 µg/ml) and the lowest (130.47 µg/ml) phosphate solubility were related to S2 and S36 strains, respectively. S7 and S25 strains were not statistically significantly different from each other and after S2 strain, they were placed in the second statistical position. In the bacterial strains' treatments, the level of morphine in the stems and leaves as well as the capsules increased significantly in most cases compared to the control. The amount of papaverine in the stems and leaves decreased significantly, but it had no significant changes in the capsule. Also, noscapine showed a significant increase in the stems and leaves and reached from 0.8 mg/g DW in the control to 8.12 in the S2 treatment. While, the amount of noscapine increased significantly in the capsules, only in the S2 and S36 treatments. Other strains did not show significant differences with the control for noscapine content in the capsules. The results showed that the interaction effects of the type of the alkaloids and the use of phosphate solubilizing bacterial strains on the concentration of the studied alkaloids in poppy stems, leaves and capsules are significant (P<0.01).

Conclusions

It can be concluded that there is no need to apply genetic engineering to increase the production of valuable secondary metabolites by medicinal plants. Rather, this goal can be achieved much cheaper by using bacterial elicitors. Accordingly, by selecting compatible and efficient bacterial strains with phosphate solubilizing activity, the amounts of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the aerial parts of *P. somniferum* as a valuable medicinal plant can be noticeably increased.

Keywords: Alkaloid, Elicitor, Bacterium, HPLC, PGPR

نسخه پیش انتشار

اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

سمانه سماوات[1*]، مهدیه صالحی وژده نظری[2]، مهدی یحیی‌زاده بلالمی[3]، مهشید رحیمی فرد[3]

۱- * نویسنده مسئول، استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: samaneh.samavat@gmail.com

۲- دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالویید مختلف در گیاه دارویی و ارزشمند خشخاش (*Papaver somniferum*)، شناخته شده که مهمترین آنها مورفین، کدیین، تباین، نوسکاپین و پاپاورین است. بیوسنتز این آلکالوییدها ممکن است به شدت تحت تأثیر انواعی از الیسیتورهای زنده و غیرزنده قرار گیرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سویه‌های باکتریایی با قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی به عنوان الیسیتورهای زنده، بر میزان تولید آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در گیاه خشخاش انجام شده است. در این پژوهش، قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی توسط چهار سویه باکتریایی *Enterobacter xiangfangensis* S2، *Pantoea dispersa* S7، *Pantoea stewartii* S25 و *Pseudomonas canadensis* S36 به روش کمی و به کمک محیط کشت مایع Sperber ارزیابی شد. در شرایط گلخانه، اثر محلولپاشی بوته‌های خشخاش با سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی (10^8 CFU/ml) بر میزان آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین موجود در کپسول، ساقه، و برگ خشخاش بررسی شد. آلکالوییدها به روش الکلی استخراج و توسط دستگاه HPLC ردیابی شدند. تمامی آزمون ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به ازای هر تیمار انجام شدند ($P<0.05$). نتایج نشان داد که بیشترین (۴۵۸/۶۷µg/ml) و کمترین (۱۳۰/۴۷ µg/ml) میزان حل‌کنندگی فسفات به ترتیب مربوط به سویه های S2 و S36 بود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مشخص شد که سطح مورفین موجود در ساقه و برگ و نیز کپسول در اغلب موارد افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد را نشان داد. میزان پاپاورین موجود در ساقه و برگ کاهش معنی‌داری داشت ولی در کپسول تغییرات معنی‌داری نداشت. نوسکاپین موجود در ساقه و برگ نیز افزایش معنی‌داری داشت و از ۰/۸ mg/g DW در شاهد به ۸/۱۲ در تیمار S2 رسید. در صورتیکه میزان نوسکاپین کپسول فقط در تیمار با S2 و S36 افزایش معنی‌داری داشت و سایر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند. به این ترتیب با انتخاب سویه‌های باکتریایی سازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توان سطح آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در اندام‌های هوایی گیاه دارویی و ارزشمند خشخاش را به طور چشمگیری افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوییید، الیسیتور، باکتری، HPLC، PGPR

مقدمه

خشخاش (*Papaver somniferum* L.) گیاهی علفی و یکساله به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر، متعلق به تیره خشخاش (Papaveraceae) است. تاکنون برای این گونه، زیرگونه و واریته‌های مختلفی معرفی شده‌است. منشأ این گونه به احتمالی مناطق مدیترانه‌ای است و کشت آن به دوره ماقبل تاریخ برمی‌گردد. این گیاه بومی آسیا و اروپای جنوب شرقی است و به راحتی از مزرعه به رویشگاه‌های طبیعی نفوذ می‌نماید و تقریباً شکل انتشار طبیعی پیدا می‌کند. به لحاظ خصوصیات گیاه‌شناختی، دارای ساقه‌هایی قائم با و یا بدون انشعاب و به رنگ سبز تا سبز مایل به خاکستری است. ریشه‌های آن سطحی و دارای برگ‌های منفرد و متناوب تخم مرغی، مستطیلی یا قلبی به رنگ سبز کدر و دارای دندانه‌های عمیق است. گل‌های آن درشت است و در واریته‌های مختلف به رنگ‌های سفید و یا قرمز مایل به بنفش دیده می‌شود. میوه آن از نوع کپسول کم و بیش کروی است که در قاعده دارای یک پایک کوتاه است. این گونه دارای سلول‌های خاص یا مجراهایی است که حاوی شیرابه شیری رنگی است. این شیرابه شامل ۱۰ تا ۱۵ درصد آب، ۲۰ درصد مواد قندی، مقادیری اسیدهای آلی همچون اسید لاکتیک، اسید اگزالواستیک و اسید فوماریک است. همچنین حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد آلکالوییید است (Yazdani *et al*., 2003; Tavakkoli and Assadi, 2017).

آلکالوییدها به دلیل سمیتی که دارند به عنوان یک ابزار اصلی برای محافظت از گیاهان در برابر آفات عمل می‌کنند (Srivasatava, 2022). تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالوییید در خشخاش شناسایی شده است که مهمترین آن‌ها مورفین[1]، کدیین[2]، تبایین[3]، نوسکاپین[4]، و پاپاورین[5] است (Liscombe and Facchini, 2008). مورفین، آلکالوییید غالب گیاه خشخاش و یک مسکن طبیعی قوی است. کدیین و نوسکاپین به عنوان سرکوب‌کننده سرفه و پاپاورین شل کننده عضلات است. آلکالوییید تبایین مستقیماً برای درمان استفاده نمی‌شود، اما به صورت صنعتی جهت ساخت مسکن‌های دیگر کاربرد دارد (Meos *et al*., 2017). میزان بیوسنتز آلکالوییدهای خشخاش علاوه بر خصوصیات ژنتیکی گیاه، به شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف اعم از زنده و غیرزنده است (Facchini, 2001; Bourgaud *et al*., 2001; Szabó *et al*., 2008).

از عوامل غیرزنده مؤثر بر غلظت آلکالوییدهای تولید شده در خشخاش، می‌توان به نور، دما، و انواعی از ترکیبات شیمیایی ا شاره کرد (Srivastava and Sharma, 1990; Bennett *et al*., 2004; Kim *et al*., 2005). از بین عوامل زنده نیز باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشـرات از اهمیت زیادی برخوردار هسـتند (Alcantara *et al*., 2005; Ramos-Solano *et al*., 2008; Silva *et al*., 2004). در واقع، عوامل میکروبی اعم از بیماریزا و غیربیماریزا در نقش الیسـیتور[6]های زنده می‌توانند میزان تولید آلکالوییدهای خشـخاش را تحت تأثیر قرار دهند. از جمله این عوامل می‌توان به باکتری‌های محرک رشـد گیاه

1- Morphine
2- Codeine
3- Thebaine
4- Noscapine
5- Papaverine
6- Elicitor

(PGPR)[1] اشاره کرد که از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر حل‌کنندگی فسفات معدنی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، ترشح سیدروفورها، تثبیت نیتروژن، و غیره منجر به تحریک و بهبود رشد گیاهان نیز می‌شوند. تاکنون سویه‌ها و جدایه‌های متعددی از جنس های *Flavobacterium*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Rhizobium*، *Aereobacter*، *Burkholderia*، *Achromobacter*، *Erwinia*، *Micrococcus*، و *Azotobacter* به عنوان عوامل PGPR مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rodríguez and Fraga, 1999).

بکارگیری عوامل PGPR، نه تنها می‌تواند منجر به افزایش زیست توده گیاهی شود، بلکه به طور همزمان به دلیل نقشی که به عنوان الیسیتورهای زنده دارند، منجر به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شود (Ramos-Solano *et al*., 2010). این الیسیتورهای زنده مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان را مورد هدف قرار می‌دهند و منتج به تحریک یک سری تغییرات متابولیکی در سرتاسر گیاه می‌شوند و به این طریق گیاه متابولیسم دفاعی خود را تقویت می‌کند (van Loon *et al*., 1998). بکارگیری عوامل PGPR به منظور تحریک گیاه به تولید متابولیت‌های ثانویه دارای مزایای متعددی است: نخست اینکه، در برخی از گیاهان، متابولیت‌های دفاعی ترکیبات زیستی فعالی هستند که منجر به القای تولید مواد غذایی با ارزش افزوده بالا در گیاه می‌شوند (Algar *et al*., 2012). به عنوان مثال در گیاه دارویی گل انگشتانه (*Digitalis lanata* L.) (Gutierrez *et al*., 2003) و نیز سویا (Algar *et al*., 2012) منجر به افزایش سطح ایزوفلاون‌ها[2] می‌شوند. ثانیاً، به لحاظ فیزیولوژیکی، با افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه، مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا نیز افزایش می یابد (Ramos-Solano *et al*., 2008; Conrath *et al*., 2006). به طور مثال این عوامل می‌توانند منجر به تقویت سیستم دفاعی در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* در برابر بیمارگرها شوند (Ramos-Solano *et al*., 2008).

تاکنون مطالعات معدودی از نقش عوامل PGPR به عنوان الیسیتورهای زنده در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، بخصوص گیاه خشخاش انجام شده است. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سویه‌هایی از عوامل PGPR با قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی بر میزان تولید آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین و نوسکاپین در گیاه خشخاش انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور خشخاش (*P. somniferum*) از رویشگاه‌های طبیعی واقع در استان فارس در عرض جغرافیایی "۵۶ '۱۰ °۳۵ شمالی و طول جغرافیایی "۱۷ '۲۳ °۵۹ شرقی، در طی تیر ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد.

سویه‌های باکتری

چهار سویه باکتریایی (S2, S7, S25, S36) که پیشتر بر اساس توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی خود در محیط کشت Sperber (Sperber, 1958)، غربالگری و شناسایی شده بودند، از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور دریافت شد. اطلاعات مربوط به سویه‌ها در جدول (۱) آورده شده است.

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria
2- Isoflavones

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر
Table 1- The characteristics of the bacterial strains used in this research

سویه **Strain**	گونه **Species**	شماره دسترسی **Accession number**	طول توالی (kb) **Sequence length (kb)**
S2	*Enterobacter xiangfangensis*	MW687115	1460
S7	*Pantoea dispersa*	MW687122	1472
S25	*Pantoea stewartii*	MW704276	633
S36	*Pseudomonas canadensis*	MW687114	1464

بررسی توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش کمی

برای بررسی توان سویه‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات به عنوان منبع فسفات معدنی نامحلول از محیط کشت مایع Sperber (دکستروز ۱۰ g/l، عصاره مخمر ۰/۵ g/l، کلرید کلسیم ۰/۱۴ g/l، سولفات منیزیوم ۰/۳۲ g/l، تری کلسیم فسفات ۲/۵ g/l، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، اسیدیته ۷)، استفاده شد. ابتدا سویه‌های باکتریایی به مدت ۴۸ ساعت در محیط جامد Sperber در سه تکرار رشد داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط مایع Sperber منتقل شد. ارلن‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۷C±۲° تکان داده شدند. به طور همزمان سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شده و یک میلی لیتر از محلول رویی با یک میلی لیتر از محلول مولیبدات وانادات رقیق کرده و سپس با سه میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از گذشت یک ساعت میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فسفر محلول آزاد شده توسط هر سویه بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 محاسبه شد (Alikhani *et al*., 2014).

مطالعات گلخانه‌ای

در مهرماه ۱۴۰۱، بذور خشخاش در گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴cm ×۱۵ cm× ۱۵ cm که محتوی بستری به وزن تقریبی ۲۲۰۰ گرم با ترکیب خاک زراعی، ماسه شسته شده، خاک برگ و کود گاوی پوسیده (۲:۱:۱:۱) بوده کشت شدند. پس از کشت بذور، گلدان‌ها به گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور در دمای ۲۵C±۲°، با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. در طی دوره داشت (۱۵۰ روز)، گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری می‌شدند و وجین علف‌های هرز انجام می‌شد. مرحله برداشت بوته‌های خشخاش تیمار شده در خرداد ۱۴۰۲ انجام گرفت.

تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی

در ابتدا از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی بر روی محیط کشت NA سوسپانسیونی با جمعیت 10^8 CFU/ml تهیه شد. به منظور کاهش کشش سطحی، به سوسپانسیون حاصل به میزان ۰/۰۵٪ (V/V) توئین ۲۰ (Tween 20) اضافه شد. تیمار شاهد فقط شامل مخلوط آب مقطر استریل و توئین ۲۰ بود. حدود سه هفته پس از ظهور کپسول در بوته‌های خشخاش، اندام‌های هوایی گیاه (ساقه، برگ، و کپسول) توسط سوسپانسیون باکتری‌ها، محلولپاشی شدند. یک هفته پس از محلولپاشی، بوته‌های خشخاش به منظور ردیابی و تعیین میزان آلکالوییدهای مورد نظر برداشت شدند. به ازای هر تیمار سه گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان نیز سه عدد بوته خشخاش موجود بود.

استخراج آلکالوییدها

جهت استخراج آلکالوییدها از بافت گیاهی خشخاش‌های تیمار شده با سویه‌های باکتریایی، نمونه‌های گیاهی (ساقه، برگ، و کپسول) خشک شده با دستگاه آسیاب برقی پودر شدند. به۳۰ میلی‌گرم از نمونه های گیاهی خشک و پودر شده، ۱,۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ (pH=4) اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰°C در داخل حمام التراسونیک (Bandelin sonorex, DL) گذاشته شد تا عصاره آن استخراج شود. بعد از هر مرحله از استخراج، نمونه‌ها جهت جداسازی ذرات معلق به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مجدداً تا سه مرتبه تمام مراحل استخراج جهت استخراج حداکثری آلکالوییدها تکرار شد. در نهایت، ماحصل هر سه مرحله عصاره‌گیری با هم ترکیب و ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط جهت جداسازی ترکیبات به دستگاه HPLC تزریق شد (Paulsen *et al*., 2015). قبل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC، مخلوطی از غلظت‌های مختلف استانداردهای آلکالوییدی جهت رسم منحنی شیب خط به دستگاه تزریق شدند. نوع ستون مصرفی در HPLC از نوع ۱۸C–RP و حلال مورد استفاده، متانول و آب حاوی ۲٪ استیک اسید بود. ردیاب از نوع ماورای بنفش و طول موج مورد استفاده ۲۸۰ نانومتر بود.

مشخصات دستگاه HPLC

تجزیه HPLC نمونه‌ها با استفاده از یک سیستم گرادیانت با استفاده از ستون Nucleosil RP-18 (5µ) 100 Å توسط دستگاه Agilent سری ۱۲۰۰ انجام شد. دو حلال مورد استفاده در این سیستم گرادیانت شامل A– متانول حاوی ۲٪ اسید استیک؛ B– آب حاوی ۲٪ اسید استیک بود. برنامه گرادیانت HPLC در نقطه ابتدایی شامل ۱۰٪ از حلال A و ۹۰٪ از حلال B بود که این نسبت تا دقیقه ۵ همچنان بدون تغییر بود. از دقیقه ۵ تا دقیقه ۲۰، درصدها در مورد A و B به صورت گرادیانت به ترتیب به ۸۵٪ و ۱۵٪ رسید. سرعت جریان و حجم تزریق نمونه‌ها به دستگاه به ترتیب یک میلی لیتر در دقیقه و ۲۰ میکرولیتر بود. پایش آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین و ناسکاپین توسط آشکارساز ماورای بنفش در ۲۸۰ نانومتر انجام شد. کمی سازی غلظت این ترکیبات آلکالوییدی بر اساس یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از پنج رقت سریال استاندارد پاپاورین بود که از ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. استانداردهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت تولید مواد اولیه داروپخش (تماد) خریداری شده بود.

خصوصیات و مقادیر استانداردها

استانداردهای مورفین و نوسکاپین به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و استاندارد پاپاورین به غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس مخلوط به نسبت‌های ۱، ۱:۵۰، ۱:۱۰، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ تهیه و به دستگاه HPLC جهت رسم منحنی کالیبراسیون تزریق شد.

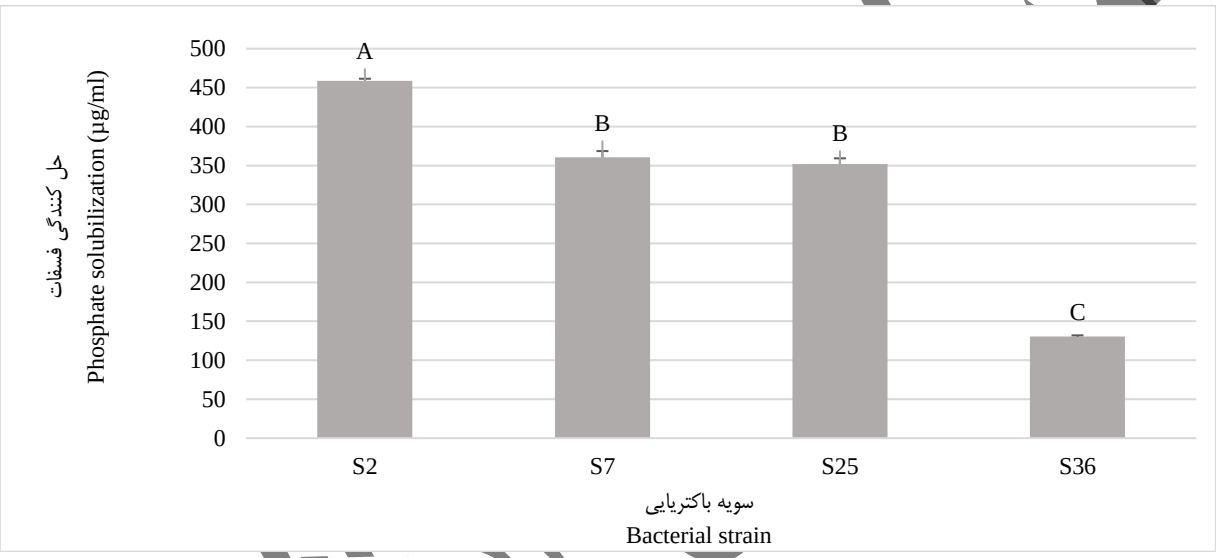
تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به ازای هر تیمار انجام شد. داده های حاصل از پژوهش حاضر به کمک نرم افزار آماری SPSS (Version 26; SPSS Inc., IBM Company Chicago, USA)، تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به روش کمی

همانگونه که در شکل (۱) نشان داده شده است، هر چهار سویه باکتریایی مورد بررسی از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند. بیشترین و کمترین میزان حل‌کنندگی فسفات به ترتیب مربوط به سویه های S2 و S36 بود. سویه‌های S7 و S25 نیز به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و پس از سویه S2، در دومین جایگاه آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌های مربوطه در جدول (۲) آورده شده است.



شکل ۱- مقایسه توانایی سویه‌های باکتریایی در میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت مایع Sperber (n=3) (*P*<0.05)

Figure 1- Comparison of the ability of bacterial strains to solubilize inorganic phosphate in Sperber broth medium (*P*<0.05) (n=3)

جدول ۲- تجزیه واریانس حل‌کنندگی فسفات توسط سویه‌های باکتریایی (n=3) (*P*<0.05)

Table 2- Analysis of variance (ANOVA) for phosphate solubilization by bacterial strains (*P*<0.05) (n=3)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
تیمار Treatment	3	57698.6**	1820.42
تکرار Replication	2	31.5	0.99
خطا Error	6	31.7	
کل Total	11		

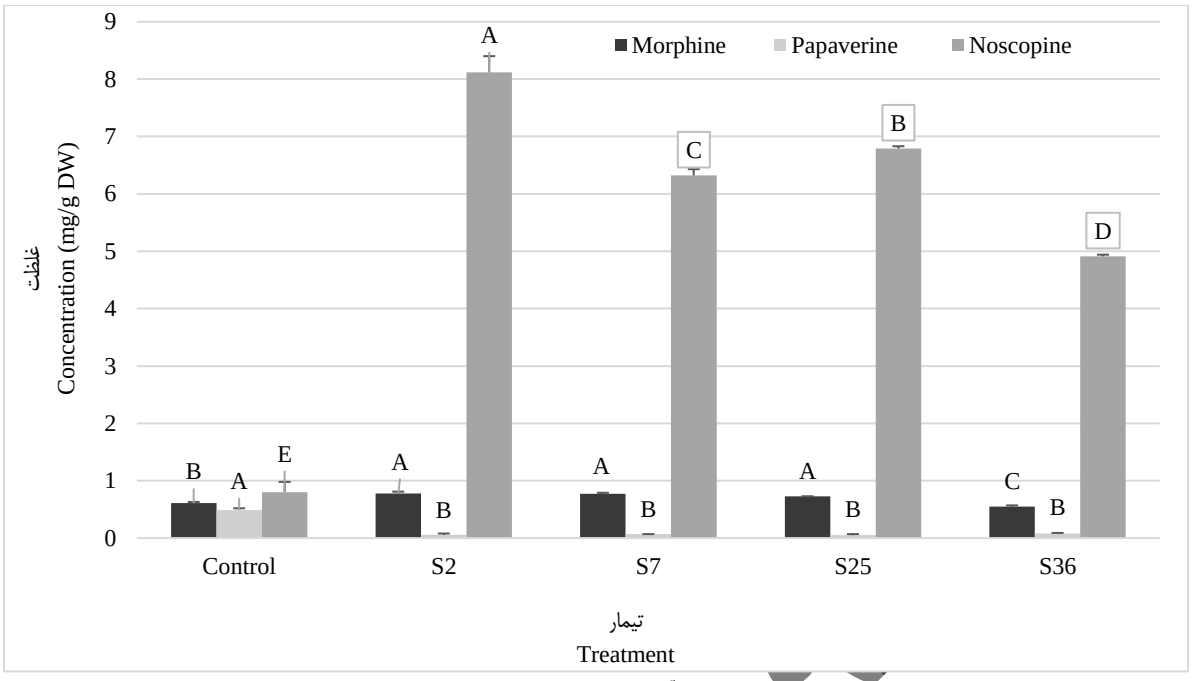
ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively

به این ترتیب نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌های باکتریایی بررسی شده که متعلق به گونه‌های *E. xiangfangensis*، *P. dispersa*، *P. stewartii* و *P. canadensis* بودند، از کارآمدی مطلوبی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند و می‌توان آن‌ها را به عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات معرفی کرد. قریشی و اعتمادی فر (Ghoreishi and Etemadifar, 2017) نیز گزارش کردند که سویه بررسی شده که متعلق به *E. xiangfangensis* بود، از توانایی در تولید اسیدفسفاتاز و در نتیجه حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. چن و همکاران (Chen *et al*., 2014) نشان دادند که باکتری *P. dispersa* از طریق تولید انواعی از اسیدهای آلی قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی است. هو و همکاران (Hu *et al*., 2010) نیز اظهار داشتند که جدایه g6 از باکتری *P. stewartii* از کارایی بالایی به لحاظ حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. بلانکو–وارگس و همکاران (Blanco-Vargas *et al*., 2020) نیز نشان دادند که سویه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی هستند. به این ترتیب نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران سازگاری دارد.

اثر سویه‌های باکتریایی بر غلظت برخی آلکالوییدهای خشخاش

همانگونه که در شکل (۱) نشان داده شده است، تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی حل کننده فسفات، در اغلب موارد منتج به بروز تغییرات معنی‌داری در سطح آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش شد. در بررسی میزان آلکالویید مورفین در ساقه و برگ خشخاش مشخص شد که تیمار با سویه‌های S2، S7، و S25 به طور معنی‌داری منجر به افزایش سطح مورفین در قیاس با تیمار شاهد شد ($P<0.05$). این در حالی است که تیمار با سویه S36 کاهش معنی‌داری در سطح مورفین در قیاس با تیمار شاهد منتج شد. تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه نیز منجر به کاهش معنی‌داری در غلظت آلکالویید پاپاورین در ساقه و برگ خشخاش نسبت به تیمار شاهد شد. این در حالی است که میزان آلکالویید نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش در تیمار با تمامی سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد نشان داد. بیشترین میزان افزایش به ترتیب مربوط به تیمار با سویه‌های S2، S25، S7، و S36 بود. نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول (۳)، نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالویید و بکارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوییدهای مورد مطالعه در ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است ($P<0.01$).



شکل ۲- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین ساقه و برگ خشخاش ($P<0.05$) (n=3)

Figure 2- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in poppy stems and leaves ($P<0.05$) (n=3)

جدول ۳- جدول ANOVA اثرات باکتری های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای برگ و ساقه *P. somniferum*

Table 3- ANOVA table of the effects of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* leaves and stems

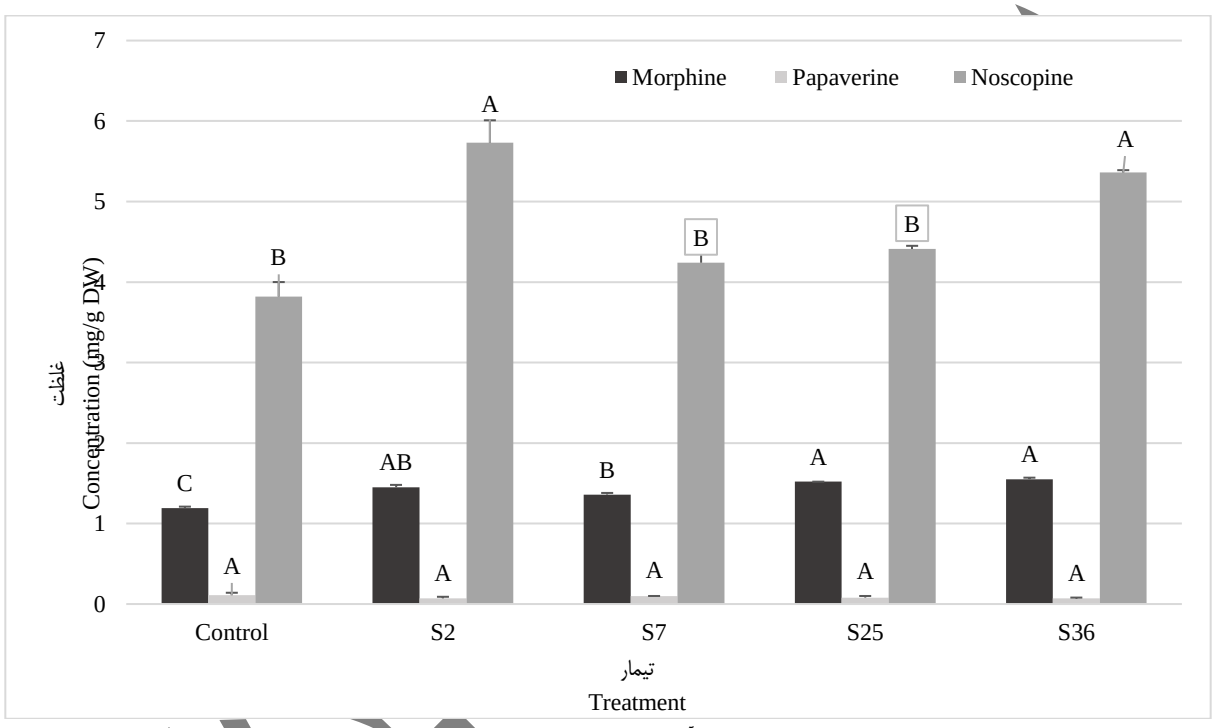
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوییدها Alkaloids (A)	2	124.54**	15200.19
تیمار Treatment (T)	4	7.33**	895.19
تیمار* آلکالوید A*T	8	8.24**	1006.18
خطا Error	30	0.01	
کل Total	44		

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively

بر اساس نتایج آورده شده در شکل (۳)، بکارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوییدِ مورفین موجود در کپسول بوته‌های خشخاش در قیاس با تیمار شاهد شد ($P<0.05$). از این نظر تیمارهای S25 و S36 در گروه اول آماری قرار گرفتند و با S2 اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند. کمترین میزان آلکالوییدِ مورفین

در کپسول خشخاش نیز مربوط به تیمار شاهد بود. این در حالی است که تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی منجر به تغییر معنی‌داری در سطح آلکالوییدپاپاورین در کپسول خشخاش در قیاس با تیمار شاهد نشد. محلولپاشی سوسپانسیون سویه‌های S2 و S36 به طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت آلکالوییدنوسکاپین در کپسول خشخاش شد. این در حالی است که از این نظر تیمارهای S7 و S25 اختلاف آماری معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول (۴)، نیز نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالوییدو بکارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوییدهای مورد مطالعه در کپسول خشخاش معنی‌دار است ($P<0.01$).



شکل ۳- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین کپسول خشخاش ($P<0.05$) (n=3)

Figure 3- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the poppy capsule ($P<0.05$) (n=3)

جدول ٤- جدول ANOVA اثرات باکتری های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای کپسول *P. somniferum*

Table 3- ANOVA table of the effects of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* capsule

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوییدها Alkaloids (A)	2	85.10**	2150.455
تیمار Treatment (T)	4	0.79**	19.980
تیمار* آلکالوئید A*T	8	0.60**	15.134
خطا Error	30	0.04	
کل Total	44		

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.
ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively

پژوهش‌های متعددی اظهار می‌دارند که عوامل PGPR از جمله باکتری‌های حل کننده فسفات، می‌توانند به عنوان الیسیتورهای زنده عمل کنند و منجر به القای تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شوند (Sekar and Kandavel, 2010). مثال‌های متعددی از ارزیابی اثرات این عوامل میکروبی مفید بر تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند توسط برخی گیاهان دارویی موجود است. به عنوان مثال، احمدزاده و همکاران (Ahmadzadeh *et al*., 2022) گزارش کردند که تیمار بذور و یا ریشه‌های گیاهچه‌های گیاه دارویی گل پریوش (*Catharanthus roseus*) با سویه ۱۶۹ از باکتری *Pseudomonas fluorescens* منجر به افزایش قابل توجهی در میزان آلکالوییدهای وین بلاستین[1] و وین کریستین[2] که از خاصیت قوی ضدسرطان برخوردارند، در قیاس با تیمار شاهد می‌شود. قربانپور و همکاران (Ghorbanpour *et al*., 2013) نیز نشان دادند که تیمار گیاه دارویی بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) با باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوییدهای هیزوسیامین[3] و اسکوپولامین[4] موجود در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه در قیاس با تیمار شاهد شد. همچنین مامتا و همکاران (Mamta *et al*., 2010) اظهار داشتند که تیمار بوته‌های شیرین برگ (*Stevia rebaudiana*) با باکتری‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از ریزوسفر این گیاه دارویی نه تنها منجر به افزایش رشد گیاهان شد، بلکه افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه‌ای چون استویوزید[5] و ربودیوزید–آ[6] را نیز سبب شد. بیشترین کارایی مربوط به سویه ۱۰۲۱۶ از باکتری *Burkholderia gladioli* بود که توانست میزان استویوزید و ربودیوزید–آ را به ترتیب ۱۵۰٪ و ۵۵۵٪ در هر گیاه در قیاس با تیمار شاهد افزایش دهد. بر طبق گزارش پراکاش و آرورا (Prakash and Arora, 2019)، تیمار بوته‌های گیاه دارویی نعنای وحشی (*Mentha arvensis*) با جدایه STJP از باکتری *Bacillus* sp. که از ریزوسفر *S. rebaudiana* جداسازی شده بود و از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود، منجر به افزایش عملکرد عصاره و مقدار منتول موجود در آن شد. بر طبق نتایج این پژوهش نیز ریزوباکترهای حل‌کننده فسفات معدنی مورد مطالعه توانستند به عنوان الیسیتورهای زنده بر میزان بیوسنتز آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین موجود در کپسول، ساقه، و برگ خشخاش به طور معنی‌داری تأثیر بگذارند. به این ترتیب نتایج حاصل در موافقت و همراستای مثال‌های ذکر شده است.

بنیلا و همکاران (Bonilla *et al*., 2014) گزارش کردند که عوامل PGPR می‌توانند به عنوان الیسیتورهای زنده منجر به افزایش سطح برخی آلکالوییدهای گیاه خشخاش (*P. somniferum*) شوند. این پژوهشگران به بررسی اثر تیمار بوته‌های خشخاش (*P. somniferum*) با جدایه‌های (N5.18) *Stenotrophomonas maltophilia*، (Aur9) *Chryseobacterium balustinum* و (N21.4) *P. fluorescens*، بر میزان آلکالوییدهای مورفین، تبایین، کدیین، و اوریپاوین[7] موجود در برگ (محلولپاشی) و ریشه (افزودن به خاک) پرداختند. بر طبق نتایج به دست آمده، مشخص شد که سویه‌های باکتریایی مختلف می‌توانند بر سطح آلکالوییدهای موجود در برگ و یا ریشه خشخاش اثرات متفاوتی نشان

1- Vinblastine
2- Vincristine
3- Hyoscyamine
4- Scopolamine
5- Stevioside
6- Rebaudioside-A
7- Oripavine

دهند. به گونه‌ای که محلولپاشی بوته‌های خشخاش با جدایه N5.18، منجر به افزایش معنی‌داری در سطح آلکالوییدهای مورفین، تبایین، و کدیین برگ شد ولی مقدار اوریپاوین کاهش معنی‌داری داشت. همچنین تیمار با جدایه N21.4 منجر به کاهش معنی‌داری در سطح مورفین و اوریپاوین برگ شد ولی سطح کدیین و تبایین افزایش یافت. این در حالی بود که در تیمار با جدایه N21.4، سطح مورفین، کدیین، و تبایین در ریشه افزایش ناچیزی داشت و سطح اوریپاوین بدون تغییر ماند. تیمار با جدایه N5.18، منجر به کاهش معنی‌داری در سطح تبایین، کدیین و اوریپاوین موجود در ریشه شد ولی میزان مورفین افزایش یافت. یافته‌های پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که سطح آلکالوییدهای مورد مطالعه (مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین) در برگ و کپسول بوته‌های خشخاش محلولپاشی شده با جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه یکسان نبود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه مشخص شد که میزان پاپاورین موجود در برگ و ساقه در قیاس با شاهد کاهش معنی‌داری داشت ولی میزان آن در کپسول تغییرات معنی‌داری نداشت. میزان مورفین موجود در برگ در تمامی تیمارهای باکتریایی به جز S36 افزایش معنی‌داری را در قیاس با شاهد منتج شد. در حالی که مقدار آن در کپسول حتی در تیمار با S36، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. در بررسی نوسکاپین نیز مشخص شد که میزان آن در برگ و ساقه در تمامی تیمارهای باکتریایی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت ولی در بررسی کپسول مشخص شد که تنها تیمارهای S36 و S2 منجر به افزایش معنی‌داری در آن شدند. همچنین مشخص شد که اثر متقابل نوع آلکالویید و بکارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوییدهای مورد مطالعه در کپسول، ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است. به این ترتیب نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در موافقت با یافته‌های سایر پژوهشگران است.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به منظور افزایش دستیابی به متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهان دارویی لزوماً نیازی به اعمال دستورزی‌های ژنتیکی نیست، بلکه با صرف هزینه‌های بسیار پایین‌تر، می‌توان با بکارگیری الیسیتورهای باکتریایی به این هدف دست یافت. در خصوص گیاه دارویی خشخاش نیز مشخص شد که با انتخاب سویه‌های باکتریایی سازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توان سطح آلکالوییدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین را در اندام‌های هوایی به طور چشمگیری افزایش داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری پرسنل محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع انگلیسی

1. Ahmadzadeh, M., Keshtkar, A.H., Moslemkhany, K., & Ahmadzadeh, M. (2022). Effect of the plant probiotic bacteria on terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway gene expression profiling, vinblastine and vincristine content in the root of *Catharanthus roseus*. *Molecular Biology Reports*, 49(11), 10357-10365. http://doi.org/10.1007/s11033-022-07841-z
2. Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R., & Facchini, P.J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells

after elicitor treatment. *Plant physiology*, 138 (1), 173-183. http://doi.org/10.1104/pp.105.059287

3. Algar, E., Gutierrez-Mañero, F.J., Bonilla, A., Lucas, J.A., Radzki, W., & Ramos-Solano, B. (2012). *Pseudomonas fluorescens* N21.4 metabolites enhance secondary metabolism isoflavones in soybean (*Glycine max*) calli cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (44), 11080-11087. http://doi.org/10.1021/jf303334q
4. Alikhani, H.A., Allah Dadi, I., Rashtbari, M., & Rajabpour, B. (2014). Applied methods of soil biology laboratory. University of Tehran Press. Tehran, Iran. 271 p. (In Persian)
5. Bennett, J.O., Yu, O., Heatherly, L.G., & Krishnan, H.B. (2004). Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (25), 7574-7579. http://doi.org/10.1021/jf049133k
6. Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, L.M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, L.D., Poutou-Piñales, R.A., Rivera-Hoyos, C.M., Díaz-Ariza, L.A., & Pedroza-Rodríguez, A.M. (2020). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*, 6(10), e05218. http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05218
7. Bonilla, A., Sarria, A.L.F., Algar, E., Muñoz Ledesma, F.J., Ramos-Solano, B., Fernandes, J.B., & Gutierrez Mañero, F.J., 2014. Microbe associated molecular patterns from rhizosphere bacteria trigger germination and *Papaver somniferum* metabolism under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 133-140.
8. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161 (5), 839-851. http://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3
9. Chen, Y., Fan, J.B., Du, L., Xu, H., Zhang, Q.H., & He, Y.Q. (2014). The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology* 84: 235-244. http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.014
10. Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., & Mauch, F. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular plant-microbe interactions*, 19 (10), 1062-1071. http://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062
11. Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52, 29-66. http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29
12. Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Khavazi, K. (2013) Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, 37:350–360. http://doi.org/10.3906/biy-1209-12
13. Ghoreishi, F.S., & Etemadifar, Z. (2017). Heavy metal removal by phosphate-solubilizing *Enterobacter xiangfangensis* isolated from rhizosphere. *Journal of Microbial World*, 10 (2), 145-156. (In Persian)

14. Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A., & Barrientos Casero, M.L. (2003). Systemic induction of terpenic compounds in *Digitalis lanata*. *Journal of Plant Physiology*, 160: 105– r130.
15. Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang. J., Gong, Y.X., & Yang, Y.F. (2010). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. Aquaculture International. 18(6): 1079-1091. http://doi.org/10.1007/s10499-010-9325-8
16. Kim, S.H., Jung, W.S., Ahn, J.K., Kim, J.A., & Chung, I.M. (2005): Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO_2 level and N application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (15), 2557-2566. http://doi.org/10.1002/jsfa.2294
17. Liscombe, D.K., &Facchini, P.J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 19 (2), 173-180. http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.012
18. Mamta, R.P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R.K., & Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46, 222-229.
19. Meos, A., Saks, L., Raal, A., 2017, Content of alkaloids in ornamental *Papaver somniferum* L. cultivars growing in Estonia. *The Proceedings of the* Estonian Academy of Sciences, 66 (1), 34. http://doi.org/10.3176/proc.2017.1.04
20. Paulsen, J., Yahyazadeh, M., Hänsel, S., Kleinwächter, M., Ibrom, K., & Selmar, D. (2015). 13,14-dihydrocoptisine--the genuine alkaloid from *Chelidonium majus*. *Phytochemistry*, 111, 149-153. http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.006
21. Prakash, J., & Arora, N.K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotech.*, 9(4), 126. http://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5
22. Ramos-Solano, B., Barriuso Maicas, J., La Pereyra de Iglesia, M.T., Domenech, J., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98 (4), 451-457. http://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0451
23. Ramos-Solano, B., Algar, E., García-Villaraco, A., García-Cristóbal, J., Lucas García, J.A., & Gutierrez-Mañero, F.J. (2010): Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. *Osumi*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (3), 1484-1492. http://doi.org/10.1021/jf903299a
24. Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
25. Sekar, S., & Kandavel, D. (2010) Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants for phytochemicals. *Journal of Phytology*, 2(7), 91-100.
26. Silva, H.S.A., Da Romeiro, R.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.D.A., Pereira, M.C.B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29 (2), 288-295. http://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00163-4

27. Sperber, J.I. (1958). Solubilization of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9, 782-787. http://doi.org/10.1071/AR9580782

28. Srivasatava, P. (2022). Chapter 13 Use of alkaloids in plant protection. In Ravindra Soni, Deep Chandra Suyal, Reeta Goel (Eds.): Plant Protection: De Gruyter, pp. 337–352

29. Srivastava, N.K., & Sharma, S. (1990). Effect of triacontanol on photosynthesis, alkaloid content and growth in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Plant Growth Regulation*, 9 (1), 65-71. http://doi.org/10.1007/BF00025280

30. Szabó, B., Lakatos, A., Koszegi, T., & Botz, L. (2008): Investigation of abiogenic stress-induced alterations in the level of secondary metabolites in poppy plants (*Papaver somniferum* L.). *Acta biologica Hungarica*, 59 (4), 425-438. http://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.4.4

31. Tavakkoli, Z. & Assadi, M. (2017). Papaveraceae. In: Flora of Iran. Vol: 127. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran, Iran, P 79. (In Persian)

32. van Loon, L.C., Bakker, P.A., & Pieterse, C.M. (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36, 453-483. http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453

33. Yazdani, D., Rezazadeh, S., & Shahnazi, S. (2003). Review of poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 2(5), 1-12 (In Persian)

نسخه پیش انتشار

نسخه پیش انتشار