ترکیب عناصر غذایی، میزان اسانس و مقدار تیمول گیاه دارویی مرزه (*Satureja hortensis* L.) مایه زنی شده با *Azospirillum irakense* و *Pseudomonas putida* در سطوح مختلف نیتروژن

نیّر بشیری فر[1*]، ناصر علی اصغرزاد[2]، سعید زهتاب سلماسی[3]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/۹/۱۷

۱-کارشناسی ارشد گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز
۲-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳-استاد گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Nayer_bashirifar@yahoo.com

چکیده

مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* L.، جزء گیاهان دارویی بوده و اسانس و ترکیبات این گیاه با خاصیت ضد باکتری و ضد قارچ در پزشکی و صنایع غذایی نیز مهم است. در یک آزمایش گلدانی اثر باکتری‌های *Azospirillum irakense* (A) و *Pseudomonas putida* (P) و سطوح نیتروژن شامل عدم مصرف نیتروژن (N_0)، مصرف ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (N_1) و مصرف ۱٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (N_2) بر جذب عناصر غذایی، تولید اسانس و مقدار تیمول در اسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو باکتری بر درصد اسانس اثر مثبت و معنی-دار داشته و موجب افزایش آن شدند. مقدار اسانس، در حضور باکتری (A^+)، ۰/۸۳۲ درصد بوده و نسبت به عدم حضور باکتری (A^-)، ۷۹ درصد و در حضور باکتری (P^+) نسبت به عدم حضور باکتری (P^-)، ۳۵ درصد افزایش یافت. مصرف کود نیتروژن موجب افزایش درصد اسانس گردید ولی این افزایش در تیمار N_2 کاهش معنی‌داری یافت. هرچند هر دو باکتری و کود نیتروژن باعث افزایش مقدار تیمول شدند، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. مایه زنی با باکتری *A. irakense* غلظت نیتروژن بخش هوایی را ۹/۱٤٪ افزایش داد. حضور باکتری *P. putida* و *A. irakense* به ترتیب غلظت پتاسیم بخش هوایی و ریشه را ۱۱/٤٪ و ۱۸/۸٦٪ افزایش دادند. حضور باکتری *A. irakense* باعث کاهش غلظت عناصر فسفر و کلسیم در بخش هوایی و باکتری *P. putida* ، غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه را به ترتیب ۲۱/۵۵٪ و ٤۳/۵۲٪ افزایش داد.

واژه های کلیدی: آزوسپیریلیوم، اسانس، باکتری، پسودوموناس، تیمول، مرزه

Elemental Composition, Essential Oil and Thymol Content of Savory (*Satureja hortensis* L.) Inoculated with *Azospirillum irakense* and *Pseudomonas putida* at Different Nitrogen Levels

Nayer Bashirifar[1*], Nasser Aliasgharzad[2], Saeed Zehtab Salmasi[3]

Received: November 11, 2014 Accepted: December 8, 2015
1-MSc Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University, of Tabriz, Iran.
2-Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tbriz, Iran.
3-Prof., Dept. of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tbriz, Iran.
* Corresponding Author: Nayer_bashirifar@yahoo.com

Abstract

Savory (*Satureja hortensis* L.) is one of the important medicinal plants, which is used in pharmaceutical and perfume industry. In a pot experiment, effects of *Azospirillum irakense* (A) and *Pseudomonas putida* (P) and nitrogen levels (no nitrogen (N_0), N_1: 80 mg/kg, and N_2: 160 mg/kg) were investigated on elemental composition, essential oil and thymol content of savory. The results showed that both bacteria had a significant and positive effect on essential oil percentage. In the presence of *A. irakense* (A^+), essential oil was 0.832% and increased by 44% compared to the absence of this bacterium (A^-). Also, in the presence of *P. putida* (P^+), essential oil increased 26% by weight compared to the absence of this bacterium (P^-). Application of nitrogen fertilizer, also enhanced the essentiol oil percentage, but it was significantly decreased in N_2 level. Both bacterial strains and nitrogen fertilizer increased the thymol content, but the increase was not significant. *A.irakense* increased the shoot nitrogen concentration up to 8.37%. *P.putida* and *A.irakense* increased shoot and root K concentration by 10.24% and 15.86%, respectively. *A.irakense* deacreased shoot P and Ca concentration and *P.putida* increased shoot and root P concentrations by 17.73% and 30.32%, respectively.

Keywords: *Azospirillum*, Essential oil, *Pseudomonas*, *Satureja hortensis* L., Thymol

مقدمه

کیفیت خاک نه تنها به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن وابسته است، بلکه ارتباط بسیار نزدیکی با خصوصیات بیولوژیکی آن نیز دارد (ابهین و همکاران ۲۰۰۶). تعداد قابل توجهی از گونه‌های باکتری و قارچی خاک، دارای روابط کارکردی با گیاهان بوده و اثرات مفیدی بر رشد آن‌ها دارند. در حال حاضر به دلیل معایب کودهای شیمیایی، کودهای بیولوژیک به عنوان جایگزین برای این کودها به منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات در کشاورزی پایدار مطرح شده‌اند. کودهای بیولوژیک در حقیقت موادی شامل انواع مختلف ریز موجودات آزادزی هستند که توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیر قابل دسترس به فرم قابل دسترس در طی فرایندهای بیولوژیکی

داشته و منجر به توسعه سیستم ریشه‌ایی می‌گردد. این گروه از باکتری‌ها علاوه بر افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی خاک از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، محلول کردن فسفر و پتاسیم و مهار عوامل بیماری‌زا، با تولید ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاه از جمله اکسین، جیبرلین و سیتوکنین عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (وسی ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت و نقش گیاهان دارویی در صنایع مختلف، نکته حائز اهمیت در تولید و پرورش این گونه‌های ارزشمند، افزایش تولید زیست توده آن‌ها بدون کاربرد نهاده‌های مضر شیمیایی از جمله کودهای شیمیایی و سموم دفع آفات می‌باشد. گیاهان دارویی معمولا" به طور مستقیم مورد استفاده انسان قرار می‌گیرد و در برخی مواقع استفاده از کودهای شیمیایی و آفت کش‌ها ممکن است باعث بروز مشکلاتی شود در نتیجه مدیریت صحیح استفاده از کودهای زیستی در گیاهان دارویی در بهبود عملکرد و کیفیت آن‌ها تأثیرگذار خواهد بود (عبدالجلیل و همکاران ۲۰۰۷). مرزه گیاهی است یک ساله با نام علمی *Satureja hortensis L.* بوده که در پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاه دارویی مرزه ضدعفونی کننده دستگاه گوارشی و اشتهاآور بوده و برای درمان دل درد و رفع ناراحتی‌های کبد و ریه توصیه شده و برای رفع بلغم مؤثر است (امید بیگی ۱۳۸۸). مهم‌ترین عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان نیتروژن، فسفر و پتاسیم است که با استفاده از کودهای شیمیایی فراهم می‌شود. عناصر غذایی از جمله نیتروژن با تأثیری که بر رشد رویشی و زایشی گیاهان دارویی دارند، تغییراتی را در عملکرد گیاهان ایجاد نموده و کمیت و کیفیت مواد مؤثره را تحت تأثیر قرار می‌دهند (گراندوالد و همکاران ۱۹۹۶). هرچند که مصرف کود-های نیتروژنی، نیتروژن مورد نیاز را برای بهبود تولید فراهم می‌کند، ولی به سبب آبشویی بیش از حد نیترات منجر به آلودگی محیط زیست می‌شود. به دلیل مضرات این نوع کودها، امروزه می‌توان از کودهای زیستی و میکروارگانیسم‌ها برای فراهم کردن این عناصر استفاده کرد. همچنین به نظر می‌رسد با استفاده از این میکروارگانیسم‌ها می‌توان برای گیاهان دارویی محیط کشت و بستر رشد مناسب تهیه کرده و موجب تأثیر مثبت در سنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله اسانس‌ها گردید. در این راستا تعدادی از محققان در مورد تأثیر میکروارگانیسم‌ها در میزان عناصر غذایی و اسانس در این گیاهان مطالعاتی را انجام داده‌اند. امین۱۹۹۷، گزارش کرد که رشد گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*)، رازیانه (*Feoniculum vulgare*) و زیره سیاه در نتیجه تلقیح بذر با *Azospirillum* و *Azotobacter* همراه با نصف مقدار توصیه شده کود شیمیایی، با حالتی که کل مقدار توصیه شده کودهای شیمیایی بدون مصرف این دو باکتری استفاده شوند، برابری می‌کند. بانچیو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند تلقیح گیاه پونه کوهی (*Origanum vulgare*) با *P. fluorescens* و *B. subtillis* ، افزایش معنی‌داری را در عملکرد اسانس ایجاد کرد. داس و همکاران (۲۰۰۸) نیز به دنبال کاربرد کودهای زیستی در گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* مشاهده کردند که میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم قابل دسترس در خاک به طور معنی‌دار افزایش یافت. لیتی و همکاران (۲۰۰٦)، نیز گزارش کردند که *Azotobacter* اثر مثبتی در افزایش میزان اسانس در گیاه رزماری داشته و بیش‌ترین میزان اسانس در نتیجه مصرف *Azotobacter vinelandii* به دست آمد. کومار و همکاران (۲۰۰۹)، گزارش کردند کاربرد *Azospirillum* همراه با ۹۳/۷۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و فسفر باهم در گیاه دارویی درمنه (*Artemisia pallens* L.)، سبب افزایش عملکرد اسانس گیاه شده و کاربرد کود زیستی *Azospirillum* تأثیری بر اجزای اسانس گیاه نشان نداد. حبیبی (۱۳۸٦)، بیان کردند استفاده از کود نیتروژن در گیاه دارویی آویشن (*Thymus vulgaris*)، در میزان اسانس و تیمول تأثیر معنی‌داری ایجاد نکرد. در همین رابطه کریشمامورتی و مادالاگر (۲۰۰۰)، طی آزمایشی دریافتند که کودهای شیمیایی نیتروژن و فسفر تأثیری

در میزان تیمول اسانس زنیان نداشتند. چون این گیاهان به طور مستقیم مورد استفاده انسان قرار می‌گیرند، در نتیجه بهتر است به جای کودهای شیمیایی که دارای مضرات زیادی برای انسان و محیط زیست هستند، از کودهای زیستی و میکروارگانیسم‌ها برای تأمین نیاز-های گیاه استفاده کرد و گیاهان با کیفیت و سالم‌تری تولید نمود. در مورد گیاهان دارویی مطالعات زیادی از جنبه‌های مختلف صورت گرفته ولی در این میان اثر باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و حل کننده فسفات، از جمله *Azospirillum* به عنوان تأمین کننده نیتروژن و *Pseudomonas* به عنوان تأمین کننده فسفر، بر روی میزان اسانس و محتوی تیمول در مرزه کمتر مطالعه شده است. چون تیمول موجود در اسانس مرزه ماده‌ای مهم بوده و از نظر پزشکی و داروسازی فواید زیادی دارد، افزایش تولید این ماده توسط این باکتری‌ها سودمند خواهد بود. با توجه به اهمیت نیتروژن در رشد گیاه و تأثیر مثبت کودهای زیستی در تولید گیاهان دارویی، بررسی تأثیر کود شیمیایی نیتروژن در حضور و عدم حضور باکتری‌های *Azospirillum* و *Pseudomonas* بر فراهمی عناصر غذایی و میزان اسانس و تیمول به عنوان یک ماده مؤثر مهم این گیاه ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی زادمایه باکتری‌ها

باکتری *Azospirillum irakense* از گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و باکتری *Pseudomonas putida* از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. برای تهیه زادمایه باکتری *A. irakense* محیط کشت آر سی[1] (باشان و همکاران ۱۹۸۹) و برای باکتری *P. putida* از محیط کشت کینگ ب[2] استفاده شد (کینگ و همکاران ۱۹۵٤). پس از تعیین جمعیّت باکتری‌ها، سوسپانسیون باکتری در نسبت مناسب با پودر پرلیت استریل با سایز کمتر از mm ۰/۵ (۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع به ازای ۱۰ گرم پرلیت خشک)، مخلوط گردید تا تراکم جمعیّت $۱۰^{۷}$ سلول در گرم پرلیت مرطوب بدست آید. OD_{600} سوسپانسیون‌های باکتریائی *A. irakense* و *P. putida* به هنگام افزودن به پرلیت، به ترتیب ۰/۹۰۳ و ۱/۲۷۵ بود. برخی از خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های مورد استفاده، در جدول ۱ و ۲ بیان شده-اند.

آماده سازی خاک برای کشت گلدانی

خاک مورد نظر برای این آزمایش یک خاکی با بافت شن لومی بوده و از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز از عمق ۲۵-۰ سانتی‌متر برداشت شده و پس از عبور از غربال ٤/۷ میلی‌متر، به مدت دو ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار در اتوکلاو استریل شد (علی‌اصغرزاده و همکاران ۲۰۰۱). خاک مورد نیاز برای اندازه‌گیری برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی (جدول ۳)، از غربال ۲ میلی‌متر و خاک مورد نیاز برای کشت گیاه از غربال ٤/۷ میلی‌متر عبور داده شد. بافت خاک به روش هیدرومتر (گی و بادر ۱۹۸٦)، pH و EC_e در عصاره گل اشباع (مک‌لین ۱۹۸۲)، درصد کربن آلی به روش والکلی-بلک اصلاح شده (نلسون و سومرز ۱۹۸۲)، مقدار پتاسیم قابل جذب با عصاره‌گیر استات آمونیوم (گوپتا ۲۰۰۰)، مقدار فسفر قابل جذب با عصاره‌گیر بی-کربنات سدیم (اولسن و سومرز ۱۹۸۲) و رطوبت ظرفیت مزرعه با استفاده از دستگاه صفحات فشار (کمپل و همکاران ۱۹۸٦) تعیین گردید.

1. Rogo Congo
2 . King B

جدول ۱- برخی از خصوصیات محرک رشدی باکتری *Azospirillum irakense* مورد استفاده (قادری ۱۳۸۹)

توان تولید ACC دآمیناز	میزان انحلال فسفات معدنی نامحلول ($mg.l^{-1}$) بعد از ۱۲۰ ساعت	میزان نیتروژن تثبیت شده ($nmol\ C_2H_4.h^{-1}.ml^{-1}$)	میزان اکسین در حضور تریپتوفان (mg IAA/L)	فعالیت نیترات رداکتاز ($mg\ NO_2_N.l^{-1}.48h^{-1}$)
+	۱۹/۱۹	٦۰/٦٤	۹/٥۲	۷/۰۳۷

جدول ۲- برخی از خصوصیات محرک رشدی باکتری *Psedomonas putida* مورد استفاده

توانایی حل کنندگی فیتات(فسفر آلی) میلی‌گرم در لیتر	توانایی حل کنندگی تری کلسیم فسفات میلی گرم در لیتر
٦۲/۲۲	۳۷/۹۸

جدول ۳- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

بافت	رطوبت وزنی معادل ظرفیت مزرعه ای (FC)	pH*	OC%	ECe* (دسی زیمنس بر متر)	K (میلی‌گرم در کیلوگرم)	P (میلی‌گرم در کیلوگرم)
شن لومی	۱۲	۷/۸۱	۰/۱۲۸	۱/۱	۱۸۲/٦	٤/٤

* در عصاره گل اشباع

کشت و اعمال تیمارها

گیاه مورد نظر مرزه بوده (*Satureja hortensis* L.) که از ژنوتیپ بومی تبریز استفاده شد. زادمایه باکتری به صورت یک لایه یک سانتی‌متری (۵ گرم) در عمق دو سانتی‌متری از سطح خاک پخش شده و سپس روی آن خاک اضافه شده و بذور ضدعفونی شده به تعداد ۵۰ عدد در هر گلدان کشت شد (گلدان‌ها دارای ارتفاع حدود ۲۰ سانتی‌متر و قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر بودند). در هنگام کاشت بذور، رطوبت تمامی گلدان‌ها در FC ۰/۹- ۰/۸ تنظیم گردید و جهت آبیاری با توزین گلدان‌ها، از آب مقطر به صورت یک روز در میان استفاده شد. با توجه به جدول نیازهای کودی و با توجه به آزمون خاک، K و P در همه گلدان‌ها بطور یکنواخت اضافه شد. نیتروژن در سه سطح صفر، نصف توصیه (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و توصیه کامل (۱٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) از منبع اوره تأمین گردید. به ازای هر گلدان، فسفر از منبع سوپر فسفات تریپل (۱۷٤ میلی‌گرم در کیلوگرم) و پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم (۲٦۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) اضافه شد. گیاهان تا آخر مرحله رویشی (قبل از گلدهی) که ۱۲۰ روز طول کشید، رشد یافته و در انتهای مرحله رویشی برداشت شدند. برای جداسازی ریشه‌ها، بعد از برداشت بخش هوایی، خاک گلدان‌ها را روی پلاستیک خالی نموده و بعد از گذشت مدت زمانی که خاک نیمه مرطوب شد، از غربال عبور داده و ریشه‌ها از خاک جدا شدند.

تجزیه شیمیایی گیاه و اندازه‌گیری غلظت عناصر

جهت اندازه‌گیری یون‌های کلسیم، منیزیم، پتاسیم و فسفر از هضم به روش خشک سوزانی استفاده گردید. غلظت پتاسیم به روش فلیم فتومتری[1]، کلسیم و منیزیم با دستگاه جذب اتمی[2] و فسفر به روش وانادات- مولیبدات (رنگ سنجی) و با استفاده از

1. Flame Photometer
2. Atomic Absorption

دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نیتروژن موجود در بخش هوایی و ریشه گیاه نیز در دستگاه کجلدال اندازه‌گیری شد (والینگ و همکاران ۱۹۸۹).

استخراج اسانس از گیاه و اندازه‌گیری تیمول

استخراج اسانس، از روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر که کلونجر[1] نام دارد، صورت گرفت. در این روش آب و اسانس با هم تقطیر شده و به دنبال آن اسانس به سهولت خارج می‌شود. قبل از آغاز عمل اسانس‌گیری، رطوبت وزن معینی از بخش هوایی با استفاده از دستگاه رطوبت سنج دیجیتالی (مدل MA 45) تعیین گردید. قطعات گیاه در بالن به مدت چهار ساعت جوشانده شده و در نهایت پس از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان خاموش کردن دستگاه، حجم اسانس جمع شده قرائت شد، سپس اسانس‌ها در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری جمع آوری شد. به علت چسبندگی اسانس به دیواره لوله شیشه‌ای اسانس‌گیر، از حلالی به نام دی اتیل اتر استفاده شده که به راحتی اسانس را در خود حل کرده و خود در اثر حرارت تصعید شده و اسانس بر جای می‌ماند. جهت اندازه گیری درصد اسانس از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{درصد اسانس} = \frac{\text{وزن اسانس}(gr)}{\text{وزن نمونه خشک}(gr)} * 100 \quad [۱]$$

پس از اتمام عمل اسانس‌گیری، اسانس جمع-آوری شده در قسمت مدرج دستگاه، جهت تعیین مقدار تیمول موجود در اسانس به یک لوله آزمایش منتقل شد. جهت خروج بهتر و استخراج تمام اسانس گرفته شده از دستگاه، ۲ میلی‌لیتر دی کلرومتان ۳۶ درجه، در قسمت مدرج دستگاه ریخته، سپس اسانس حل شده در دی کلرومتان را در لوله شیشه‌ای ریخته و مقداری سولفات سدیم بی آب به آن افزوده شد تا کاملا" عاری از آب شود. سپس بشر آنقدر تکان داده شد تا دی کلرومتان به طور کامل تبخیر گردد. جهت تسریع این کار می‌توان، بشر را درون یک ظرف حاوی آب ولرم تکان داد. سپس اسانس آبگیری شده به بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد. در نهایت محتویات بالن ژوژه با استفاده از اتانول ۹۰ درصد به حجم رسانده شد. مقدار ۵ میلی‌لیتر را داخل بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد به آن افزوده و در آخر حجم بالن ژوژه را با افزودن آب مقطر به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول اخیر را به داخل دکانتور ۲۵ میلی‌لیتری انتقال داده به ترتیب مقادیر ۱۱/۲۵ میلی‌لیتر آب، ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۳/۵ درصد و ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول آمینوآنتی-پیرین ۱ درصد به آن افزوده شد. دکانتور را کمی تکان داده تا محتویات داخل آن به خوبی مخلوط گردد. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم هگزا سیانوفرات (III) ۲ درصد را به محتویات دکانتور اضافه کرده و مجددا" تکان داده شد. محلول حاصل را به مدت ۵ دقیقه به حال خود رها نموده تا واکنش امرسون صورت گیرد. پس از طی این مدت با افزودن ۶/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم به محلول داخل دکانتور، ترکیبات فنلی اکسایش یافته استخراج گردید. سپس با استفاده از قیف شیشه‌ای و تکه‌ای پنبه آغشته به کلروفرم، داخل استوانه ۱۰ میلی‌لیتری صاف می‌شود. در نهایت حجم بالن ژوژه مزبور را با کلروفرم به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده (محلول نمونه) و سپس در مقابل حلال کلروفرم خالص(محلول شاهد)، میزان جذب نور ترکیبات رنگی حاصل در طول موج ٤٥٥ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. ترکیبات فنلی موجود در اندام هوایی مرزه با استفاده از میزان شدت جذب محلول ۱ درصد تیمول در سل ۱ سانتی‌متری ($E^{1\%}_{1cm}$) اندازه گرفته شده و سپس مقدار تیمول از طریق رابطه ذیل در نمونه مرزه به دست آمد (قاسمی دهکردی ۱۳۸۸):

1. Clevenger

مقدار تیمول= $(E^{1\%}_{1\,cm} \times b)$ / (٦/٢٥×E) [٢]

E = میزان جذب محلول نمونه آماده شده

b = وزن نمونه گیاه (گرم)

$E^{1\%}$ = جذب محلول ۱ درصد تیمول در سل ۱ سانتی متری

طرح آزمایش و تجزیه‌های آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا" تصادفی با چهار تکرار انجام شد. فاکتور اول و دوم به ترتیب، به صورت حضور (A^+) و عدم حضور (A^-) باکتری *A. irakense* و حضور (P^+) و عدم حضور (P^-) باکتری *P. putida* و فاکتور سوم نیتروژن در سه سطح عدم مصرف نیتروژن (N_0)، مصرف نصف نیتروژن (N_1) و مصرف کامل نیتروژن (N_2) صورت گرفت. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزارهای MSTATC و SPSS انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ٤)، کاربرد باکتری *A. irakense* و *P. putida* و همچنین مصرف نیتروژن، بر درصد و عملکرد اسانس در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده و سبب افزایش درصد و عملکرد اسانس شد. همچنین این تیمار ها موجب افزایش مقدار تیمول شدند ولی این افزایش معنی دار نبود.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر مایه‌زنی توسط باکتری و سطوح مختلف نیتروژن بر درصد اسانس، عملکرد اسانس و مقدار تیمول در گیاه دارویی مرزه تابستانه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد اسانس	عملکرد اسانس	مقدار تیمول
A	۱	۱/٦٢٣ **	۰/۰۱۷ **	۰/۰۰۲ ns
P	۱	۰/٤٥٦ **	۰/۰۰٥ **	۰/۰۰۱ ns
A*P	۱	۰/۰۲۳ ns	۰/۰۰۰ **	۰/۰۰۰ ns
نیتروژن (N)	۲	۰/۸۲٤ **	۰/۰۱٤ **	۰/۰۰۱ ns
A*N	۲	۰/۰۰۷ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۰۰ ns
P*N	۲	۰/۰۱۲ **	۰/۰۰۰ **	۰/۰۰۰ ns
A*P*N	۲	۰/۰٤۲ *	۰/۰۰۰ ns	۰/۰۰۰ ns
خطای آزمایش	۳٦	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱
CV%		۱۷/٥٦	۱٦/۳۲	۱۱/٦٤

** ، * و ns معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ٥٪ و غیر معنی دار میباشد.

A: *Azospirillum* P: *Pseudomonas*

با توجه به جدول ٥، درصد و عملکرد اسانس در تیمار A^+ به ترتیب، ۰/۸۳۳ و ۰/۰۷٤ بود. همچنین درصد و عملکرد اسانس در تیمار P^+ به ترتیب ۰/۷٤۷ و ۰/۰٦٥ بوده و نسبت به تیمار P^-، ۳٥ و ٤٤ درصد افزایش یافت. بر اساس جدول ٦ اثر متقابل دو باکتری نیز معنی‌دار بوده و بیش‌ترین درصد در هر دو مربوط به تیمار A^+P^+ بود.

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیر مایه‌زنی باکتری‌های *Azospirillum* و *Pseudomonas* بر درصد اسانس، عملکرد اسانس و محتوای تیمول اسانس مرزه تابستانه

تیمارها	میانگین		
	درصد اسانس	عملکرد اسانس (گرم در گلدان)	مقدار تیمول (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه)
A^-	۰/٤٦٥ b	۰/۰۳٦ b	۰/۳۲۰ a
A^+	./۸۳۳ a	۰/۰۷٤ a	۰/۳۳۳ a
P^-	۰/۵۵۲ b	۰/۰٤۵ b	۰/۳۲۲ a
P^+	۰/۷٤۷ a	۰/۰٦۵ a	۰/۳۳۰ a

حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون LSD است.

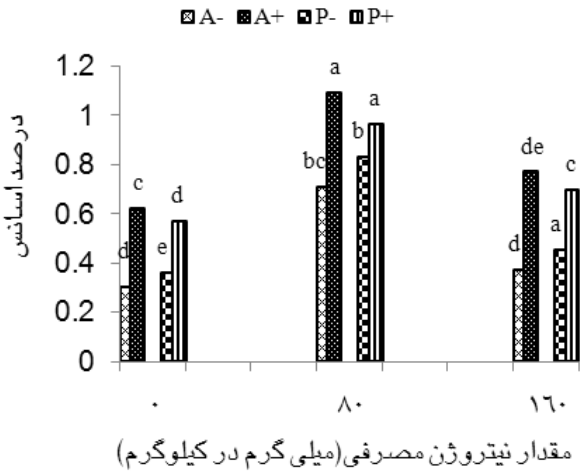
A: *Azospirillum* P: *Pseudomonas*

جدول ۶- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری دو گونه باکتری بر درصد اسانس، عملکرد اسانس و محتوای تیمول اسانس مرزه تابستانه

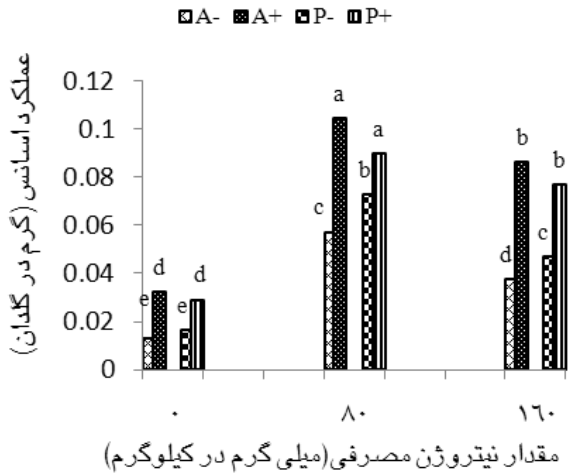
تیمارها		میانگین		
		درصد اسانس	عملکرد اسانس (گرم در گلدان)	مقدار تیمول (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه)
A^-	P^-	۰/۳۹٤ d	۰/۰۲۹ d	۰/۳۱٤ a
	P^+	۰/۵۳۷ c	۰/۰٤۳ c	۰/۳۲۵ a
A^+	P^-	۰/۷۱ b	۰/۰٦۱ b	۰/۳۲ a
	P^+	۰/۹۵۷ a	۰/۰۸۷ a	۰/۳۳۵ a

حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون LSD است.

به علاوه با توجه به مقایسه میانگین، اثرات متقابل باکتری *A. irakense* و نیتروژن همچنین باکتری *P. putida* و نیتروژن بر درصد اسانس معنی-دار بوده و بیش‌ترین درصد مربوط به تیمارهای A^+N_1 و P^+N_1 با ۱/۰۹٤ و ۰/۹۷۱ درصد به دست آمد (شکل ۱). در مورد عملکرد اسانس نیز این اثرات متقابل معنی-دار بوده و همانند درصد اسانس، تیمارهای A^+N_1 و P^+N_1 بیش‌ترین عملکرد را ایجاد کردند (شکل ۲). در مورد باکتری‌های تأمین کننده نیتروژن، از جمله *Azospirillum* که یک باکتری همیار است، برای فراهم کردن نیتروژن برای گیاه، ابتدا باید نیاز اولیه نیتروژن باکتری را فراهم کنیم. به همین دلیل است که در این تحقیق بیش‌ترین اثر این باکتری در سطح اول و عدم مصرف نیتروژن به دست نیامده، بلکه در سطح دوم نیتروژن به دست آمده و با افزایش نیتروژن به سطح سوم اثر منفی مشاهده شد. همچنین در راستای همین شکل مشخص می‌شود که مصرف نیتروژن تأثیر معنی-داری بر درصد اسانس داشت به گونه‌ای که بیش‌ترین درصد اسانس مربوط به تیمار N_1 و کمترین اسانس مربوط به تیمار N_0 بود و با افزایش میزان نیتروژن به ۱٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، درصد اسانس کاهش یافت که دلیل این امر در زیر بیان شده است.



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد اسانس مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۲- مقایسه میانگین عملکرد اسانس مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*

با توجه به جدول ۵، کاربرد این دو باکتری موجب افزایش تیمول شد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. در حضور باکتری *Azospirillum* میانگین مقدار تیمول از ۰/۳۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه (شاهد بدون باکتری)، به مقدار ۰/۳۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه و در حضور باکتری *Pseudomonas* میانگین مقدار تیمول از ۰/۳۲۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه (شاهد بدون باکتری)، به ۰/۳۳۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر گیاه افزایش یافت ولی این افزایش از نظر آماری غیر معنی‌دار بود. همچنین کاربرد نیتروژن به صورت کود اوره (N_2)، میانگین مقدار تیمول را از ۰/۳۱۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم به ۰/۳۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم افزایش داد که این افزایش نیز معنی‌دار نبود. اثرات متقابل دوجانبه نبز بر این صفت غیر معنی‌دار بود.

غلظت عناصر

بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار A^+ باعث افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن بخش هوایی به اندازه ۹/۱۴٪ شده ولی عناصر فسفر، کلسیم و منیزیم بخش هوایی را کاهش داد. در مقابل، تیمار P^+ اثر معنی‌دار بر عناصر پتاسیم، فسفر، کلسیم و منیزیم بخش هوایی داشته و به ترتیب آن‌ها را ۱۱/۳۸، ۲۱/۵۵، ۱۳ و ۱۲/۵۳٪ افزایش داد ولی تأثیر معنی‌دار بر غلظت نیتروژن نداشت (جدول ۷). همچنین اثرات متقابل دو باکتری *A. irakense* و *P. putida* ، بر عناصر نیتروژن، پتاسیم، فسفر، کلسیم و منیزیم معنی‌دار بوده و بیش‌ترین غلظت نیتروژن در تیمار A^+P^- (۱/۱۳۶٪) و در بقیه عناصر، بیش‌ترین غلظت در تیمار A^-P^+ به دست آمد (جدول ۸).

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی بخش هوایی درگیاه مرزه تابستانه در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های *A. irkense* و *P.putida*

تیمارها	درصد نیتروژن بخش هوایی	درصد پتاسیم بخش هوایی	درصد فسفر بخش هوایی	کلسیم بخش هوایی (میلی‌گرم در گرم)	منیزیم بخش هوایی (میلی‌گرم در گرم)
A^-	۱/۰۰۶ b	۳/۱۵۷ a	۰/۲۷۲ a	۸/۳۸۸ a	۳/۰۹۷ a
A^+	۱/۰۹۸ a	۳/۳۸۳ a	۰/۲٤۲ b	۷/۱۸ b	۲/۷۳٤ b
P^-	۱/۰۵۲ a	۳/۰۹٤ b	۰/۲۳۲ b	۷/۳۰٦ b	۲/۷۵۲ b
P^+	۱/۰۵۳ a	۳/٤٤٦ a	۰/۲۸۲ a	۸/۲٦۲ a	۳/۰۹۷ a

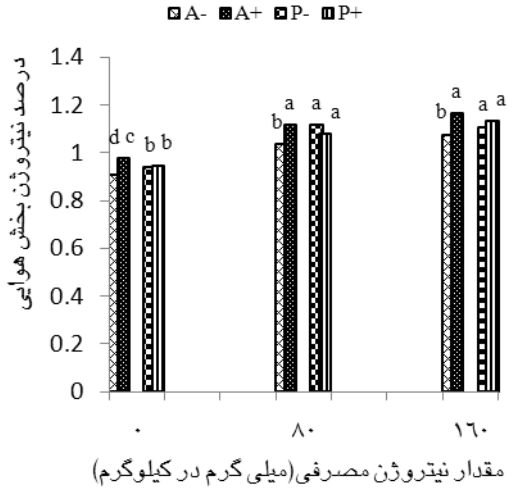
حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۸- مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی بخش هوایی گیاه مرزه تابستانه در تلقیح توأم باکتری‌های *A. irkense* و *P.putida*

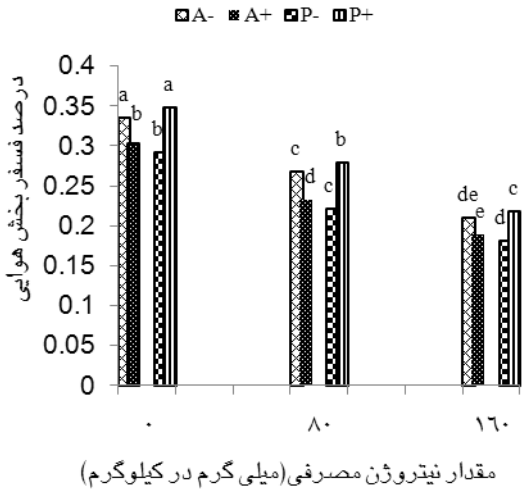
تیمارها		درصد نیتروژن بخش هوایی	درصد پتاسیم بخش هوایی	درصد فسفر بخش هوایی	کلسیم بخش هوایی (میلی‌گرم در گرم)	منیزیم بخش هوایی (میلی‌گرم در گرم)
A^-	P^-	۰/۹٦۸ c	۲/۸۷۵ a	۰/۲٤۲ bc	۷/۸۵ ab	۳/۰۰٦ a
	P^+	۱/۰٤۳ b	۳/٤۳۹ a	۰/۳۰۲ a	۸/۹۲٦ a	۳/۱۸۹ a
A^+	P^-	۱/۱۳٦ a	۳/۳۱۳ a	۰/۲۲۲ c	٦/۷٦۲ b	۲/٤۹۸ b
	P^+	۱/۰۵۹ a	۳/٤۵٤ a	۰/۲٦۲ b	۷/۵۹۸ b	۲/۹٦۹ a

حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون LSD است.

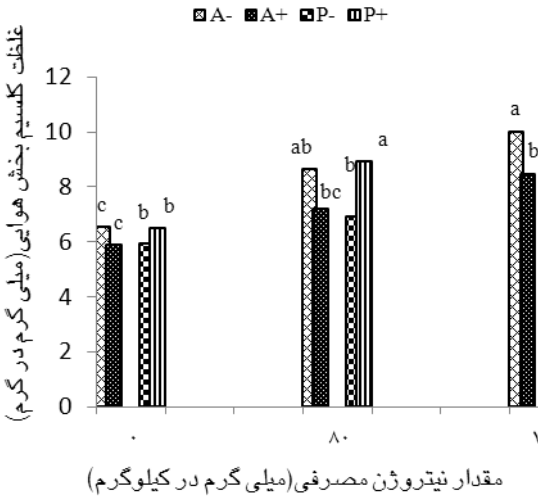
به علاوه، بر اساس مقایسه میانگین، اثرات متقابل دو جانبه نیتروژن و باکتری *A. irakense* بر غلظت نیتروژن بخش هوایی معنی‌دار بوده و بر این اساس تیمار A^+N_2 بیش‌ترین درصد نیتروژن (۱/۱٦۲٪) را داشت ولی اختلاف معنی‌دار با تیمار A^+N_1 نداشت (شکل ۳). همچنین اثرات متقابل دو جانبه نیتروژن و این باکتری بر عناصر فسفر، کلسیم و منیزیم بخش هوایی نیز معنی‌دار بوده و به ترتیب بیش-ترین مقادیرفسفر، کلسیم و منیزیم به ترتیب مربوط به تیمارهای A^-N_0 (۰/۳۳٦٪)، A^-N_2 (۱/۰۰۷ میلی‌گرم در گرم) و A^-N_2 (۳/۷۵۸ میلی‌گرم در گرم) اختصاص یافت (شکل‌های ٤، ۵ و ٦). بر اساس همین شکل‌ها، اثر متقابل باکتری *P. putida* و نیتروژن نیز معنی‌دار بوده و بیش‌ترین غلظت‌های نیتروژن، فسفر، کلسیم و منیزیم به ترتیب در تیمارهای P^+N_2 (۱/۱۳۱٪)، P^+N_0 (۰/۳٤۷٪)، P^+N_2 (۹/۳۸٤ میلی‌گرم در گرم) و P^+N_2 (۳/٤۸۱ میلی‌گرم در گرم) به دست آمد. مطابق شکل ٤، میتوان مشاهده کرد که با افزایش نیتروژن، غلظت فسفر هوایی کاهش یافته است. این نتیجه ممکن است ناشی از این باشد که با افزایش نیتروژن و مصرف باکتری‌ها، رشد گیاه بیش‌تر شده و به این دلیل (اثر رقت) درصد فسفر در کل گیاه کمتر گردید. در مورد پتاسیم بخش هوایی، اثرات متقابل دو جانبه دو باکتری (جدول ۸) و اثرات متقابل نیتروژن با هر یک از باکتری‌ها معنی‌دار به دست نیامد و با افزایش نیتروژن نیز تغییر معنی‌دار در میزان پتاسیم بخش هوایی ایجاد نشد.



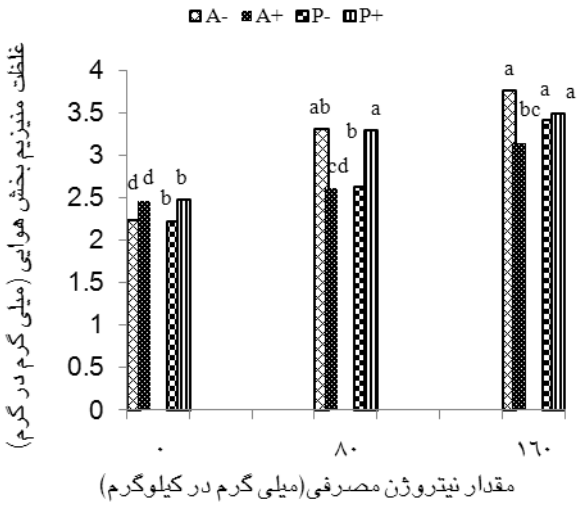
شکل ۳- مقایسه میانگین درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد فسفر بخش هوایی گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۵- مقایسه میانگین غلظت کلسیم بخش هوایی مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۶- مقایسه میانگین غلظت منیزیم بخش هوایی مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری A. irakense و باکتری P. putida

با توجه به جدول ۹، تیمار A^+، بر غلظت نیتروژن و پتاسیم ریشه معنی‌دار بوده و موجب کاهش غلظت نیتروژن به اندازه ۹/۵٪ و افزایش غلظت پتاسیم به اندازه ۱۸/۸۶٪ گردید. به نظر می‌رسد باکتری A^+ باعث انتقال نیتروژن به بخش هوایی شده است. ولی در مقابل، تیمار P^+، موجب افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن و فسفر ریشه گردید ولی باعث کاهش معنی‌دار غلظت منیزیم بخش هوایی شد. همچنین اثرات متقابل دو باکتری *A. irakense* و *P. putida* بر غلظت نیتروژن و فسفر بخش ریشه اثر معنی‌دار داشته و بیش‌ترین غلظت‌ها در هر دو مورد مربوط به تیمار A^-P^+ بود، ولی بر غلظت عناصر پتاسیم و کلسیم اثر معنی‌دار نداشت (جدول ۱۰).

جدول ۹- مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی بخش ریشه در گیاه مرزه تابستانه در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های *A. irkense* و *P.putida*

تیمارها	درصد نیتروژن بخش ریشه	درصد پتاسیم بخش ریشه	درصد فسفر بخش ریشه	کلسیم بخش ریشه (میلی‌گرم در گرم)	منیزیم بخش ریشه (میلی‌گرم در گرم)
A^-	۰/۷۵۵ a	۰/٤٤ b	۰/۱۳۳ a	٥/٦٨٤ a	۲/۹۷۸ a
A^+	۰/٦٨۳ b	۰/٥۲۳ a	۰/۱۳ a	٥/۷۱۷ a	۳/۰۳۹ a
P^-	۰/٤٥۹ b	۰/٤۷٦ a	۰/۱۰۸ b	٥/۹۲٥ a	۳/۲۱۷ a
P^+	۰/۹۷۸ a	۰/٤۸۷ a	۰/۱٥٥ a	٥/٤۷۷ a	۲/۸ b

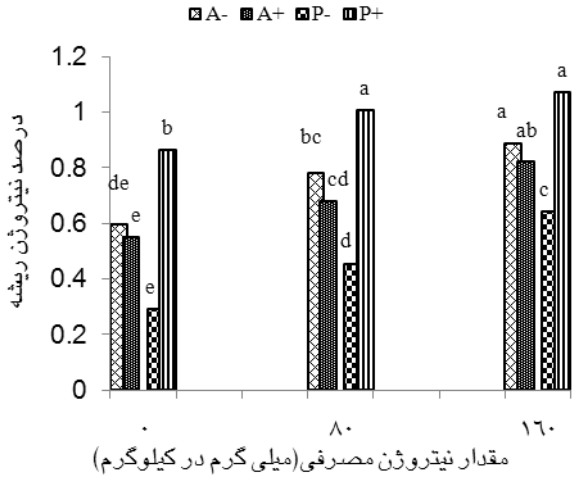
حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪ بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی بخش ریشه گیاه مرزه تابستانه در تلقیح توأم باکتری‌های *A. irkense* و *P.putida*

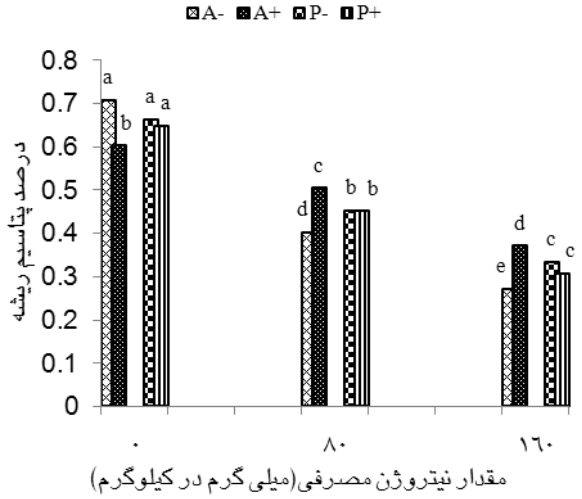
تیمارها		درصد نیتروژن بخش ریشه	درصد پتاسیم بخش ریشه	درصد فسفر بخش ریشه	کلسیم بخش ریشه (میلی‌گرم در گرم)	منیزیم بخش ریشه (میلی‌گرم در گرم)
A^-	P^-	۰/٤٤۳ c	۰/٤۳٤ a	۰/۰۹٦ d	٥/۸۱۳ a	۲/۹۹۹ ab
	P^+	۱/۰٦۷ a	۰/٤٤٥ a	۰/۱٦۹ a	٥/٥٥٦ a	۲/۹٥۷ b
A^+	P^-	۰/٤۷٦ c	۰/٤۹۲ a	۰/۱۲ c	٦/۰۳۷ a	۳/٤۳٤ a
	P^+	۰/۸۹ b	۰/٤۹٤ a	۰/۱٤۱ b	٥/۳۹۸ a	۲/٦٤٤ b

حروف غیر مشابه در هر ستون، نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪ بر اساس آزمون LSD است.

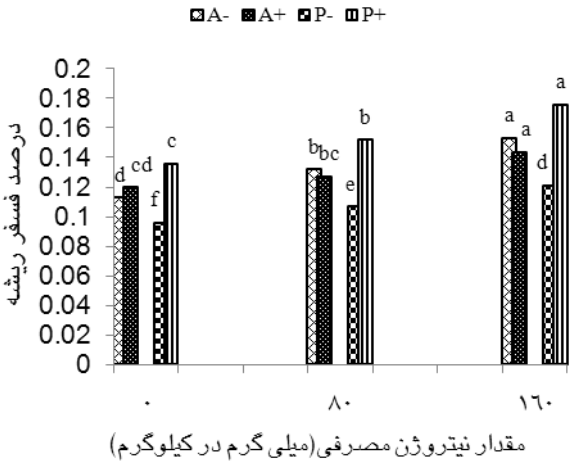
با توجه به مقایسه میانگین، اثر متقابل نیتروژن و باکتری *A. irakense* بر غلظت‌های نیتروژن، پتاسیم، فسفر و منیزیم معنی‌دار بوده و بیش‌ترین غلظت‌ها به ترتیب مربوط به تیمارهای A^-N_2 (۰/۸۸۷٪)، A^-N_0 (۰/۷۰۸٪)، A^-N_2 (۰/۱٥۳٪) و A^-N_0 (۳/٦٤٤ میلی‌گرم در گرم) بود. اثر متقابل نیتروژن و باکتری *P. putida* نیز بر غلظت‌های عناصر نیتروژن، پتاسیم، فسفر و پتاسیم معنی‌دار بوده و به ترتیب تیمارهای P^+N_2 (۱/۰٦۹٪)، P^-N_0 (۰/٦٦۳٪)، P^+N_2 (۰/۱۷٦٪) و P^-N_0 (۳/۸۳۷ میلی‌گرم در گرم) بیش‌ترین غلظت‌ها را داشتند (شکل‌های ۷، ۸، ۹ و ۱۰). همچنین با توجه به همین شکل‌ها می‌توان مشاهده کرد با افزایش نیتروژن مصرفی، غلظت نیتروژن و فسفر ریشه به طور معنی‌داری افزایش و غلظت پتاسیم و منیزیم کاهش یافته که دلیل این کاهش ممکن است افزایش رشد گیاه و نیاز بیش‌تر به پتاسیم و انتقال آن به بخش هوایی باشد.



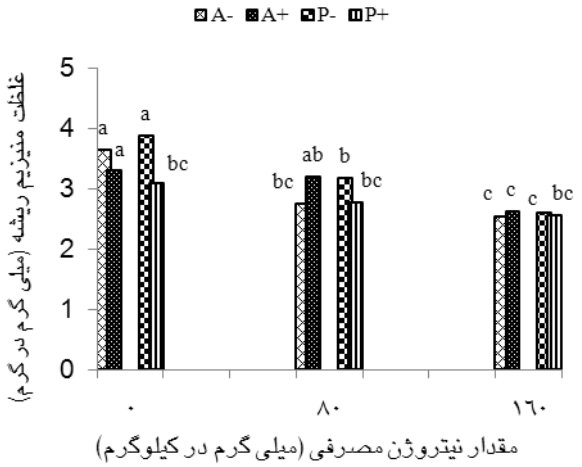
شکل ۷- مقایسه میانگین درصد نیتروژن ریشه گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۸- مقایسه میانگین درصد پتاسیم ریشه گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۹- مقایسه میانگین درصد فسفر بخش ریشه گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*



شکل ۱۰- مقایسه میانگین درصد منیزیم بخش ریشه گیاه مرزه تابستانه بر اساس ترکیب تیماری نیتروژن و باکتری *A. irakense* و باکتری *P. putida*

بحث

با توجه به اینکه در این تحقیق در اثر مصرف باکتری‌های *Azospirillum* و *Pseudomonas*، اسانس و میزان تیمول گیاه دارویی مرزه افزایش یافت ولی افزایش میزان تیمول غیر معنی دار بود، می‌توان چنین بیان کرد که احتمالا" افزایش میزان هورمون‌های محرک رشد گیاه با افزایش میزان رشد گیاه و جذب عناصر غذایی گیاه و بهبود در رشد آن سبب افزایش اسانس گیاه دارویی مرزه می‌گردد. این نتایج در تطابق با یافته-های کرمی و همکاران (۱۳۹۰) مبنی بر حصول بیش-

ترین درصد اسانس از گیاه دارویی گاوزبان (*Borago officinalis* L.) از تیمار ۵۰ درصد کودهای شیمیایی + زیستی (حاوی نیتروکسین و بیوفسفات) است. زارع و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند که، بیش‌ترین درصد اسانس مرزه مربوط به مصرف ٦٠ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بوده و با افزایش مقدار نیتروژن به ۹۰ کیلوگرم در هکتار میزان اسانس مجددا" کاهش یافت. به دلیل اینکه اسانس‌ها ترکیباتی از نوع ترپنوئیدها بوده که واحدهای سازنده آن‌ها ایزوترپنوئید هستند و برای تشکیل نیاز به NADPH و ATP دارند، حضور عناصری مانند نیتروژن و فسفر برای تشکیل این ترکیبات لازم بوده و کودهای زیستی و شیمیایی نیتروژنه موجب افزایش درصد اسانس می‌شود (لومیس و کورتئو ۱۹۷۲). این عناصر علاوه بر تأثیر در فتوسنتز و تنفس، در تولید اسکلت کربنی (پیروات) لازم جهت بیوسنتز اسانس و در ساختار سه کوآنزیم به نام‌های آدنوزین تری فسفات، استیل کوآنزیم آ و نیکوتین آمید دی نوکلوتید فسفات شرکت دارند که در بیوسنتز ترپنوئیدها نقش اساسی دارند (سل ۲۰۰۳). ولی با افزایش میزان نیتروژن به ١٦٠ میلی گرم در کیلوگرم (N_3)، بر درصد اسانس تأثیر منفی داشته و موجب کاهش درصد آن می‌شود (امید بیگی ۲۰۰۹). به نظر می‌رسد با افزایش سطح نیتروژن، اسکلت‌های کربنه موجود در گیاه به مصرف تولید ترکیبات آلی نیتروژنه می‌رسند و در نتیجه اسکلت‌های کربنه مورد نیاز برای سنتز اسانس کاهش می‌یابد. همچنین دلیل دیگر بر این مسئله ممکن است اثر رقّت باشد. در واقع با افزایش نیتروژن، رشد گیاه بیش‌تر شده و درصد اسانس کاهش یابد. عباس‌زاده و همکاران (۱۳۸۵) بیان کردند، گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) در واکنش به استفاده از کود نیتروژنی، از قانون بازده نزولی[1] تبعیت می‌کند. افزایش درصد اسانس تا ٦٠ کیلوگرم در هکتار نشان می‌دهد که با مصرف مقادیر کمی از این کود درصد اسانس افزایش پیدا می‌کند، زیرا ضمن افزایش عملکرد اندام هوایی، تعادل بین تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه حفظ می‌گردد، ولی با افزایش مقدار کود نیتروژن مصرفی به دلیل نیاز شدید به املاح دیگر و به تعویق افتادن رشد گیاه در طی دوره رشد، بیش‌ترین فعالیت گیاه در جهت تولید متابولیت‌های اولیه متمرکز شده و تولید اسانس با کاهش مواجه می-گردد. مصرف کود نیتروژن بیش‌تر علاوه بر کاهش عملکرد، باعث افزایش ارتفاع و خوابیدگی در گیاه خواهد شد. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد با مصرف مقدار مشخصی از کود نیتروژن به همراه کودهای زیستی می‌توان به درصد اسانس بیش‌تری در گیاه مرزه رسید. در بررسی اثر باکتری‌های *Azotobacter chroococcum* ، *Bacillus megaterium* و *Azospirillum lipoferum* به تنهایی یا در تلقیح با همدیگر بر رشد و عملکرد کرفس وحشی (*Apium graveolens*) حاکی از آن است که کاربرد این باکتری‌ها منجر به تولید هورمون‌های محرک رشد در محیط ریشه شده و باعث افزایش رشد، عملکرد و درصد اسانس گیاه در مقایسه با تیمارهای مایه‌زنی نشده گردید (میگاهد و همکاران ٢٠٠٤). اکبری نیا و همکاران (۱۳۸۲)، بیان کردند در گیاه دارویی زنیان، کودهای شیمیایی نیتروژن و فسفر به ترتیب تا مقدار ٦٠ و ٤٠ کیلوگرم در هکتار و کود دامی تا مقدار ۲۰ تن در هکتار باعث افزایش معنی‌دار درصد تیمول اسانس گردید. درحالیکه درصد پاراسیمن کاهش ولی گاما ترپینن تحت تأثیر قرار نگرفت. در تحقیقاتی که صورت گرفته هیچ اشاره‌ای به علت تغییرات ترکیبات اسانس از جمله تیمول (چه افزایش و چه کاهش)، به هنگام کاربرد کود زیستی یا شیمیایی نشده است. با این حال در خصوص علت تأثیر کودهای شیمیایی و آلی بر میزان ترکیبات اصلی اسانس به تحقیقات جامع‌تری نیاز است.

[1]. Law of diminishing return

در این تحقیق در اثر تلقیح باکتری *Azospirillum* ، میزان نیتروژن و فسفر در بخش هوایی افزایش و در ریشه میزان نیتروژن کاهش یافت که دلیل آن احتمالا" انتقال نیتروژن به بخش هوایی است. در اکثر پژوهش‌ها مشاهده شده است که به دنبال تلقیح باکتری‌های محرک رشد از جمله *Azospirillum* ، میزان نیتروژن کل ساقه و دانه نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد (باشان و همکاران ۱۹۹۷). در این بررسی نیز چون نیاز نیتروژن گیاهان از طریق دو منبع کود نیتروژن و باکتری تأمین شده است، بنابراین وقوع این حالت بدیهی است. همچنین یکی دیگر از نظریه‌ها برای تفسیر تجمع نیتروژن به دنبال تلقیح گیاهان (مثل گندم) توسط *Azospirillum*، فعالیت نیترات رداکتاز باکتری است. این تئوری تا حدودی افزایش تجمع نیتروژن در ساقه را بر مبنای ازدیاد سرعت تحول و احیای نیتروژن به کمک باکتری توجیه می‌کند (اکن و هادر ۱۹۸۷). مکانیسم مؤثر برای این امر، به توسعه سیستم ریشه‌ای در اثر تولید هورمون‌های محرک رشد توسط این باکتری‌ها نسبت داده شده است که منجر به افزایش سطح جذب ترکیبات نیتروژن می‌شود (باشان و همکاران ۱۹۸۹). در گیاه دارویی سیاهدانه (*Nigella Sativa*)، کاربرد کودهای گاوی و نیتروژنه باعث افزایش درصد جذب نیتروژن از خاک توسط سیاه دانه نسبت به تیمار شاهد شدند، به طوری که تجمع نیتروژن در بذرهای این گیاه به مراتب بیش‌تر از ساقه ها و برگ های آن بود (خالصی و همکاران ۱۳۸۹). تیین و همکاران (۱۹۹۷)، بیان نمودند که *Azospirillum* به عنوان یکی از باکتری‌های محرک رشد گیاه، علاوه بر تثبیت نیتروژن مولکولی، قادر به تولید اکسین‌ها از قبیل ایندول استیک اسید می‌باشد و از این طریق باعث افزایش تولید ریشه‌های موئین شده و جذب عناصر غذایی را افزایش می‌دهد. آن ها اظهار داشتند که باکتری‌های محرک رشد، از جمله *Azospirillum* و *Pseudomonas* ،از طریق سنتز هورمون‌های محرک رشد مثل ایندول استیک اسید، جیبرلین‌ها و سیتوکینن‌ها باعث افزایش رشد گیاه، درصد جوانه‌زنی بذرها، ریشه‌زایی و گسترش ریشه می‌گردد. رحیم‌زاده و همکاران (۱۳۹۱)، گزارش کردند که در گیاه دارویی بادرشبو، بیش‌ترین غلظت نیتروژن و پتاسیم در تلقیح گیاه با کود زیستی نیتروکسین به دست آمد. داس و همکاران (۲۰۰۸) نیز به دنبال کاربرد کودهای زیستی در گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* مشاهده کردند که میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم قابل دسترس در خاک به طور معنی‌دار افزایش یافت. آزکون و همکاران (۱۹۷٦) گزارش کردند که باکتری‌های حل کننده فسفات می‌توانند با سنتز هورمون‌های گیاهی باعث افزایش رشد گیاه شوند. به این ترتیب که مراحل اولیه رشد گیاهی را تحت تأثیر قرار داده و ریشه حجم بیش‌تری از خاک را اشغال می‌کند و سطح جذب پتاسیم افزایش می‌یابد. میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات همچنین می‌توانند با تولید کلات و تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های فلزی، غلظت فلزات را کاهش داده و سبب رهاسازی آن‌ها از کانی‌ها شده و احتمالا" با تولید پروتون و سایدروفورها در رهاسازی پتاسیم از کانی‌ها مؤثر است (راثی پور و علی اصغر زاده ۱۳۸٦). با توجه به اینکه فسفر قابل جذب در خاک عامل محدود کننده در تغذیه، رشد و نمو و تولید مثل گیاه به شمار می‌رود، باکتری‌های حل کننده فسفات می‌توانند نقش مهمی در تولید محصولات کشاورزی ایفا کنند. میکروارگانیسم-های حل کننده فسفات نیز با انحلال فسفات، فسفر محلول در اختیار گیاه قرار می‌دهند و در نتیجه رشد گیاه و گسترش سیستم ریشه‌ای افزایش یافته، مقادیر بیش‌تری از فسفر محلول جذب گیاه می‌شود. باکتری *Pseudomonas* قادر به انحلال فسفر معدنی نامحلول از طریق کاهش pH بوده و نیز قادر به تولید و ترشح آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی و کسب فسفر از منابع آلی است، بنابراین بدیهی است که غلظت و انتقال فسفر در تیمار *Pseudomonas* بیش‌تر باشد.

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که مصرف ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن به صورت کود اوره، به همراه تلقیح تؤام باکتری‌های *Azospirillum* و *Pseudomonase* اثر مطلوب بر رشد و درصد اسانس و عناصر غذایی گیاه مرزه داشت ولی برای توصیه، باید آزمایشات مشابه مزرعه‌ای نیز صورت گیرد. در مواردی که با مصرف نیتروژن و میکروارگانیسم، درصد عناصر کاهش یافته (مثل فسفر و کلسیم)، رشد گیاه بیش‌تر شده و به دلیل اثر رقت غلظت این عناصر در گیاه کاهش یافته و باید مقدار آن‌ها بررسی شود. در این تحقیق مشاهده شد که با تلقیح گیاه توسط باکتری-های *Azospirillum* و *Pseudomonase* غلظت‌های فسفر و نیتروژن نیز در بخش هوایی گیاه بهبود یافت و به نظر می‌رسد که حضور این عناصر برای تشکیل اسانس ضروری بوده و ممکن است به طور مستقیم و غیر مستقیم در فرایندهای سنتز شرکت کنند، پس با بهبود نیتروژن و فسفر میزان مواد تشکیل دهنده اسانس افزایش یافته و در نتیجه اثر مثبت در میزان اسانس مشاهده شد. به علاوه با تأمین شدن عناصر غذایی مورد نیاز گیاه از طریق کودهای بیولوژیک و همچنین کود شیمیایی، رشد گیاه بهبود یافته و عملکرد گیاه نیز بهتر خواهد شد در نتیجه اسانس به دست آمده از آن نیز بیش‌تر خواهد بود. ولی همانطور که مشاهده شد افزایش بیش از حد نیتروژن نیز می‌تواند اثر منفی در میزان اسانس ایجاد کند. همچنین مصرف بهینه کود شیمیایی نیتروژن این مزیت را دارد که کیفیت گیاه نیز افزایش می‌یابد. لذا کاهش مصرف نیتروژن سبب عدم تجمع مواد سمی نیتروژنه در گیاه می‌شود. در واقع با مصرف میکروارگانیسم‌ها در کنار مقدار مناسبی از کود شیمیایی نیتروژن، نه تنها عملکرد گیاه دارویی و اسانس آن کاهش نمی‌یابد، بلکه بیش‌تر از زمانی خواهد بود که تنها از کود شیمیایی استفاده می‌شود. در نتیجه کیفیت خوراکی گیاه دارویی افزایش یافته و گیاه سالم به دست می‌آید. به عنوان نتیجه کلی می‌توان گفت که انجام این تحقیق به خوبی تأثیر مثبت استفاده از میکروارگانیسم‌های تأمین کننده نیتروژن بر کمیت اسانس و میزان عناصر غذایی گیاه مرزه را نشان داده و در این بین استفاده تؤام دو باکتری و نصف کود اوره توصیه شده بیش‌ترین تأثیر را در افزایش ویژگی‌های فوق داشته و با مصرف این مقادیر نیتروژن، کارایی باکتری‌ها نیز بهتر می‌شود و به دلیل اینکه باکتری *Azospirillum* یک باکتری همیار بوده و برای تأمین نیتروژن گیاه، به مقداری نیتروژن اولیه نیاز دارد، در سطح دوم نیتروژن این باکتری کارایی بهتر را نشان داد. این تیمارها می‌توانند بدون صدمات و مخاطرات محیطی و با حفظ پایداری و سلامت سیستم‌های کشاورزی، نیازهای نیتروژن و فسفر گیاه را تا حدود زیادی برطرف کنند. می‌توان پیشنهاد داد که آثار تنش شوری، خشکی و ... در حضور باکتری‌های *Azospirillum* و *Pseudomonas* بر صفات مهم گیاه دارویی مرزه بررسی شود. همچنین اثرات متقابل باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی بر میزان اسانس و سایر اجزای آن را نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

اکبری نیا ا، قلاوند ا، سفیدکن ف، رضایی م ب و شریفی عاشور آبادی ا، ۱۳۸۲. بررسی تأثیر کودهای شیمیایی، دامی و تلفیقی بر عملکرد و میزان ترکیبات اسانس دانه گیاه دارویی زنیان. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، شماره ٦١ :٤١-٣٢

امید بیگی ر، ۱۳۸۸. تولید و فرآوری گیاهان دارویی (جلد اول). انتشارات آستان قدس رضوی (شرکت به نشر).

حبیبی ح، ۱۳۸٦. ارزیابی چگونگی تأثیر منابع آلی (بیولوژیک) و معدنی نیتروژن‌دار (اوره) بر عملکرد و میزان متابولیت‌های ثانویه دو گونه وحشی و زراعی گیاه آویشن (*Thymus* sp.). پایان نامه دکتری زراعت، دانشکده علوم زراعی و دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

خالصی ن، شور م، صمدی کاظمی م و خوشنود یزدی ا، ۱۳۸۹. مطالعه اثر کودهای دامی و نیتروژنه بر درصد جذب نیتروژن و پتاسیم از خاک در گیاه دارویی سیاه دانه (*Nigella sativa* L.). همایش ملی گیاهان دارویی.

راثی پور ل و اصغرزاده ن ع، ۱۳۸٦.اثرات متقابل باکتری‌های حل کننده فسفات و (*Bradyrhizobium japonicum*) بر شاخص-های رشد، غده‌بندی و جذب برخی عناصر غذایی در سویا. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۱(٤۰): ۲۱٤-۲۲۰

رحیم‌زاده، س، سهرابی ی، حیدری غ، عیوضی ع و حسینی م ط، ۱۳۹۱. تأثیر کاربرد کودهای زیستی و شیمیایی بر جذب عناصر پرمصرف و درصد اسانس در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۱۱(۱): ۱۲۰-۱۲۵

زارع ش، سیروس مهر ع، قنبری ا و طباطبایی ج، ۱۳۹۲. تغییرات اسانس و برخی ویژگی‌های کمی گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) تحت تأثیر مقادیر مختلف کود نیتروژن و کمپوست زباله شهری. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۱۱(۱): ۱۹۱-۱۹۹

عباس‌زاده ب، شریفی عاشورآبادی ا، اردکانی م، لباسچی م ح، صفی خانی ف ا و نادری حاجی باقر کندی م، ۱۳۸۵. بررسی تأثیر روش مصرف کود نیتروژن بر بازده و درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت شرایط مزرعه. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۲(۳): ۲۲۳-۲۳۰

قادری ن، ۱۳۸۹. بررسی پتانسیل‌های استفاده از گونه‌های مختلف *Azospirillum* spp. به عنوان باکتری محرک رشد گیاه برای افزایش عملکرد گیاه کلزا در گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

قاسمی دهکردی ن، طالب ا، ۱۳۸۸. استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص (چاپ اول). انتشارات سبزآرنگ با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

کرمی، ا.، ع. سپهری، ج. حمزه یی و ق سلیمی. ۱۳۹۰. تأثیر کودهای زیستی فسفر و نیتروژن بر صفات کمی و کیفی گیاه دارویی گاوزبان (*Borago officinalis* L.) تحت تنش کمبود آب. فناوری تولیدات گیاهی، ۱۱(۱): ۹۸-۹۰

Abdul Jaleel C, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundrama R and Panneerselvam R, 2007. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalcine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. Colloids and Surfaces B. Biointerafaces, 60: 7-11.

Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H and Alizadeh A, 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungal in salin soils of Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza 11:119-122.

Amin IS, 1997. Effect of bio and chemical fertilization on growth and production *Coriandrum Sativum, Feoniculum vulgare* and *carum carvi* L. Plant Annals of Agricultural Science, 35: 2327-2334.

Azcon R, Barea JM, and Hayman DS, 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plant inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. Soil Biology and Biochemistry, 8: 135-138.

Banchio E, Bogino PC, Zygadlo J and Giordano W, 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yeild in *Organom majorana* L. Biochemical Systematic and Ecology, 36: 766-771.

Bashan Y and Kentharrrison S, 1997. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. Applied Environmental Microbiology, 56: 769-775.

Bashan Y, Sigh M and Levanony H, 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through N fixtion. Canadian Journal of Botany, 67: 2429-2434.

Campbell GS, Jakson RD, Mortland MM, Nielsen DR and Klute A, 1986. Methods of Soil Analysis, part 1 (Physical and Mineralogical). Soil Science Society of America Journal. Madison, Wisconsin USA.

Das K, Dang R and Shivananda V, 2008. Influence of biofertilizer on the availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of *Stevia rebaudiana* grown in South India. International Journal of Applied Research in Natural Products, 1: 20-24.

Ebhin Mosto R, Chhonkar PK, Singah D and Patra AK, 2006. Changes in soil biology and biochemical characteristics in a long-term field trail on sub-tropical inceptisoil. Soil Biology and Biochemistry, 38: 1577- 1582.

Gee GW and Bauder JW, 1986. Particle-size analysis, In: Dane JH, et al. (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 4, Physical methods. Soil Science Society of America, Madison, Visconsin, USA.

Gupta PK, 2000. Soil, Plant, Water and Fertilizer Analysis. Agrobios, New Delhi, India.

Gruandwald J and Buttle K, 1996. The European phytotherapeutics market. Drugs Made in Germany, 36: 6-11.

King EO, 1954. Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44: 301.

Krishnamoorthy V and Madalager MB, 2000. Effect of interaction of nitrogen and phosphorus on seed and essential of ajowan (*Trachysperum ammi*). Journal of Spice and Aromatic Crop, 9: 137-139.

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

Leithy S, EL-Meseiry TA and Abdollah EF, 2006. Effects of biofertilizers, cell stabilizer and irrigation regime on rosemary herbage oil yield and quality. Journal of Applied Science Research, 2: 773-779.

Loomis WD and Corteau R, 1972. Essential oil biosynthesis. Recent Advances in Phytochimistry, 6:147-185.

Mclean EO, 1982. Soil pH and lime requirement. *In*: Page A L, et al. (eds). Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition. Agron, Monogr. 9. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,USA. Pp: 199-224.

Migahed HA, Ahmed AE and Abd El-Ghany Bf, 2004. Effect of different bacterial starins as biofertilizer agent on growth, production and oil of *Apium graveolense* under Calcareous soil. Journal of Agricultural Sciences, 12: 511-525.

Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *In*: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds). Methods of soil analysis, part 2. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America., Madison, Wisconsin. Pp:539-579.

Oken Y and Hadar Y, 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancer CRC. Critical Reviews in Biotechnology, 6: 61-85.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phsphorus. *In*: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds). Methods of soil analysis, part 2. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America., Madison, Wisconsin. Pp: 403-430.

Omidbeigi R, 2009. Production and Processing of Medicinal plants. Astane Qod Razavi, Mashhad, 290 p.

Sell CS, 2003. A fragrant introduction to Terpenoid Chemistry. The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House. Science Park. Milton Road Cambridg, UK 410 p.

Tien TM, Goskins MH and Hubel D, 1997. Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of *pearl nillet*. Applied Environment Microbiology, 39: 1016-1024.

Vessy JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil, 255: 571-586.

Waling I, Vark WV, Houba VJG and Van der lee JJ, 1989. Soil and plant analysis:A series of syllabi. Part 7. Plant analysis procedures. Wageningen Agriculture University.