

تأثیر کودهای زیستی و محلول پاشی نانو اکسید آهن بر عملکرد دانه و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)مریم برومند سویری<sup>۱</sup>، مصطفی حیدری<sup>۲\*</sup>، احمد غلامی<sup>۲</sup>، هادی قربانی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی شاهرود، ۳- دانشیار، گروه آب و خاک، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۷)

## چکیده

به منظور بررسی تأثیر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر عملکرد دانه و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در سال ۱۳۹۶ در مزرعه دانشگاه صنعتی شاهرود اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح محلول پاشی نانو اکسید آهن (شاهد، ۱/۵ و سه گرم در لیتر آب) به عنوان فاکتور اول و پنج سطح کود زیستی (قارچ‌های میکوریزی *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* و دو نوع باکتری محرک رشد شامل ازتوباکتر و آزوسپریلیوم به همراه تیمار شاهد) به عنوان فاکتور دوم بودند. نتایج نشان داد که بیشترین عملکرد دانه از تلقیح با قارچ میکوریز *Glomus intraradices* به دست آمد. اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی، تأثیر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول‌اکسیداز و همچنین مقادیر کلروفیل کل، a و b داشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول‌اکسیداز در تیمار سه گرم نانو اکسید آهن در یک لیتر آب و عدم مصرف کود زیستی به دست آمد. بیشترین مقدار کلروفیل a از تیمار سه گرم در یک لیتر آب به همراه قارچ میکوریزی *Glomus intraradices* و کلروفیل b از مصرف همزمان دو غلظت مصرفی نانو اکسید آهن به همراه دو گونه قارچ میکوریزی به دست آمد. به نظر می‌رسد که در بین تیمارهای مورد بررسی، تلقیح گیاه با قارچ میکوریز *Glomus intraradices* بیشترین تأثیر را بر عملکرد دانه گیاه سیاهدانه داشت و محلول پاشی سه گرم نانو اکسید آهن در لیتر، در افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بسیار موثر واقع شد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات بیوشیمیایی، سیاهدانه، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کودهای بیولوژیکی، نانو اکسید آهن.

Effects of biofertilizers and foliar application of iron oxide nanoparticle on grain yield and some physiological characteristics of black cumin (*Nigella sativa* L.)M. Bromand Sivieri<sup>1</sup>, M. Heidary<sup>2\*</sup>, A. Gholami<sup>2</sup>, H. Ghorbani<sup>3</sup>

1,2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahrood University of Technology, 3. Department of Soil and Water, Shahrood University of Technology.

(Received: November 12, 2018 - Accepted: December 8, 2019)

## ABSTRACT

To study the effects of biofertilizers and foliar application of iron oxide nanoparticles on grain yield and some physiological characteristics of black cumin (*Nigella sativa* L.), an experiment was carried out as factorial in randomized complete block design with three replications at the growing season of 2017, in Agricultural College of Shahrood University of Technology. Treatments consisted of foliar application of iron oxide nanoparticles at three levels (control, 1.5 and 3 g/L water) as the first factor and biofertilizers at five levels (mycorrhizal fungi *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* and two types of growth promoting rhizobacteria including *Azospirillum* and *Azotobacter* solution with control) as the second factor. Results showed that the highest grain yield was obtained from inoculation with mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. The interaction of foliar application of iron oxide nanoparticles and biofertilizers had a significant effect on antioxidant enzyme activities such as catalase, ascorbat peroxidase and polyphenol oxidase as well as total "a" and "b" chlorophylls. The highest activity of catalase, ascorbat peroxidase and polyphenol oxidase enzymes were in 3 g/L water Iron oxide nanoparticles treatment of and non-use of biofertilizers. The highest amount of chlorophyll "a" was obtained from 3 g/L water treatment, with *Glomus intraradices* and chlorophyll "b" from the combination of two concentrations of iron nano oxide with two mycorrhizal fungi. It seems that among the treatments studied, *Glomus intraradices* had the highest effect on grain yield of the black cumin and application of 3 g iron nano oxide /L of water was highly effective in the photosynthetic pigmentation increasing and antioxidant enzymes activity.

**Keywords:** Biochemical compounds, biofertilizers, Black cumin, iron oxide, nano particle, photosynthetic pigments.

\* Corresponding author E-mail: M\_haydari@shahroodut.ac.ir

## مقدمه

در مطالعه‌ای با بررسی قارچ میکوریزا *G. intraradices* و باکتری‌های محرک رشد شامل ازتوباکتر و آزوسپریلیوم بر خصوصیات رشدی گیاه دارویی ریحان، باکتری‌های محرک رشد توانستند تاثیر مثبتی در میزان اسانس و صفات رویشی گیاه ریحان داشته باشند و به عنوان جایگزین مناسبی برای کود-های شیمیایی معرفی شدند (Maleki et al., 2016). گام موثر دیگر جهت دستیابی به کشاورزی پایدار، استفاده از نانوکودها به منظور کنترل دقیق آزاد سازی عناصر غذایی در محیط زیست می‌باشد. استفاده از نانوکودها، منجر به افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی، کاهش سمیت خاک و به حداقل رساندن اثرات منفی ناشی از مصرف بیش از حد کود می‌شود. با بکارگیری نانوکودها، زمان و سرعت رهاسازی عناصر با نیاز غذایی گیاه هماهنگ می‌شود، بنابراین گیاه قادر به جذب بیشترین مقدار مواد غذایی خواهد بود و در نتیجه ضمن کاهش آبشویی عناصر، عملکرد محصول نیز افزایش می‌یابد (Derosa, 2010). گیاهان دارویی برای رشد و تولید مواد موثره، به مقادیر مناسبی از ریزمغذی‌ها نیاز دارند. عناصر کم‌مصرف در گیاهان، به مقدار کم مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما آثار مهمی بر جای می‌گذارند. این عناصر در صورت کمبود می‌توانند گاهی به‌عنوان محدودکننده رشد و جذب سایر عناصر غذایی عمل کنند. همین امر، لزوم توجه بیشتر به کاربرد آن‌ها را مشخص می‌سازد (Malakuti, 2000). آهن، اولین عنصر ضروری اما کم مصرف برای گیاهان است. گیاهان در بین همه ریز مغذی‌ها، بیش‌ترین نیاز را به آهن دارند. آهن، بخشی از گروه کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیا است و برای سنتز کلروفیل مورد نیاز است (Tiz & Zaygur, 2002). بررسی‌های متعددی در زمینه کاربرد کلات آهن در افزایش کلروفیل و سطح برگ، نشانگر آن است که کمبود آهن، همواره موجب از بین رفتن کلروفیل و تخریب ساختمان کلروپلاست و کاهش فعالیت آنزیم های اکسیداز نظیر کاتالاز و پراکسیداز می‌شود (Zuo

با توجه به افزایش سریع جمعیت ایران و نیاز مبرم و روز افزون صنایع داروسازی به گیاهان دارویی به‌عنوان مواد اولیه دارو و نیز به‌منظور بهبود سطح کیفی زندگی، تحقیق در مورد این دسته از گیاهان ضروری است. سیاهدانه یکی از گیاهان دارویی با نام علمی *Nigella sativa* گیاهی است دولپه، علفی، یک‌ساله و متعلق به راسته آلاله Ranunculales و تیره Ranunculaceae است (Ziaee et al., 2012). هر چند که در گیاهان دارویی، ساخت مواد مؤثره به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود، اما تولید آن‌ها به‌طور بارزی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرد، به‌طوری که عوامل محیطی، علاوه بر تاثیر بر رشد و نمو گیاهان، در کمیت و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نیز تاثیر می‌گذارند. حاصلخیزی خاک از جمله عواملی است که تاثیر مثبتی بر کیفیت و کمیت محصول نهایی دارد (Saramadnia & Kuchaki, 1989). با توجه به اثرات مخرب زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه نهاده‌های شیمیایی، روز به روز بر توجه به کشاورزی پایدار افزوده می‌شود. یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای زیستی با هدف حذف یا کاهش مصرف کودهای شیمیایی است. کود های آلی، سبب تأمین سلامت انسان و محیط زندگی می‌شوند و اهمیت کاربرد آن‌ها در مورد گیاهان دارویی که به‌طور مستقیم با سلامت انسان در ارتباط هستند، محرز می‌باشد. گزارش‌های محققان نشان می‌دهد که مسیره‌های خاص سنتز متابولیت‌های ثانویه، به‌وسیله تاثیر میکروارگانیسم‌ها القا می‌شود Sanchez (et al., 2004). قارچ‌های میکوریزی، مهم‌ترین نوع همزیستی متقابل در گیاهان هستند که دارای سه اثر متقابل با گیاه میزبان، قارچ و عوامل خاک می‌باشند. از دیگر کودهای زیستی می‌توان به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) اشاره کرد. گزارش محققان حاکی از آن است که استفاده از ازتوباکتر و آزوسپریلوم، در بهبود ویژگی‌های رشد و ترکیب‌های اسانس گیاه مریم گلی، کارایی بالایی داشت (Youssef et al., 2004).

زیستی (تلقیح با باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی) به همراه محلول‌پاشی نانوآکسید آهن، بر عملکرد و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه دارویی سیاهدانه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این بررسی در سال ۱۳۹۶ در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، واقع در منطقه بسطام با طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۵۷ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۶۶ متر از سطح دریا انجام شد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه شیمیایی خاک در جدول ۱ آورده شده است.

(Zhang, 2011 &). استفاده از مقادیر مناسب نانوکلات آهن، علاوه بر کاهش مصرف کود و آلودگی محیط زیست، سبب بهبود خصوصیات کیفی از جمله افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان اسانس در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) شد؛ با این وجود، افزایش مقدار این عنصر می‌تواند به ایجاد اکسیژن فعال و در نتیجه تنش اکسیداتیو منجر شود و کاهش عملکرد گیاه دارویی را به دنبال داشته باشد؛ بنابراین تعیین میزان مطلوب آن، از اهمیت بسزایی برخوردار است (YousefZadeh et al., 2016). بنابراین، با توجه به اهمیت گیاه دارویی سیاهدانه و افزایش عملکرد کمی و کیفی این گیاه دارویی، با در نظر گرفتن اهمیت مدیریت اکولوژیک این گونه‌های گیاهی، این آزمایش به منظور بررسی تأثیر کودهای

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش.

Table 1. Physiochemical properties of the experimental site soil.

Nitrogen (%)	EC (ds.m <sup>-1</sup> )	pH	Phosphorus (Ppm)	Potassium (Ppm)	Organic matter (%)	Silt (%)	Clay (%)	Sand (%)	Soil texture
0.11	1.8	7.66	19	205	0.3	44	32	24	Loamy-Clay

صورت گرفت.

جهت اعمال تیمارهای کود زیستی برای تلقیح بذور با مایه تلقیح باکتری و با توجه به این که این مایه‌ها به شکل مایع بودند، در تاریکی به نحوی بذرها با مایه مخلوط شدند که یک پوشش کاملاً یکنواخت از این مایه تلقیحی روی سطح بذر تشکیل شود. جهت اعمال قارچ‌های میکوریزی، بر اساس نقشه طرح و بعد از آماده سازی زمین و قبل کشت، بذرها به صورت شپاری ریخته شدند. بذر پاشی انجام شد و روی شیارها با خاک پوشانده شد و بلافاصله آبیاری انجام گرفت. محلول پاشی نانوآکسید آهن در دو مرحله ساقه‌دهی و دو هفته بعد از محلول‌پاشی اول در هنگام غروب آفتاب انجام شد. نمونه برداری جهت اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه، دو هفته بعد از محلول‌پاشی دوم انجام شد. نمونه‌ها از برگ‌های تازه و بالایی گیاهان، با حذف اثر حاشیه به صورت تصادفی انتخاب شدند و بعد از اتیکت گذاری، با استفاده از یخدان به آزمایشگاه دانشکده منتقل شدند.

آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل محلول پاشی نانوآکسید آهن در سه سطح شاهد (F<sub>0</sub>)، یک و نیم گرم نانوآکسید آهن در یک لیتر آب (F<sub>1</sub>) و سه گرم نانوآکسید آهن در یک لیتر آب (F<sub>2</sub>) به عنوان فاکتور اول و انواع مختلف کودهای زیستی شامل قارچ‌های میکوریزی *Glomus intraradices* (B<sub>1</sub>) و *Glomus mosseae* (B<sub>2</sub>) و دو نوع باکتری محرک رشد شامل آزوسپریلیوم (B<sub>3</sub>) و ازتوباکتر (B<sub>4</sub>) به همراه تیمار شاهد (B<sub>0</sub>) به عنوان فاکتور دوم بودند. نانوآکسید آهن از شرکت نانو پیشگامان ایرانیان، قارچ‌های میکوریزی از شرکت زیست فناوری توران شاهرود و همچنین دو گونه باکتری‌های محرک رشد از شرکت دانش بنیان تمیشه گرگان تهیه شدند. اندازه هر کرت در این آزمایش، سه متر در سه متر، فاصله بین کرت‌ها نیم متر و فاصله بین بلوک‌ها دو متر در نظر گرفته شدند. عملیات کاشت با فاصله بین و روی ردیف ۶۰ و ۵ سانتی‌متر و عملیات کاشت در تاریخ ۱۳۹۶/۲/۱

$$A = A_{530} - (0.25 \times A_{657}) \quad (5)$$

که در این رابطه، A: جذب محلول می باشد. جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنول اکسیداز، عصاره آنزیمی از هموژن کردن ۰/۰۵ گرم بافت تر با بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶/۸ تهیه شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، مخلوط واکنش به حجم سه میلی لیتر شامل بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته هفت، پراکسید هیدروژن ۰/۴۵ مولار و عصاره آنزیمی تهیه شد. تغییرات جذب محلول واکنش به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر، به مدت یک دقیقه ثبت شد. ضریب خاموشی (E) آنزیم کاتالاز برابر با  $40 \mu M^{-1} Cm^{-1}$  می باشد و در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تازه بیان شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز، مخلوط واکنش به حجم سه میلی لیتر شامل ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار با اسیدیته ۶/۸، عصاره آنزیمی و پیروگالال ۰/۳ مولار بود. تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر در یک دقیقه اول اندازه گیری شد. ضریب خاموشی (E) آنزیم پلی فنول اکسیداز برابر  $2/47 \mu M^{-1} Cm^{-1}$  می باشد و در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تازه بیان شد (Kar & Mishra, 1976).

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، استخراج عصاره آنزیمی از هموژن کردن ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاهی با بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با اسیدیته هفت صورت گرفت. دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با اسیدیته هفت، EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ مولار و پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی مولار بود. عمل اندازه گیری در طول موج ۲۹۰ نانومتر در یک دقیقه اول انجام گرفت. ضریب خاموشی (E) آنزیم آسکوربات پراکسیداز برابر با  $2/8 \mu M^{-1} Cm^{-1}$  می باشد و در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تازه بیان شد (Nakano & Asada, 1981). جهت اندازه گیری عملکرد دانه، در پایان دوره رشد گیاه و در مرحله رسیدگی، بعد از حذف اثر حاشیه ای،

جهت اندازه گیری کلروفیل و کارتنوئید، ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ نمونه های برداشت شده با پنج میلی لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ هزار دور قرار داده شد و پس از آن، قسمت فوقانی حاصل از سانتریفوژ در کووت اسپکتروفتومتر ریخته شد و به طور جداگانه در طول موج های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و در نهایت مقدار کلروفیل و کارتنوئید از طریق روابط ۱، ۲ و ۳ محاسبه شدند (Arnon, 1994, Ardakani, & Nadur, 2009):

$$Chl_a = 12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (1)$$

$$Chl_b = 22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (2)$$

$$C_{car} = 7/6 (A_{480}) - 1/49 (A_{510}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (3)$$

که در این روابط، V: حجم عصاره مصرف شده و W: وزن نمونه می باشد.

برای سنجش فلاونوئیدها، ۰/۰۵ گرم بافت تر در سه سی سی اتانول اسیدی ( اتانول و اسید استیک به نسبت ۹۹ به یک)، سائیده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. پس از صاف کردن، محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. میزان جذب نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳۰۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه و بر حسب درصد جذب (% absorbance) بیان شد (Krizek et al., 1998):

$$100 \frac{V}{700} Fla = ABS (300 \text{ nm}) \quad (4)$$

که در این رابطه، V: حجم عصاره مصرف شده می باشد.

برای سنجش میزان آنتوسیانین، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت گیاهی با چهار سی سی محلول اسید کلریدریک یک درصد متانول در یک هاون چینی سائیده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد و سپس، محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. پس از برداشتن فاز رویی، جذب محلول ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه گیری شد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Mita et al., 1997):

بوته‌های یک متر مربع وسط هر کرت برداشت شدند، دانه‌های آن جدا شد و پس از خشک شدن در آون ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت، با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شدند.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) تجزیه شدند و مقایسه میانگین داده‌ها با روش LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها و جدول‌ها از برنامه EXCEL استفاده شد.

## نتایج و بحث

### عملکرد دانه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنها اثر کودهای زیستی بر عملکرد دانه معنی‌دار شد و تیمار نانوآکسید آهن و نیز اثر متقابل کودهای زیستی و نانوآکسید، تاثیر معنی‌داری بر عملکرد دانه نداشتند (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر محلول‌پاشی نانوآکسید آهن و کودهای زیستی بر صفات مورد بررسی.

Table 2. Variance analysis of the effects of biofertilizers and foliar application of iron oxide nanoparticle on measured traits.

S.O.V	Df	Mean square									
		Grain yield	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Carotenoid	Anthocyanin	Flavonoid	Ascorbate peroxidase	Polyphenol oxidase	Catalase
Block	2	327.9**	0.257**	0.096*	0.039**	0.057**	0.0003*	0.001 <sup>ns</sup>	0.005*	0.0044**	<sup>-8</sup> ns 845×10
Iron Nanparticle	2	53.62 <sup>ns</sup>	4.815**	2.116**	0.623**	0.136**	0.012**	0.356**	1.407**	8.241**	0.023**
Biofertilizers	4	36292.55**	17.80**	6.142**	3.076**	1.508**	0.009**	0.373**	0.25**	1.403**	0.002**
Iron Nanparticle *Biofertilizers	8	3.029 <sup>ns</sup>	0.572**	0.523**	0.021**	0.006 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.011**	0.037**	0.175**	0.00014**
Error	28	30.39	0.043	0.036	0.005	0.003	0.00006	0.003	0.004	0.0135	256×10 <sup>-8</sup>
CV		3.97	5.33	12.27	3.13	5.39	5.66	3.56	8.74	6.90	1.52

\*, \*\* و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و غیرمعنی‌دار.

\*, \*\* and ns: significant at  $\alpha=0.05$  and  $\alpha=0.01$  of probability levels and non significant, respectively.

آن‌ها باشد (Khalvati *et al.*, 2005)؛ بنابراین افزایش عملکرد تحت تاثیر کودهای زیستی در این آزمایش نمی‌تواند دور از انتظار باشد.

### رنگدانه های فتوسنتزی

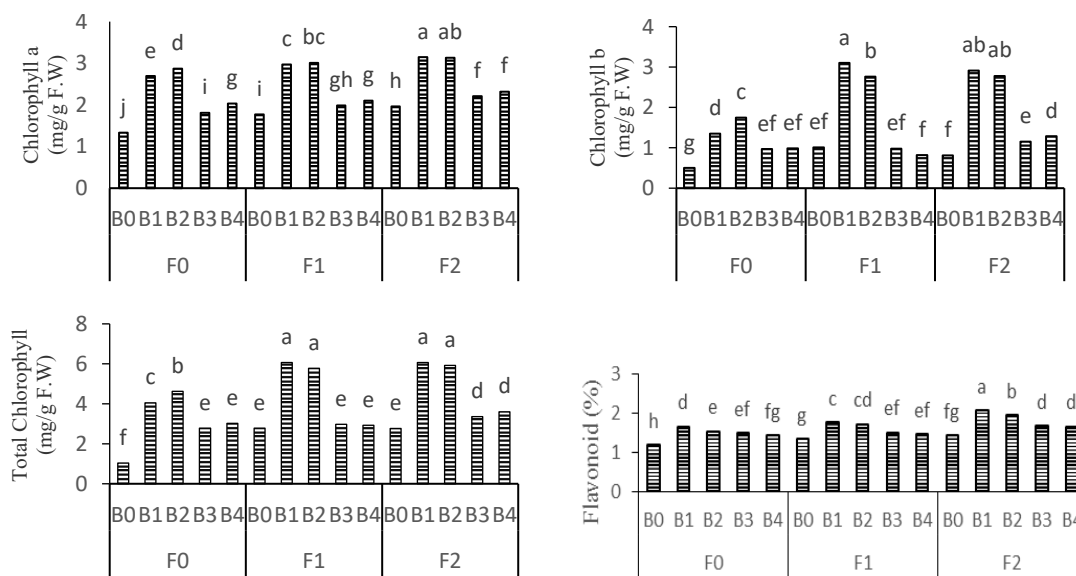
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل محلول‌پاشی نانوآکسید آهن و کودهای زیستی بر غلظت کلروفیل کلروفیل a، b و کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان کلروفیل a از مصرف توام سه گرم نانوآکسید آهن در یک لیتر آب و دو گونه قارچ میکوریزی به دست آمد و کمترین آن هم مربوط به تیمار شاهد (F<sub>0</sub>B<sub>0</sub>) بود. در این بین، بیشترین میزان کلروفیل کل و b، از مصرف هم زمان نانوآکسید آهن (در هر دو غلظت مورد آزمایش) و دو گونه قارچ میکوریزی و کمترین آن‌ها از تیمار شاهد (F<sub>0</sub>B<sub>0</sub>) به دست آمد (شکل ۱).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان عملکرد دانه، از تلقیح با قارچ *G. intraradices* به میزان ۲۰۵/۰۸ گرم در متر مربع به دست آمد و تلقیح با قارچ *G. mosseae* و باکتری‌های محرک رشد، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین مقدار عملکرد دانه نیز از تیمار شاهد به میزان ۴۲/۰۶ گرم در متر مربع به دست آمد (جدول ۳). تلقیح گیاهان با قارچ‌های میکوریزی می‌تواند رشد و مقدار جذب مواد غذایی، مقاومت به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها و در نتیجه عملکرد دانه در گیاهان را افزایش دهد (Porrás-Soriano *et al.*, 2009). دلیل دیگر افزایش عملکرد در گیاهان در طی استفاده از قارچ‌های میکوریزا، ممکن است مرتبط با تاثیر این دسته از قارچ‌ها بر تثبیت نیتروژن، فسفر، ماندگاری بیشتر برگ‌ها روی گیاه، حفظ و افزایش اندازه برگ و نیز بهبود فتوسنتز به دلیل بالا رفتن سنتز کلروفیل در

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تاثیر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر صفات مورد بررسی

Table 3- Mean comparison of the effects of biofertilizers and foliar application of iron oxide nanoparticle on measured traits

Treatment	Carotenoid (mg /g F.W)	Anthocyanin (µg/g F.W)	Grain yield (g/m <sup>2</sup> )
Foliar application of iron oxide nanoparticle (g/L)			
Control	0.95 c	0.11 c	138.97 a
1.5	1.03 b	b 0.15	140.28 a
3	1.14 a	0.17 a	136.55 a
Biofertilizers			
control	0.51 d	0.102 d	42.06 d
<i>G. intraradices</i>	1.44 a	0.183 a	205.08 a
<i>G. mosseae</i>	1.44 a	0.172 b	185.91 b
<i>Azospirillum</i>	1.01 b	0.140 c	128.67 c
<i>Azotobacter</i>	0.77 c	0.135 c	131.26 c



شکل ۱- اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی. F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> و F<sub>2</sub> به ترتیب محلول پاشی نانو اکسید آهن در غلظت‌های صفر، ۱/۵ و سه گرم در یک لیتر آب. B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> و B<sub>4</sub> به ترتیب شاهد، قارچ میکوریز *G. intraradices*، *G. mosseae*، باکتری آزوسپریلیوم و ازتوباکتر می‌باشند.

Figure 1. Interaction effects of foliar application of iron oxide nanoparticle and biofertilizers on the photosynthetic pigmentation. F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, are foliar application of iron oxide nanoparticle in 0, 1.5 and 3 g/L concentrations, respectively. B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>4</sub>, are control, Mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria, respectively.

در آزمایشی مشابه گزارش شده است که مصرف میکوریزا و باکتری، هدایت روزنه‌ای و میزان کل کلروفیل گیاه کاهو را افزایش می‌دهند و تفاوت میزان کلروفیل بین تیمارهای مختلف را به تولید سیتوکینین‌های سنتز شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها نسبت دادند، زیرا که این هورمون واکنش زیادی به فسفر جذب شده توسط میکروارگانیسم‌ها دارد. علاوه بر این، افزایش جذب فسفر توسط میکروارگانیسم‌ها،

با توجه به این‌که آهن جز متابولیک آنزیم کاپروپورفینوژن اکسیداز است و این آنزیم در بیوسنتز پیش‌ساز کلروفیل تاثیر دارد، بنابراین افزایش آهن، با تاثیر بر ساخت پیش‌سازهای سنتز کلروفیل می‌تواند سبب افزایش آن در گیاه شود (Chereskin & Castelfrance, 1982). قارچ‌های میکوریزی نیز با تاثیری که در جذب منیزیم در گیاه دارند، می‌توانند سنتز کلروفیل را افزایش دهند (Giri et al., 2004).

اثر محلول پاشی نانواکسید آهن و کودهای زیستی به-طور جداگانه، تاثیر معنی داری بر میزان آنتوسیانین در سطح احتمال یک درصد داشتند (جدول ۲). با توجه به جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳)، با افزایش غلظت نانواکسید آهن، بر میزان آنتوسیانین در گیاه افزوده شد. بیشترین مقدار آن، با استفاده از سه گرم نانواکسید آهن در یک لیتر آب و کمترین آن هم در تیمار شاهد مشاهده شد.

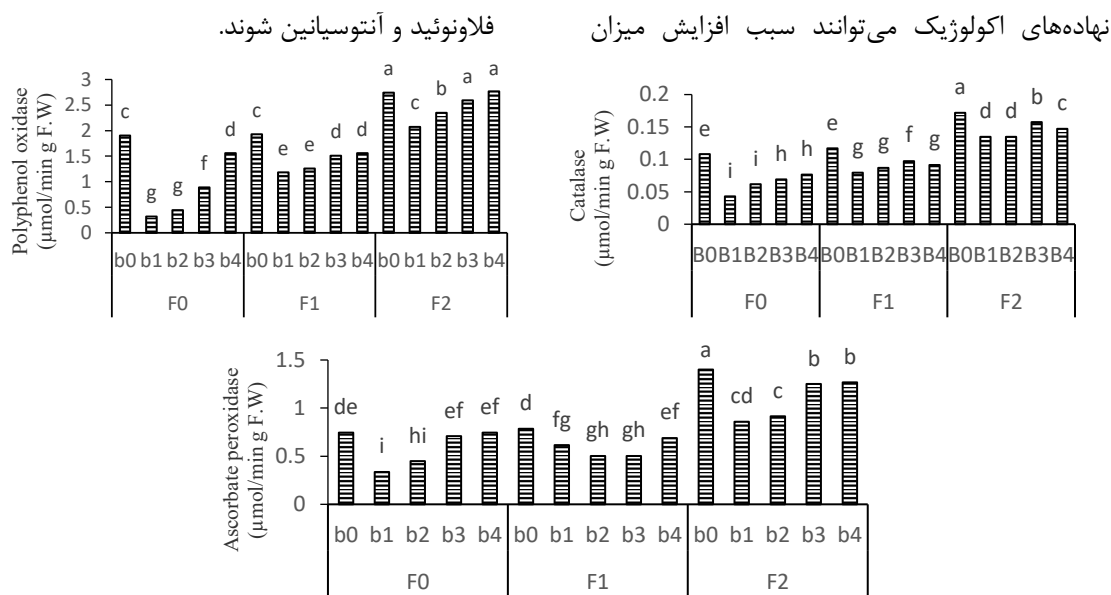
در رابطه با مصرف کودهای زیستی نیز تفاوت معنی داری در شرایط مصرف با شرایط عدم مصرف و همچنین انواع مختلف کودهای زیستی مشاهده شد (جدول ۲)، به طوری که بیشترین میزان آنتوسیانین، به ترتیب در گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. intraradices* به دست آمد و گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. mosseae* و باکتری‌های محرک رشد، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و کمترین مقدار هم در شرایط عدم مصرف کود زیستی به دست آمد.

در این آزمایش، مصرف همزمان محلول پاشی نانواکسید آهن و کودهای زیستی توانست سبب افزایش میزان فلاونوئید در سیاهدانه شود (جدول ۲). در شکل ۲ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت نانو اکسید آهن از سطح  $F_0$  به  $F_2$ ، بر میزان فلاونوئید افزوده شد. بالاترین میزان فلاونوئید در تیمار سه کیلوگرم نانواکسید آهن در هزار لیتر آب و تلقیح با قارچ *G. intraradices* به دست آمد و کمترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. بررسی تاثیر نانواکسید آهن روی نعنای فلفلی نشان داد که با افزایش غلظت نانواکسید آهن، میزان فلاونوئید برگ افزایش می‌یابد (Mohammadi et al., 2011). میکروارگانیزم‌ها احتمالاً از طریق مکانیسم‌هایی نظیر انحلال ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها (Samawati & Malekoti, 2005)، سنتز فعالیت فنیل آلانین آمونیالاز را فعال می‌کنند؛ این آنزیم به‌عنوان اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید، موجب تبدیل فنیل آلانین به ۴- کوماریل کوانزیم-A می‌شود که این ترکیب، پیش‌ساز فعال در تولید ترکیبات فلاونوئیدی است (Clive et al., 1998)؛ بدین ترتیب،

منجر به پهن‌تر شدن برگ و افزایش کلروفیل در واحد سطح برگ می‌شود (Vivas et al., 2003) که بیانگر نتیجه به‌دست آمده در این آزمایش می‌باشد. در آزمایشی مشابه، با بررسی اثر نانواکسید آهن و کود-های زیستی بر محتوی کلروفیل تحت شرایط تنش شوری در گیاه جو مشخص شد که مصرف توام این دو تیمار، علاوه بر تعدیل تنش شوری توانست میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی را در گیاه افزایش دهد (Dadashzadeh et al., 2018). بنابراین به‌نظر می‌رسد که ترکیب تیماری غلظت یک و نیم گرم نانواکسید آهن در یک لیتر آب به همراه قارچ‌های میکوریزی می‌تواند تاثیر مثبتی در افزایش میزان کلروفیل در گیاه داشته باشد.

تیمارهای مورد بررسی در این آزمایش، به‌طور جداگانه تاثیر معنی داری بر میزان کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد داشتند (جدول ۲). در این آزمایش، با افزایش مقدار نانواکسید آهن، میزان کاروتنوئید افزایش یافت؛ بیشترین مقدار آن با محلول پاشی سه گرم نانواکسید آهن در یک لیتر آب و کمترین آن نیز در شرایط عدم مصرف نانواکسید آهن به دست آمد (جدول ۳). از آنجا که غلظت‌های زیاد آهن در گیاه، باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ghorbanpour et al., 2015)، به‌نظر می‌رسد که دلیل افزایش میزان کاروتنوئید در غلظت‌های بالای آهن، جلوگیری از آسیب کلروفیل باشد.

در این بررسی تیمار کود زیستی توانست میزان کاروتنوئید در گیاه را افزایش دهد، به طوری که بیشترین میزان کاروتنوئید در تیمار با قارچ‌های میکوریزا و بعد از آن، به ترتیب از تلقیح گیاه با باکتری آزوسپریلوم و ازتوباکتر به دست آمد و کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۳). در آزمایشی، کاهش کلروزیس برگی در اثر تابش پرتو UV، در گیاهان همزیست با قارچ میکوریزی، سبب افزایش محتوای کاروتنوئید شد (Rahmatzadeh & Galilee, 2010). باکتری‌های محرک رشد نیز با افزایش جذب آب و مواد غذایی، سبب افزایش ساخت رنگیزه‌ها در گیاهان می‌شوند (Marius et al., 2005).



شکل ۲- اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، F<sub>0</sub>، F<sub>1</sub> و F<sub>2</sub> به ترتیب محلول پاشی نانو اکسید آهن در غلظت های صفر، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر آب. B<sub>0</sub>، B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، B<sub>3</sub> و B<sub>4</sub> به ترتیب شاهد، قارچ میکوریز *G. intraradices*، *G. mosseae*، باکتری آزوسپریلیوم و ازتوباکتر می باشد

Figure 2. Interaction effects of foliar application of iron oxide nanoparticle and biofertilizers on the activity of antioxidant enzymes. F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, are foliar application of iron oxide nanoparticle in 0, 1.5 and 3 g/L concentrations, respectively. B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>4</sub>, are control, Mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria, respectively.

شد و کمترین مقدار نیز در شرایط عدم مصرف کود زیستی و استفاده از قارچ های میکوریزا به دست آمد (شکل ۲).

در آزمایشی گزارش شد که کمبود آهن در گیاهان، نه تنها موجب کلروز می شود، بلکه فعالیت آنزیم های مشخصی مانند کاتالاز و پراکسیداز را نیز کاهش می دهد، زیرا این آنزیم ها دارای آهن پورفیرین هستند و به عنوان گروه های پروستتیک، نقش ویژه ای را در متابولیسم گیاهی ایفا می کنند (Bannister et al., 1987). در آزمایشی، کمبود آهن منجر به کاهش کلی فعالیت آسکوربات پراکسیداز سیتوزول، در جلبک اوگلنا شد (Ishikawa et al., 1993). گزارش شده است که سلول های اوگلنا که کمبود آهن دارند، نمی توانند در حضور ۱۰۰ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> نمو یابند، در حالی که سلول های دارای مقدار کافی آهن، نسبت به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> از خود تحمل نشان دادند (Radtke et al., 1992). در آزمایشی نشان داده شد که استفاده از آهن، سبب افزایش فعالیت پراکسیداز در ریشه و کاهش فعالیت آن در برگ گیاه ناز باتلاقی

### فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز، در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). با توجه به شکل ۲، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط عدم مصرف کود زیستی و غلظت سه کیلوگرم در هزار لیتر نانو اکسید آهن و کمترین مقدار نیز از تلقیح گیاه با قارچ میکوریزا بدون محلول پاشی نانو اکسید آهن به دست آمد.

بیشترین مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز با مصرف سه گرم نانو اکسید آهن در یک لیتر آب و عدم مصرف کود زیستی به دست آمد و کمترین مقدار آن، از تلقیح گیاه با قارچ *G. intraradices* در شرایط عدم محلول پاشی نانو اکسید آهن به دست آمد (شکل ۲).

با افزایش غلظت نانو اکسید آهن، میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نیز افزایش یافت، به طوری که بیشترین مقدار آن با محلول پاشی سه گرم در لیتر نانو اکسید آهن به همراه عدم مصرف کود زیستی مشاهده



گیاهچه‌های فستوکای غیر میکوریزیایی، بیشتر از گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا بود و این امر را به توانایی قارچ میکوریزا در کاهش اثرات تنش نسبت دادند (Rafiei-Demneh et al., 2014).

نتایج آزمایش حاضر نیز کمتر بودن فعالیت آنزیم‌ها را در تیمارهای حاوی کودهای زیستی نشان می‌دهد و این مقدار در شرایط تلقیح با قارچ‌های میکوریزا نسبت به باکتری‌های محرک رشد کمتر بود. بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که قارچ‌های میکوریزا نسبت به باکتری‌های محرک رشد، در ایجاد شرایط مساعد برای گیاه می‌توانند موثرتر واقع شوند.

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که محلول‌پاشی غلظت یک و نیم گرم نانواکسید آهن در یک لیتر آب، به همراه دو گونه قارچ‌های میکوریزا، به ویژه *G. intraradices* می‌تواند در افزایش عملکرد دانه در گیاه سیاهدانه موثر باشد. در این بین، محلول‌پاشی با غلظت سه گرم نانواکسید آهن در یک لیتر آب، از کارایی بیشتری در تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار بود.

(*Bacopa monnieri* L.) شد؛ همچنین محتوی آسکوربات هم در ریشه و هم در برگ در مقایسه با شاهد بیشتر بود (Sinha & Saxena, 2002). بنابراین افزایش میزان آسکوربات پراکسیداز، با افزایش میزان آهن، علاوه بر تاثیری که آهن در ساختار آسکوربات پراکسیداز دارد می‌تواند گویای افزایش  $H_2O_2$  در گیاه باشد. افزایش  $H_2O_2$  و ایجاد سمیت در اثر افزایش میزان آهن در گیاه برنج گزارش شده است (Mehraban & Abdolzadeh, 2012). شاید بتوان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در غلظت بالای نانواکسید آهن را در این آزمایش به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به سمیت آهن در گیاه نسبت داد. با توجه به نقش آهن در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در سطح  $F_0$ ، به دلیل کمبود آهن در گیاه سیاهدانه باشد.

کمتر بودن فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای حاوی باکتری گزارش شده است و دلیل آن، قرار گرفتن گیاه در شرایط مناسب توسط باکتری بیان شده است (Davoodi Fard et al., 2010). نتایج آزمایشی نشان داد که میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در

### REFERENCES

1. Ardakani, M. & Nadur, A. (2009). *Principles and techniques for plant scientists*. Tehran University Press. 270p. (In Persian).
2. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23:112-121.
3. Bannister, J. V., Bannister, W. H. & Rotills, G. (2008). Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22,111-180.
4. Chereskin, B. M. & Castelfrance, P. A. (1982). Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis II. Observation on the biosynthetic pathway in isolated-chloroplasts. *Plant Physiology*, 68, 112-116.
5. Clive, L., Sze-Chung, S. & Nicholson, R. (1998). Reduction of light induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyl implication for a compensatory role in the defense. *Plant Physiology*, 116, 979-989.
6. Dadashzadeh, S., Seyed Sharifi, R. & Farzaneh, S. (2018). Effects of bio-fertilizer and nano iron oxide on yield, chlorophyll content and modeling of some components of grain filling period of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salinity stress levels. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 16(2), 493-509. (In Persian).
7. Davoodi Fard, M., Hsbibi, D., Paknrzhad, F., Fazeli, F. & Farhadi pad, P. (2010). Effect of plant growth promoting rhizobacteria and foliar application of amino acids and silicic acid on antioxidant enzyme activity of wheat under drought stress. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 6(4), 11-36. (In Persian).
8. Derosa, M. R., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R. & Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnol*, 5(2), 91.

9. Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plantin response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(3), 249 - 56.
10. Giri, B. & Mukerji, K. (2004). Mycorrhizal inoculate alleviates salt stress in *Sesbania aegyptica* and *sesbaniagrindiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, 14, 307-312.
11. Ishikawa, T., Takeda, T., Shigeoka, S., Hirayama, O. & Mitsunaga, T. (1993). Requirement for iron and its effect on ascorbate peroxidase in *Euglena gracilis*. *Plant Sciences*, 93, 25-29.
12. Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
13. Khalvati, M. A., Hu, Y., Mozafar, A. & Schmidhalter, U. (2005). Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations and gas exchange of barely subjected to drought stress. *Plant Biology*, 7, 706-712.
14. Krizek, D. T., Britz, S. J. & Mirecki, R. M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103, 1-7.
15. Malakuti, M. C. (2000). *Comprehensive method of diagnosis and necessity of optimal use of chemical fertilizers*. Tarbiat Modares University Press, Tehran. 131 p. (In Persian).
16. Maleki, V., Salimi, Kh. & Ardakani, M, R. (2016). Effect of biofertilizers on vegetative growth and essential oil of sweet basil. *Agroecology Journal*, 11(4), 49-56. (In Persian).
17. Marius, S., Octavita, A., Eugen, U. & Vlad, A. (2005). Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower. *Genetics and Molecular Biology*, 12(2), 11-17.
18. Mehraban, P. & Abdolzadeh, A. (2012). Effects of iron excess on the antioxidant activity and patterns of protein electrophoresis in *Oryza sativa* var. Shafagh. *Journal of Plant Production*, 19(1), 85-106. (In Persian).
19. Mita, S., Murano, N., Akaike, M. & Nakamura, K. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars. *Plant Journal*, 11, 841-851.
20. Mohammadi, M., Majnoun Hosseini, N. & Dashtaki, M. (2016). Effects of nano-ferric oxide and zinc sulfate on chlorophyll, anthocyanin, flavonoid and leaf mineral elements of peppermint (*Mentha piperita* L.) at Karaj climatic conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 5(32), 770- 784. (In Persian).
21. Nakano, Y. & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate. *Plant Cell Physiology*, 28, 131-140.
22. Peyvandi, M., Parande, H. & Mirza, M. (2011). Comparison on nano Fe chelate with Fe chelate on growth parameters and antioxidant enzymes active of *Ocimum Basilicum*. *New Cellular and Molecular Biotechnology*, 4, 89-99. (In Persian).
23. Porras-Soriano, A., Soriano-Martín, M. L., Porras-Piedra, A. & Azcon, R. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal Plant Physiology*, 166, 1350 – 59.
24. Radtke, K., Byrnes, R., Kerrigan, W. P., Antholine, W. E. & Petering, D. H. (1992). Requirement for endogenous iron cytotoxicity caused by hydrogen peroxide in *Euglena gracilis*. *Marine Environmental Research*, 34, 339– 343.
25. Rafiei-Demneh, M., Shabani, L. & Sharifi tehrani, M. (2014). Induction of antioxidant defensive mechanism in tall fescue inoculated with *Glomus intraradices* fungus under nickel stress. *Journal of Plant Process and Function*, 3(8), 35-46. (In Persian).
26. Rahmatzadeh, S. & Galilee, K. H. (2010). Effect of C-UV on growth and some morphological and physiological factors in coexistence wheat plants with three species of mycorrhizal fungi. *Iranian Journal of Biology*, 21(1), 52-80. (In Persian).
27. Samawati, S. & Malekoti, M. (2005). The necessity of using organic acids (hymikofluok) for quantitative and qualitative increase of agricultural products. Technical publication No. 463. Senate publications, Tehran, Iran. (In Persian).
28. Sanchez, B. J., Trinitario, M., Ferradez, M., Angeles, M., Asuncio, M. & Juan, J. A. (2004). Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *Plant Physiology*, 161, 675 – 82.
29. Saramadnia, Gh. & Kuchaki, A. (1989). *Physiology of crop plants*. Mashhad University Press. 400 pp. (In Persian).

30. Sinha, S. & Saxena, R. (2002). Effect of iron on lipid peroxidation and enzymatic and nonenzymatic antioxidant A content in medicinal plant *Bacopa monnieri*. *Chemosphere*, 22(3), 134-132.
31. Tiz, L. & Zaygur, A. (2002). *Plant physiology*. House of Biology (Third Edition), Tehran, House of Biology, 780 p. (In Persian).
32. Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J. M., Barea, J. M. & Azcon, R. (2003). Influence of a *Bacillus sp.* on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and plant responses two PEG induced drought stress. *Mycorrhizae*, 13, 249-256.
33. YousefZadeh, S., Naghdi Badi, H. A., Sabaghaniya, N. & Jan Mommadi, M. (2016). The Effect of foliar application of nano-iron chelate on physiological and chemical traits of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 4 (60), 152-160. (In Persian).
34. Youssef, A. A., Edris, A. E. & Gomaa, A. M. (2004). A comparative study between some plant growth regulators and certain growth hormones producing microorganisms on growth and essential oil composition of *Salvia officinalis* L. *Plant Annals of Agricultural Science*, 49, 299 - 311.
35. Ziaee, T., Moharreri, N. & Hosseinzadeh, H. (2012). Review of pharmacological and toxicological effects of *Nigella sativa* and its active constituents. *Journal of Medicinal Plants*, 2(42), 16-42. (In Persian)
36. Zuo, Y. & Zhang, F. (2011) Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant Soil Journal*, 339, 83-93.