

## تأثیر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی ریشه و بخش هوایی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

مریم برومند سویری<sup>۱</sup>، مصطفی حیدری<sup>۲\*</sup>، احمد غلامی<sup>۲</sup> و هادی قربانی<sup>۲</sup>  
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۲)

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر نانو اکسید آهن و انواع مختلف کودهای زیستی بر رشد ریشه، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو بخش ریشه و برگ و نیز برخی دیگر از خصوصیات فیزیولوژیکی سیاه‌دانه، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه صنعتی شاهرود اجرا شد. عامل اول محلول پاشی نانو اکسید آهن در سه سطح (صفر =  $F_0$ ،  $F_1=1/5$  و  $F_2=3$  گرم در لیتر آب) و عامل دوم کود زیستی در پنج سطح (عدم مصرف کود زیستی (شاهد) =  $B_0$ ،  $B_1= Glomus intraradices$ ،  $B_2= Glomus mosseae$ ،  $B_3= Azospirillum$  و  $B_4= Azotobacter$ ) بودند. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پلی فنل اکسیداز در دو بخش ریشه و برگ تحت تأثیر دو عامل کودهای زیستی و محلول پاشی نانو اکسید آهن قرار گرفت، به طوری که استفاده از کودهای زیستی سبب کاهش و با افزایش غلظت نانو اکسید آهن، فعالیت آنها افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ نیز از تیمار  $F_2B_0$  حاصل شد. اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر رنگدانه های فتوسنتزی و وزن خشک اندام هوایی معنی دار بود، به طوری که بیشترین مقدار کلروفیل a از تیمار  $F_2B_1$ ، کلروفیل b، وزن خشک اندام هوایی و آهن اندام هوایی از تیمار  $F_2B_2$  حاصل شدند. با توجه به نتایج آزمایش همزیستی با قارچ *G. intraradices* موجب افزایش معنی دار جذب عناصر نیتروژن و آهن در گیاه شد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، کلروفیل، میکوریزا.

## Effects of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on the activity of antioxidant enzymes and some physiological characteristics of the root and aerial parts in black cumin (*Nigella sativa* L.)

Maryam Bromand Sivieri<sup>1</sup>, Mostafa Heidary<sup>2\*</sup>, Ahmad Gholami<sup>2</sup> and Hadi Ghorbani<sup>2</sup>

1, 2. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran  
(Received: Jan. 27, 2019 - Accepted: June 02, 2019)

### ABSTRACT

In order to study the effects of foliar application of nano iron oxide particles and biofertilizers on root growth, antioxidant enzymes activity in two parts of root and leaf, as well as some other physiological characteristics of black cumin (*Nigella sativa* L.) a pot experiment with factorial arrangement in randomized complete block design with three replications was carried out in 2017 growing season at the Faculty of Agriculture, University of Shahrood. The first factor was foliar applications of nano iron oxide at three levels ( $F_0$ = control,  $F_1= 1.5$  and  $F_2= 3$  g /l l water) and the second factor was biofertilizers at five levels ( $B_0$ = Control,  $B_1= Glomus Intraradices$ ,  $B_2= Glomus mosseae$ ,  $B_3= Azospirillum$  and  $B_4= Azotobacter$  solution). The results showed that activity of antioxidant enzymes catalase, polyphenol oxidase in two parts of root and leaf was influenced by two factors of biological fertilizers and foliar application of nanoiron oxide particles, so that the use of biofertilizers reduced and with increasing iron oxide concentration, activity they increased. The highest activity of ascorbate peroxidase in leaf was obtained from  $F_2B_0$  treatment. The interaction effect of foliar application of nanoiron oxide particles and biofertilizers had a significant effect on photosynthetic pigments and aerial dry weight, so that the highest amount of chlorophyll a was obtained from  $F_2B_1$  treatment, chlorophyll b, aerial dry weight and iron of aerial from  $F_2B_2$  treatment. According to the results of the experiment, the symbiosis with *G. intraradits* fungus caused a significant increase in the absorption of nitrogen and iron elements in the plant.

**Keywords:** Ascorbate peroxidase, catalase, chlorophyll, mycorrhiza, polyphenol oxidase.

\* Corresponding author E-mail: haydari2005@googlemail.com

### مقدمه

سیاهدانه گیاهی دو لپه، با نام علمی *Nigella sativa* علفی و یکساله که متعلق به راسته آلاله Ranunculales و تیره Ranunculaceae می‌باشد. مبدأ آن را جنوب اروپا، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا می‌دانند. این گیاه در طب سنتی برای چند بیماری استفاده می‌شود که از جمله به‌عنوان ضد کرم، آسم، دیابت، سرفه بوده و ادراک آور و شیرافزا است (Ziaee et al., 2012).

با توجه به این‌که قسمت اعظم خاک‌های ایران آهکی بوده، تولید محصول زیاد در این خاک‌ها به دلیل pH زیاد، کمبود مواد آلی و فقدان عناصر غذایی کم‌مصرف که در عملکرد کمی و کیفی گیاهان نقش به‌سزایی دارند همواره با مشکلاتی مواجه است. مقدار زیاد یون بی‌کربنات تولیدشده در خاک‌های آهکی، باعث کاهش قابلیت جذب عناصر کم‌مصرف، به‌خصوص آهن، توسط گیاه می‌شود (Hejazi & Kafashi Sedghi, 2014). مصرف کودهای معدنی آهن‌دار نیز برای رفع کمبود، مؤثر واقع نشده و به سرعت به ترکیبات غیرقابل جذب در خاک تبدیل می‌شوند. هنگامی‌که جذب مواد غذایی از طریق ریشه محدود می‌شود، محلول‌پاشی برگ می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر عناصر غذایی را به‌طور مستقیم در اختیار برگ‌ها و دیگر اندام‌های گیاه قرار دهد (Kaymak et al., 2008). با توجه به اهمیت آهن در تغذیه، متابولیسم و رشد گیاهان و کارایی بالای محلول‌پاشی در تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، محلول‌پاشی عنصر آهن می‌تواند بر عملکرد کمی و کیفی محصول مؤثر واقع شود. نقش عنصر آهن در تثبیت ازت و فعالیت برخی از آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است (Ruiz et al., 2000). 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 به‌سزایی برخوردار است (Yousef zadeh et al., 2016). امروزه تلاش‌های جدیدی برای افزایش کارایی مصرف عناصر میکرو صورت گرفته است. با بهره‌گیری از فناوری نانو در

طراحی و ساخت نانوکودها، فرصت‌های جدیدی به منظور افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی و به حداقل رساندن هزینه‌های حفاظت از محیط زیست، پیش روی انسان گشوده شده است (Moneral et al., 2015). نانو اکسید آهن نسبت به اکسید آهن معمولی، به دلیل کوچک بودن ذرات، کمپلکس‌های بیش‌تری تشکیل می‌دهند و با این تفسیر، حلالیت آهن بیش‌تر می‌شود و جذب آن توسط گیاه راحت‌تر است (Mazaherinia et al., 2010). 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 (Yousef Zadeh et al., 2016).

امروزه با توجه به اثرات مخرب زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه نهاده‌های شیمیایی، روز به روز بر اهمیت توجه به کشاورزی پایدار افزوده شده است. یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای زیستی است که با هدف حذف یا کاهش مصرف کودهای شیمیایی است. کودهای 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. استفاده از کودهای زیستی یکی از راهکارهای مؤثر در حفظ کیفیت مطلوب خاک محسوب می‌گردد که باعث افزایش واکنش‌های مفید بین گیاه و میکروارگانیسم‌ها شده، توان گیاه را برای جذب بیش‌تر عناصر غذایی افزایش می‌دهد (Kokalis-Buerelle et al., 2006). در آزمایشی با بررسی دوگونه میکوریزا *G. intraradices* و *G. mosseae* در گیاه آویشن باغی وزن خشک کل گیاه، برگ، ساقه، ریشه و ارتفاع گیاه افزایش یافت (Azimi et al., 2014). همچنین بهبود شرایط رشدی و افزایش جذب عناصر غذایی در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) تلقیح شده با قارچ‌های میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد گزارش شده است (Mahmoudzadeh et al., 2015).

با وجود تحقیقات گسترده‌ای که در مورد تأثیر کودهای بیولوژیک بر روی گیاهان زراعی انجام شده

آزمایش از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی تهیه و ویژگی‌های آن در جدول ۱ آورده شده است. جهت اعمال تیمارهای کود زیستی برای تلقیح بذرها با مایه تلقیح باکتری، با توجه به این‌که این مایه‌ها به شکل مایع بودند در تاریکی به نحوی بذرها با مایه مخلوط شدند که یک پوشش کاملا یکنواخت از این مایه‌های تلقیحی روی سطح بذر تشکیل شود. جهت اعمال تیمار میکوریزا به ازای هر کیلوگرم خاک ۵۰ گرم از هر سویه به گلدان‌ها اضافه و به طور یکنواخت در گلدان پخش شد و با یک لایه از خاک روی آن‌ها پوشانده و سپس بذر پاشی انجام شد. آبیاری گلدان‌ها به‌منظور رساندن میزان رطوبت خاک در حد ظرفیت مزرعه هر دو روز یک بار به‌صورت وزنی انجام گرفت. همچنین بعد از استقرار کامل بوته‌ها (در مرحله چهار برگی)، بوته‌های اضافی حذف شدند و پنج بوته در هر گلدان نگهداری شد. محلول‌پاشی نانو اکسید آهن در دو مرحله ساقه‌دهی و دو هفته بعد از محلول‌پاشی اول در هنگام غروب آفتاب انجام شد. سپس دو هفته بعد از محلول‌پاشی دوم بوته‌های موجود در سطح گلدان‌ها برداشت و اندازه‌گیری‌های لازم در بخش هوایی و ریشه صورت گرفت.

به‌منظور اندازه‌گیری طول و وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی بوته‌های انتخاب شده به طور کامل از هر گلدان جدا شده و بعد از شست و شو، بخش ریشه از اندام هوایی جدا شد سپس طول هر بخش با خط کش اندازه‌گیری شد. سپس جهت اندازه‌گیری وزن خشک در پاکت‌های جداگانه در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک و با استفاده از ترازو توزین شدند.

برای استخراج کلروفیل و کارتنوئید از روش ( Arnon, 1949) استفاده شد. بدین منظور ۰/۰۵ گرم از بافت تر نمونه‌های برداشت‌شده با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ هزار دور قرار داده شد.

است، اطلاعات موجود در مورد اثرات این نوع کودها بر گیاهان دارویی بسیار اندک است. همچنین با توجه به اهمیت عنصر آهن در رشد گیاه و واکنش‌های متفاوتی که گیاهان می‌توانند در استفاده از نانو کودها داشته باشند این آزمایش به منظور بررسی تأثیر کودهای زیستی و همچنین محلول‌پاشی نانو اکسید آهن بر رشد ریشه، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو بخش ریشه و برگ و نیز برخی دیگر از خصوصیات فیزیولوژیکی در گیاه دارویی سیاهدانه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در 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 به‌صورت گلدانی انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی نانو اکسید آهن در سه سطح شاهد  $F_0=1/5$ ،  $F_1=1/5$  و  $F_2=3$  گرم در لیتر به‌عنوان فاکتور اول و نوع‌های مختلف کودهای زیستی شامل عدم مصرف کود زیستی (شاهد)  $B_0$ ، قارچ‌های میکوریزایی *Glomus intraradices*  $B_1$  و *Glomus mosseae*  $B_2$  و دو نوع باکتری محرک رشد شامل آزوسپریلیوم  $B_3$  و ازتوباکتر  $B_4$  به‌عنوان فاکتور دوم بودند. نانو کود آهن از شرکت نانو پیشگامان ایرانیان تهیه شد. نوع‌های مختلف کودهای زیستی شامل قارچ‌های میکوریزایی *G. intraradices* و *G. mosseae* که از شرکت زیست‌فناور توران شاهرود تهیه شدند و دو نوع باکتری محرک رشد شامل ازتوباکتر و آزوسپریلیوم از شرکت دانش بنیان تمیشه گرگان تهیه شدند.

کشت بذرها در تاریخ ۲۰ فروردین‌ماه ۱۳۹۶ در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۷ سانتی‌متر صورت گرفت. خاک مورد استفاده در

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 1. Physical and Chemical properties of soil at experimental site

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

پراکسیداز شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۰/۱ EDTA، ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ مولار و پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی مولار بود. عمل اندازه‌گیری در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت. ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز ( $\epsilon$ ) برابر با  $2/8 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد (Nakano & Asada, 1981).

برای استخراج عصاره پروتئینی ۰/۰۵ گرم از ماده خشک گیاهی وزن گردید و ۴ سی سی از بافر تریس اسید کلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیدند و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردیدند و فاز بالایی جدا گردید که حاوی پروتئین کل بود. برای اندازه‌گیری پروتئین به ۰/۱ سی سی عصاره پروتئینی ۵ سی سی محلول برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیده و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید (Bradford, 1976).

جهت شناسایی عناصر نیتروژن و آهن در ریشه و اندام هوایی نمونه‌های گیاهی پس از شستشو در آن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و آسیاب شدند و سپس از این نمونه‌ها به ترتیب زیر برای سنجش عناصر عصاره‌گیری شد.

۱) هضم در بالن ژوژه با اسید سولفوریک-اسید سالیسیلیک- آب اکسیژنه (Wahing *et al.*, 1989).

۲) هضم به روش سوزاندن خشک و ترکیب با اسید هیدروکلریک (Wahing *et al.*, 1989).

جهت اندازه‌گیری میزان نیتروژن در اندام‌های گیاه ۰/۳ گرم نمونه گیاه با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و به لوله‌های هضم (بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتر) منتقل شد، سپس ۲/۵ میلی لیتر از مخلوط اسیدها اضافه و ۲۴ ساعت به حال خود قرار داده شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲ ساعت تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دیدند و سپس بعد از خنک شدن ۳ بار و هر بار ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه به لوله‌ها اضافه شد، دوباره لوله‌ها روی هیتر تا ۳۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت گذاشته تا عصاره بیرنگ شد. عصاره در بالن به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و از آن ۵ میلی لیتر گرفته و به بالن تقطیر منتقل شد. میزان ۲ میلی لیتر از محلول هیدروکسید سدیم اضافه شد و قیف دهانه بالن تقطیر

سیس قسمت فوقانی حاصل از سانتریفیوژ را در کووت اسپکتروفوتومتر ریخته و به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و در نهایت مقدار کلروفیل و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تر از طریق روابط زیر محاسبه شدند:

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

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

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

که در این روابط  $v$  حجم عصاره مصرف شده و  $w$  وزن نمونه می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل 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 ۳ میلی لیتر شامل بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷، پراکسید هیدروژن ۰/۴۵ مولار و عصاره آنزیمی تهیه شد. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز گردید و تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه ثبت گردید. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر با  $40 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی لیتر شامل ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار با اسیدیته ۶/۸، عصاره آنزیمی و پیروگالل ۰/۳ مولار بود. با اضافه کردن پیروگالل به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر در یک دقیقه اول اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پورپوروگالین تشکیل شده، ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $\text{m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  در ۲/۴۷ دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (Kar & Mishra, 1976).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، عصاره آنزیمی از هموژن کردن ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاهی با بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷ تهیه شد. دو میلی لیتر مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آسکوربات

مختلف، از جمله تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، تولید سیدروفور، افزایش جذب فسفر توسط گیاه، تثبیت نیتروژن و سنتز آنزیم‌هایی که مقدار اتیلن را در گیاه تنظیم می‌کنند، سبب تحریک رشد گیاه می‌شوند (Stajkovic et al., 2011). قارچ‌های میکوریزا نیز از طریق گسترش شبکه هیفی خارج ریشه‌ای موجب افزایش جذب و انتقال مواد غذایی به ریشه می‌شوند. سیستم ریشه‌ای گیاه در نتیجه میکوریزایی شدن تغییراتی حاصل می‌کند، به طوری که در ریشه‌های گیاهان میکوریزایی طول ریشه بیشتر و انشعابات آن وسیع‌تر می‌شود (Khan, 2005).

### وزن خشک ریشه و اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد محلول‌پاشی نانو اکسید آهن در سطح احتمال پنج درصد و مصرف کود زیستی در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه داشت. در این بین اثر متقابل دو تیمار محلول‌پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی تنها تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک اندام هوایی گیاه داشت (جدول ۲).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد محلول‌پاشی نانو اکسید آهن سبب افزایش وزن خشک ریشه شد. در این بین بالاترین وزن خشک ریشه از تیمار  $F_2$  (کاربرد سه گرم نانو اکسید آهن) حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد از افزایشی معادل  $20/4$  درصد برخوردار بود (جدول ۳). با محلول‌پاشی نانو آهن شرایط تغذیه‌ای گیاه بهبود می‌یابد و افزایش وزن اندام‌های گیاه می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت فتوسنتزی باشد که خود سبب تجمع ماده خشک در گیاه می‌گردد (Kuchaki & Banayan, 1994).

استفاده از کودهای زیستی نیز سبب افزایش وزن خشک ریشه گردید، به طوری که بیشترین وزن خشک ریشه در طی استفاده از قارچ‌های میکوریزا به دست آمد. در این بین بیشترین تأثیر مربوط به قارچ *G. intraradices* بود. قارچ *G. mosseae* و باکتری‌های محرک رشد به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۳). قارچ‌های میکوریزایی از طریق گسترش شبکه هیفی خارج ریشه‌ای موجب افزایش جذب و

را با آب شسته تا حجم محلول ۲۰ میلی‌لیتر گردد. بالن را به کمک بخار آب حرارت داده بعد از ظهور اولین قطره تقطیر عمل بمدت ۶ دقیقه ادامه دادیم محلول حاصل از تقطیر در ۱۰ میلی‌لیتر اسید بوریک حاوی ۱۰ قطره اندیکاتور جذب می‌شود. ۵/۰ دقیقه قبل از پایان عمل تقطیر ارنل محتوی اسید بوریک را اندکی پائین آورده تا انتهای مبرد با بخار آب شسته شود. اسید بوریک حاوی آمونیاک را با اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مول تا تغییر رنگ محلول از سبز به صورتی تیتتر کردیم. عمل را با نمونه شاهد به دست آمده از عمل هضم نیز طبق روش انجام داده شد.

اندازه‌گیری آهن به روش جذب اتمی شعله‌ای A.A.S انجام شد. بدین ترتیب که اندازه‌گیری در عصاره حاصل به روش هضم به طریق سوزاندن خشک و استفاده از HCL انجام گرفت. نمونه‌های استاندارد، شاهد و عصاره را با شعله آبی استیلن- هوا ابری نموده و میزان جذب آهن در طول موج  $248/3$  نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت عناصر در نمونه با استفاده از سیستم قرائت غلظت دستگاه به دست آمد (Perkin, 1982).

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

## نتایج و بحث

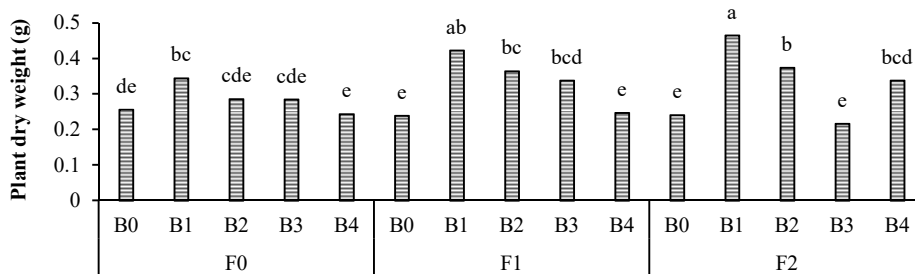
### طول ریشه و اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تنها تیمار کود زیستی تأثیر معنی‌دار بر طول ریشه و اندام هوایی گیاه سیاهدانه داشت. در این بین محلول‌پاشی نانو اکسید آهن و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر این دو صفت نداشتند (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین طول ریشه و اندام هوایی در تلقیح گیاه با باکتری آروسپریلیوم حاصل شد که با تلقیح با باکتری از تو باکتر و قارچ‌های میکوریزا تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار هم در شرایط عدم مصرف کود زیستی یعنی تیمار شاهد مشاهده شد.

باکتری‌های محرک رشد از طریق سازوکارهای

خشک اندام هوایی نسبت به باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر در طی استفاده از غلظت‌های مختلف محلول پاشی نانو اکسید آهن برخوردار بودند. در این بین بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی در طی محلول پاشی سه گرم نانو اکسید آهن به همراه قارچ میکوریزا *G. Intraradices* حاصل شد که این مقدار تفاوت معنی داری در شرایط محلول پاشی ۱/۵ گرم نانو اکسید آهن به همراه قارچ میکوریزا *G. Intraradices* نداشت. کمترین مقدار نیز در شرایط تیمار F<sub>0</sub>B<sub>0</sub> مشاهده شد.

انتقال مواد غذایی به ریشه می‌شوند و سیستم ریشه‌ای گیاه در نتیجه میکوریزایی شدن تغییراتی حاصل می‌کند به طوری که در ریشه گیاهان میکوریزایی طول ریشه بیشتر، انشعابات آن وسیع‌تر و به مراتب وزن ریشه بیشتر می‌شود و این‌گونه می‌تواند جذب عناصر غذایی و تجمع ماده خشک را افزایش دهد که این خود می‌تواند تأثیر به‌سزایی در افزایش وزن ریشه و اندام هوایی گیاه داشته باشد (Azcon et al., 1979). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود گونه‌های قارچ‌های میکوریزایی *Glomus* از تأثیر بیشتری بر وزن



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر وزن خشک بوته سیاه‌دانه (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 ۳ گرم در لیتر و 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 میکوریزا *G. intraradices*، *G. mosseae*، باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر)

Figure 1. Mean comparison interaction effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on black cummin plant dry weight (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, respectively, foliar application of nano iron oxide in concentrations of 0, 1.5 and 3 g/l and B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>4</sub>, as control, mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria)

۲. نتایج تجزیه واریانس اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر برخی صفات سیاه‌دانه

Table 2. Results of variance analysis effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on some traits of black cummin

Source of variation	df	Mean of squares						
		Root length	Plant height	Root dry weight	Plant dry weight	Carotenoid	Chlorophyll b	Chlorophyll a
Block	2	1.73 <sup>ns</sup>	12.84 <sup>ns</sup>	0.00013 <sup>ns</sup>	0.0065 <sup>ns</sup>	0.00014 <sup>ns</sup>	0.0024 <sup>ns</sup>	0.0015 <sup>ns</sup>
Iron Nanoparticle	2	0.55 <sup>ns</sup>	2.48 <sup>ns</sup>	0.00031 <sup>*</sup>	0.0087 <sup>*</sup>	0.0728 <sup>**</sup>	0.538 <sup>**</sup>	4.328 <sup>**</sup>
Biofertilizers	4	85.18 <sup>**</sup>	133.63 <sup>**</sup>	0.00106 <sup>**</sup>	0.0392 <sup>**</sup>	0.2951 <sup>**</sup>	1.188 <sup>**</sup>	5.019 <sup>**</sup>
Iron Nanoparticle × biofertilizers	8	2.79 <sup>ns</sup>	2.17 <sup>ns</sup>	0.00007 <sup>ns</sup>	0.0074 <sup>*</sup>	0.0021 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>**</sup>	0.515 <sup>**</sup>
Error	28	2.70	5.95	0.00006	0.0027	0.003	0.183	0.157
CV		13.92	5.86	16.97	16.92	4.51	6.42	1.85

ns, \*\* و \* به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

\*, \*\*, ns: Significantly difference at 5 and 1% of probability levels, and non-significantly different, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر برخی صفات سیاه‌دانه

Table 3. Mean comparison effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on some traits of black cummin

	Root length (cm)	Plant height (cm)	Root dry weight (g)	Plant dry weight (g)	Carotenoid (µg/g F.W)	Chlorophyll b (µg/g F.W)	Chlorophyll a (µg/g F.W)
Foliar application of iron oxide nanoparticle (g/L)							
Control	11.60 a	41.20 a	0.044 b	0.283 b	1.15 b	1.04 c	3.58 c
1.5	11.93 a	41.70 a	0.049 ab	0.322 ab	1.25 a	1.23 b	3.92 b
3	11.93 a	42.00 a	0.053 a	0.327 a	1.29 a	1.40 a	4.63 a
Biofertilizers							
Control	6.44 c	34.95 b	0.035 c	0.245 c	0.93 c	0.86 c	2.90 e
<i>G. intraradices</i>	13.11 ab	42.83 a	0.063a	0.411 a	1.38 a	1.62 a	4.87 a
<i>G. mosseae</i>	12.33 b	42.83 a	0.055 a	0.341 b	1.37 a	1.61 a	4.50 b
<i>Azospirillum</i>	14.16 a	44.94 a	0.046 b	0.280 c	1.23 b	1.26 b	4.09 c
<i>Azotobacter</i>	13.05 ab	42.61 a	0.044 b	0.276 c	1.25 b	0.93 c	3.85 d

In each column means with similar letters do not have significant difference.

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه تفاوت معنی داری ندارند.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر فعالیت برخی آنزیم‌های سیاه‌دانه  
Table 4. Results of variance analysis effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on some enzymes activity of black cumin

Source of variation	df	Mean of squares						
		Protein	Polyphenol oxidase		Ascorbate peroxidase		Catalase	
			Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf
Block	2	6.55*	0.000009	0.00074 <sup>ns</sup>	0.00031	0.00001 <sup>ns</sup>	0.0000005	0.000013*
Iron Nanoparticle	4	1114.41**	0.0016**	0.1392**	0.00035*	0.0061**	0.000061**	0.000089**
Biofertilizers	4	291.77**	0.0059**	0.0198**	0.0091**	0.00080**	0.000162**	0.00037**
Iron Nanoparticle × biofertilizers	8	5.52*	0.0001 <sup>ns</sup>	0.000512 <sup>ns</sup>	0.00009 <sup>ns</sup>	0.00014*	0.000002 <sup>ns</sup>	0.00000096 <sup>ns</sup>
Error	28	1.75	0.00023	0.00072	0.00007	0.000048	0.000004	0.0000027
CV		2.80	11.04	14.39	6.15	14.97	8.07	5.27

\*، \*\*، ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

\*، \*\*، ns: Significantly difference at 5 and 1% of probability levels, and non-significantly different, respectively.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر برخی صفات سیاه‌دانه  
Table 5. Mean comparison effect of foliar application of iron oxide nanoparticle and biofertilizers on some traits of black cumin

Treatment	Protein (mg/g F.W)	Polyphenol oxidase ( $\mu\text{mol/g F.W}$ )		Ascorbate peroxidase ( $\mu\text{mol/g F.W}$ )		Catalase ( $\mu\text{mol/g F.W}$ )	
		Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf
		Foliar application of iron oxide nanoparticle (g/L)					
Control	44.45 c	0.128 b	0.182 c	0.131 b	0.030 c	0.024 b	0.028 c
1.5	47.35 b	0.139 ab	0.190 b	0.137 ab	0.040 b	0.027 a	0.030 b
3	49.97 a	0.149 a	0.282 a	0.140 a	0.069 a	0.027 a	0.033 a
Biofertilizers							
Control	38.64 e	0.176 a	0.247 a	0.171 a	0.057 a	0.030 a	0.041 a
<i>G. intraradices</i>	53.29 a	0.111 c	0.137 c	0.092 e	0.034 c	0.021 c	0.027 d
<i>G. mosseae</i>	51.09 b	0.118 c	0.141 c	0.117 d	0.040 c	0.023 bc	0.024 e
<i>Azospirillum</i>	47.98 c	0.140 b	0.202 b	0.143 c	0.047 b	0.025 b	0.032 b
<i>Azotobacter</i>	45.29 d	0.148 b	0.209 b	0.158 b	0.053 ab	0.031 a	0.030 c

In each column means with similar letters do not have significant difference.

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه تفاوت معنی‌داری ندارند.

کلروفیل b نیز گونه‌های قارچ *Glomus* بهتر از گونه‌های باکتری تأثیرگذار بودند.

در مورد کارتنوئید، نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد، تنها اثر اصلی محلول پاشی نانو اکسید و تیمار کودهای زیستی معنی‌دار و اثر متقابل دو تیمار از تأثیر معنی‌داری برخوردار نبودند (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد همراه با محلول پاشی نانو اکسید آهن، میزان کارتنوئید در برگ‌های گیاه دارویی سیاه‌دانه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که همراه با افزایش غلظت نانو اکسید آهن، میزان کارتنوئید نیز افزایش یافت، اما این افزایش در بین دو تیمار  $F_1$  و  $F_2$  از اختلاف زیادی برخوردار نبودند (جدول ۳). تیمار کودهای زیستی نیز توانست میزان کارتنوئید در گیاه سیاه‌دانه را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش دهد، به‌طوری‌که بیشترین میزان کارتنوئید در تیمار با قارچ *G. intraradices* حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با *G. mosseae* نداشت و تلقیح گیاه با دو گونه باکتری محرک رشد در رتبه بعدی قرار گرفتند. (جدول ۳).

محتوای کلروفیل برگ یکی از مهم‌ترین عواملی است

رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کارتنوئید)

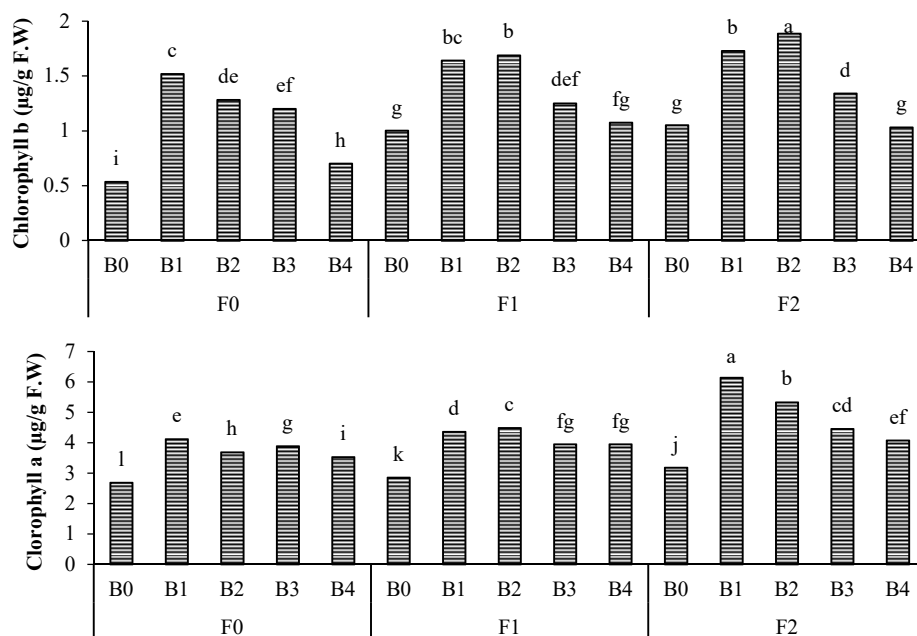
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی تأثیر معنی‌داری بر غلظت کلروفیل a و b در سطح احتمال یک درصد داشت (جدول ۲). همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تا سطح  $F_1$  تغییر محسوسی در میزان کلروفیل a مشاهده نشد اما با بالا رفتن غلظت محلول پاشی بر میزان کلروفیل a افزوده شد، به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیل a از مصرف توام نانو اکسید آهن با غلظت سه گرم در لیتر و قارچ‌های میکوریزیایی *G. intraradices* حاصل شد. در بین تیمار کودهای زیستی قارچ‌های میکوریزا بهتر از باکتری‌ها بر میزان کلروفیل a در برگ تأثیر داشتند همچنین کمترین میزان کلروفیل a در این بررسی از تیمارهای شاهد ( $F_0B_0$ ) حاصل شد. همراه با افزایش غلظت نانو اکسید آهن از  $F_0$  به  $F_2$  بر میزان کلروفیل b نیز افزوده شد، به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیل b از مصرف توام سه گرم نانو اکسید آهن و قارچ *G. mosseae* و کمترین مقدار هم از تیمارهای شاهد ( $F_0B_0$ ) به‌دست آمد (شکل ۲). در مورد

که در نتیجه میزان ساخت رنگیزه‌ها افزایش می‌یابد (Marius *et al.*, 2005).

**فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ و ریشه**  
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد محلول پاشی نانو اکسید آهن و تیمار کودهای زیستی تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در برگ و ریشه گیاه سیاهدانه داشتند (جدول ۴). با بالا رفتن غلظت نانو اکسید از  $F_0$  به  $F_2$  بر میزان فعالیت این دو آنزیم در هر دو بخش ریشه و برگ افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها در برگ و ریشه از محلول پاشی سه گرم نانو اکسید آهن حاصل شد. در این بین کمترین میزان فعالیت نیز در شرایط عدم محلول پاشی نانو اکسید آهن به دست آمد. میزان افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در دو بخش ریشه و برگ در سطح  $F_2$  نسبت به تیمار شاهد ( $F_0$ ) به ترتیب معادل ۱۳ و ۱۸ درصد بودند و این افزایش برای آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه و برگ به ترتیب معادل ۵۵ و ۱۶ درصد بود (جدول ۵).

که ظرفیت فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. احتمالاً علت افزایش مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی با افزایش میزان نانو اکسید آهن به دلیل تأثیر آهن بر ساخت پیش‌سازهای سنتز آنهاست، زیرا آهن جز متابولیک آنزیم کاپروپورفینوژن اکسیداز است و این آنزیم در بیوسنتز آلفا-آمینولینوئولیک که پیش‌ساز بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی است تأثیر دارد (Marschner, 1995). همانند این آزمایش، در پژوهشی با بررسی محلول پاشی نانو کلات آهن روی گیاه بادرشبو گزارش شد که کمبود آهن در این گیاه می‌تواند علاوه بر کاهش سنتز کلروپلاست، با کاهش کارتنوئید همراه شود (Yousef Zadeh *et al.*, 2016). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش میزان آهن در دسترس گیاه می‌تواند میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی را افزایش دهد.

قارچ‌های میکوریزا با افزایش جذب فسفر می‌توانند روی میزان کلروفیل در گیاه تأثیر مثبتی داشته باشند. در ارتباط با تأثیر باکتری‌های محرک رشد می‌توان اینگونه بیان کرد که باکتری آب و مواد غذایی بیشتری را به صورت بهینه در اختیار گیاه قرار می‌دهد



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی سیاهدانه ( $F_0$ ,  $F_1$  و  $F_2$  به ترتیب محلول پاشی نانو اکسید آهن در غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر و  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  و  $B_4$  به ترتیب شاهد، قارچ میکوریزا *G. intraradices*, *G. mosseae*، باکتری‌های آزوسپیریلیوم و ازتوباکتر).

Figure 2. Mean comparison interaction effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on black cumin photosynthetic pigmentation ( $F_0$ ,  $F_1$  and  $F_2$ , respectively, foliar application of nano iron oxide in concentrations of 0, 1.5 and 3 g/l and  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  and  $B_4$ , as control, mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria).



باشد. گزارش شده است کمبود آهن در گیاهان نه تنها موجب کلروز می‌شود، بلکه فعالیت آنزیم‌های مشخصی مانند کاتالاز و پراکسیداز را نیز کاهش می‌دهد. زیرا این آنزیم‌ها دارای آهن پورفیرین هستند و به‌عنوان گروه‌های پروستتیک، نقش ویژه‌ای را در متابولیسم گیاهی ایفا می‌کنند (Bannister et al., 1987). در این رابطه مطالعه‌ای کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز، در شرایط کمبود آهن را گزارش داده است (Sun et al., 2007). در آزمایشی نشان داده شد استفاده از آهن سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و کاهش فعالیت آن در برگ گیاه ناز باتلاقی (*Bacopa monnieri* L.) شد. همچنین محتوای آسکوربات هم در ریشه و هم در برگ در مقایسه با شاهد بیشتر بود (Sinha & Saxena, 2002). بنابراین با توجه به نقش آهن در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، شاید بتوان کم بودن فعالیت آنزیم در سطح  $F_0$  در این آزمایش را توجیه کرد. شاید دلیل دیگر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به علت افزایش  $H_2O_2$  و ایجاد سمیت در اثر افزایش آهن در گیاه باشد (Mehraban & Abdolzadeh, 2012).

قارچ‌های میکوریزا میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و موادی نظیر پرولین را در برگ گیاه میزبان نسبت به گیاهان غیر میزبان کاهش می‌دهند، زیرا معمولا گیاهان تلقیح‌شده با استفاده از روابط آبی و تغذیه بهتر نسبت به گیاهان تلقیح نشده قادرند شرایط مساعد و دور از تنش برای گیاهان ایجاد کنند در نتیجه میزان این ترکیبات در گیاه کاهش می‌یابد (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004). در آزمایشی دیگر گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در گیاهچه‌های فستوکای غیر میکوریزایی بیشتر از گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا بود، این موضوع را به توانایی قارچ میکوریزا در کاهش اثر تنش نسبت داده شده است (Rafiei-Demneh et al., 2014). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش استفاده توام غلظت کمتری از نانو اکسید آهن به همراه کودهای زیستی به‌ویژه قارچ‌های میکوریزایی توانست گیاه را در شرایط مساعدی برای رشد قرار دهد.

در رابطه با تأثیر کودهای زیستی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در برگ و ریشه گیاه، نتایج آزمایش نشان داد تلقیح گیاه سیاهدانه با کودهای زیستی توانست میزان فعالیت این آنزیم‌ها را در برگ و ریشه گیاه به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. کمترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به قارچ‌های میکوریزا (به‌ویژه *G. Intraradices*) بود. میزان کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در دو بخش ریشه و برگ‌ها در شرایط شاهد و تلقیح با *G. intraradices* به‌ترتیب معادل ۳۰ و ۳۴ درصد بودند و این کاهش برای آنزیم پلی فنل اکسیداز در ریشه و برگ به‌ترتیب معادل ۳۷ و ۴۵ درصد بود (جدول ۵).

اثر متقابل محلول‌پاشی نانو اکسید آهن به همراه کودهای زیستی در این آزمایش تنها تأثیر معنی‌دار بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ داشت و در مورد ریشه اثر اصلی نانو اکسید آهن و تیمار کود زیستی از تأثیر معنی‌داری برخوردار بودند و اثر متقابل دو تیمار معنی‌دار نشد (جدول ۴).

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ در سطح محلول‌پاشی سه گرم نانو اکسید در لیتر بود در این بین بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در طی استفاده از سه گرم نانو اکسید آهن و عدم مصرف کودهای زیستی حاصل شد. کمترین میزان فعالیت این آنزیم نیز طی استفاده از قارچ میکوریزا *G. intraradices* و در حالت عدم محلول‌پاشی نانو اکسید آهن ( $F_0B_1$ ) به‌دست آمد (شکل ۲).

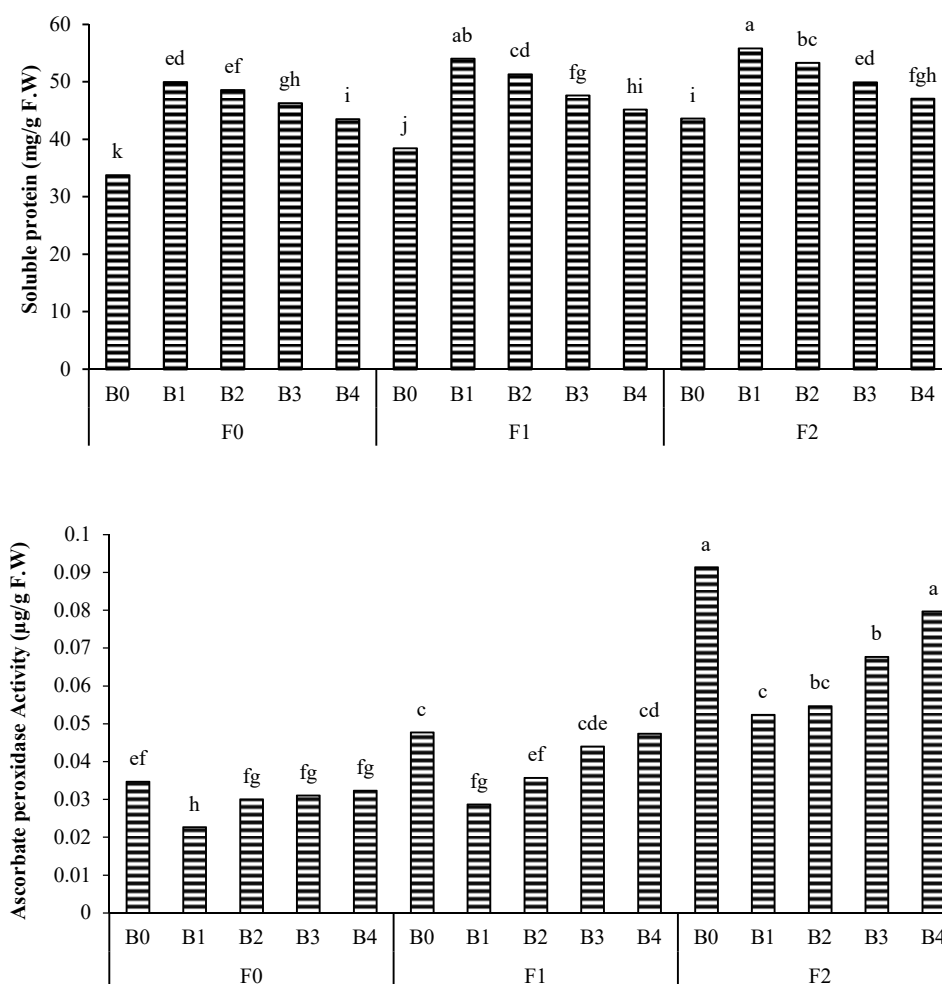
محلول‌پاشی نانو اکسید آهن سبب افزایش فعالیت آنزیم در ریشه شد اما تفاوت معنی‌داری بین دو غلظت مورد استفاده مشاهده نشد. تلقیح با کودهای زیستی توانست میزان فعالیت این آنزیم را در ریشه کاهش دهد، به طوری که کمترین میزان فعالیت این آنزیم در ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا *G. intraradices* مشاهده شد (جدول ۵).

براساس نتایج مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت نانو اکسید آهن می‌تواند سبب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها گردد، شاید دلیل این افزایش، تأثیر آهن در فعالیت آن‌ها

## میزان پروتئین محلول در برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کود زیستی بر میزان پروتئین محلول در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). بیشترین میزان پروتئین از ترکیب تیماری محلول پاشی نانو اکسید آهن با کودهای زیستی به ویژه قارچ میکوریزا *G. intraradices* مشاهده شد و ترکیب با قارچ میکوریزا *G. mosseae* و باکتری‌های محرک رشد به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در این آزمایش مشاهده شد که افزایش

غلظت نانو اکسید آهن سبب افزایش میزان پروتئین شد اما این افزایش تفاوت معنی‌داری با استفاده غلظت کمتر نانو اکسید آهن نداشت (شکل ۲).  
نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف نشان می‌دهد عناصر غذایی از فاکتورهای مؤثر بر پروتئین دانه هستند، به طوری که با بررسی اثر محلول پاشی عناصر کم مصرف منگنز، آهن، مولیبدن و منیزیم روی گیاه بادام زمینی مشاهده شد که آهن باعث افزایش مقدار پروتئین گردید (Rodony, 2000).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر میزان فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز برگ و پروتئین محلول سیاه‌دانه ( $F_0$ ,  $F_1$  و  $F_2$  به ترتیب محلول پاشی نانو اکسید آهن در غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر و  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  و  $B_4$  به ترتیب شاهد، قارچ میکوریزا *G. intraradices*، *G. mosseae*، باکتری‌های آزوسپیریوم و ازتوباکتر).

Figure 3. Mean comparison interaction effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on activity enzyme of ascorbate peroxidase in leaf and soluble protein of black cumin ( $F_0$ ,  $F_1$  and  $F_2$ , respectively, foliar application of nano iron oxide in concentrations of 0, 1.5 and 3 g/l and  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  and  $B_4$ , as control, mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria).

عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم و روی و انتقال این عناصر به گیاه میزبان می‌شوند (Asrar & Elhindi, 2011). در آزمایشی نشان داده شده است که تلقیح با قارچ میکوریزا سبب افزایش میزان نیتروژن در بافت‌های گیاه کاهو در مقایسه با گیاه تلقیح‌نشده گردید (Esmailpour & Amani, 2014).

کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات، جذب نیتروژن در اندام‌های گیاه نخود فرنگی را افزایش داد. استنباط می‌شود که حضور کودهای زیستی، باعث بهبود خصوصیات خاک نظیر محتوای ماده آلی و افزایش دسترسی به عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم شده (Eydizadeh et al., 2010) و از طریق گسترش ریشه و افزایش جذب عناصر غذایی موجب افزایش عملکرد در گیاه می‌شوند. بنابراین افزایش جذب نیتروژن در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا دور از انتظار نبوده و چنین به نظر می‌رسد که قارچ *G. intraradices* بیشترین تأثیر را در افزایش جذب نیتروژن در گیاه سیاهدانه دارد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل محلول‌پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی تأثیر معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) بر میزان آهن اندام هوایی داشت (جدول ۶). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است بیشترین میزان آهن از مصرف توام سه گرم در یک لیتر آب نانو اکسید آهن به همراه قارچ *G. intraradices* حاصل شد و کمترین مقدار نیز در شرایط شاهد ( $F_0B_0$ ) به دست آمد. در مورد میزان آهن در ریشه، نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد، تنها اثر اصلی محلول‌پاشی نانو اکسید و تیمار کودهای زیستی معنی‌دار و اثر متقابل دو تیمار از تأثیر معنی‌داری برخوردار نبودند (جدول ۶). نتایج آزمایش نشان داد با افزایش غلظت نانو اکسید آهن میزان آهن در ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. کاربرد نانو کود آهن در گیاه اسفناج نیز پیامدهای مثبتی در افزایش تجمع آهن داشته است (Vattani et al., 2012). در آزمایش دیگری محلول‌پاشی آهن و منگنز سبب افزایش غلظت پتاسیم، نیتروژن، آهن و منگنز در اندام هوایی و دانه گندم شد (El-Fouly et al., 2011).

کودهای زیستی نیز تأثیر مثبتی در جذب عنصر آهن در گیاه داشتند به این ترتیب که بیشترین میزان آهن در

در آزمایشی مشابه با بررسی نانو کود آهن و کلات آهن روی گیاه مرزه نشان دادند که استفاده از کود آهن سبب افزایش میزان پروتئین نسبت به شاهد شد. همچنین نتایج آزمایش آنها نشان داد مصرف یک و سه کیلوگرم در هکتار نانو کود آهن تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (Peyvandi et al., 2011). از آنجایی که دو غلظت مورد استفاده نانو اکسید آهن تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین محلول ایجاد نکردند به نظر می‌رسد با مصرف کمتر کود نانو اکسید آهن به میزان ۱/۵ گرم در لیتر می‌توان بدون کاهش معنی‌دار در میزان پروتئین محلول، در مصرف کود نانو اکسید آهن صرفه‌جویی به عمل آورد و ترکیب این تیمار با قارچ میکوریزا *G. intraradices* می‌تواند تأثیر مثبتی در افزایش میزان پروتئین محلول داشته باشد. نشان داده شده که تلقیح میکوریزایی میزان اسیدهای آمینه و پروتئین کل را در گیاهان همزیست افزایش می‌دهند (Selvaraj & Chellappan, 2006). در واقع قارچ‌های میکوریزا با افزایش جذب نیتروژن که مهمترین عنصر در سنتز پروتئین‌هاست موجب افزایش میزان پروتئین می‌گردند با افزایش پروتئین‌ها گیاه به توسعه رویش مثل افزایش سطح برگ، تعداد شاخه فرعی و ارتفاع می‌پردازد که افزایش این صفات افزایش فتوسنتز را به دنبال دارد (Chaudhary et al., 2007).

#### میزان نیتروژن و آهن در اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد از بین تیمارهای مورد بررسی تنها مصرف کودهای زیستی تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان نیتروژن در ریشه و اندام هوایی داشت (جدول ۶). به این ترتیب که بیشترین میزان نیتروژن در ریشه و اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. intraradices* مشاهده شد و قارچ *G. mosseae* و باکتری آزوسپریلیوم به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد (بدون مصرف کودهای زیستی) مشاهده شد. لازم به ذکر است که میزان نیتروژن در ریشه گیاهان تلقیح شده با باکتری ازتوباکتر تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد (بدون مصرف کود زیستی) نداشتند (جدول ۷). در واقع قارچ‌های میکوریزا از طریق ایجاد شبکه گسترده هیف در داخل خاک و در محیط ریزوسفر سبب جذب

سیستم ریشه‌ای از طریق تجزیه سیلیکات‌ها و انحلال کانی‌ها باعث آزادسازی عناصر میکرو و افزایش جذب آنها توسط گیاه شوند (Shady *et al.*, 1984). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از آزمایش به نظر می‌رسد علاوه بر محلول پاشی نانو اکسید آهن کاربرد قارچ‌های میکروبیزا به ویژه *G. intraradices* می‌تواند تأثیر به‌سزایی در افزایش غلظت آهن در ریشه و اندام هوایی گیاه دارویی سیاهدانه داشته باشد.

گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *G. intraradices* و قارچ *G. mosseae*، باکتری آزوسپریلیوم و ازتوباکتر در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و کمترین مقدار نیز در گیاهان شاهد (بدون مصرف کود زیستی) مشاهده شد (جدول ۷). قارچ‌های میکوریز از طریق ترشح انواعی از سیدروفورها و کلاته کردن آهن می‌تواند جذب و انتقال آهن را در گیاه افزایش دهد (Caris *et al.*, 1998). این ریز جانداران می‌توانند علاوه بر توسعه

جدول ۶. نتایج تجزیه واریانس اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر نیتروژن و آهن ریشه و قسمت هوایی سیاهدانه  
Table 6. Results of variance analysis effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on root and aerial part nitrogen and iron of black cumin

Source of variation	df	Mean of squares			
		N root	N aerial	Fe Root	Fe aerial
Block	2	0.002 <sup>ns</sup>	0.0008 <sup>ns</sup>	2776.4 <sup>ns</sup>	8425.35 <sup>ns</sup>
Iron Nanoparticle	2	0.010 <sup>ns</sup>	0.0255 <sup>ns</sup>	29235.2 <sup>*</sup>	26960.62 <sup>*</sup>
Biofertilizers	4	0.207 <sup>**</sup>	0.4780 <sup>**</sup>	411288/7 <sup>**</sup>	303349.58 <sup>**</sup>
Iron Nanoparticle × biofertilizers	8	0.004 <sup>ns</sup>	0.0056 <sup>ns</sup>	1145.2 <sup>ns</sup>	14269.95 <sup>*</sup>
Error	28	0.008	0.0109	7254.3	6112.04
C.V. (%)		12.99	8.55	14.98	9.49

\*, \*\*, ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

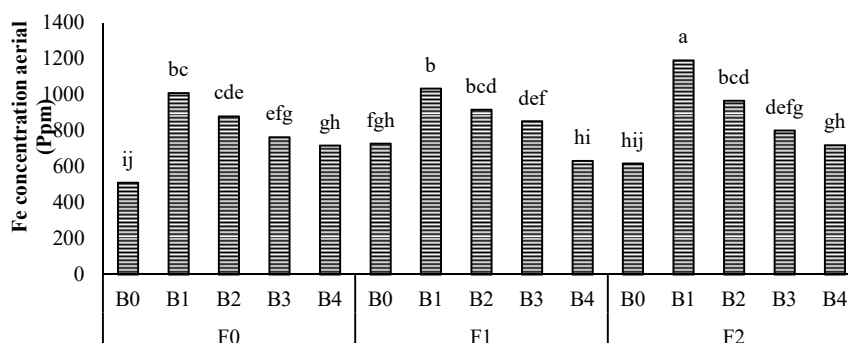
\*, \*\*, ns: Significantly difference at 5 and 1% of probability levels, and non-significantly different, respectively.

جدول ۷. مقایسه میانگین اثر محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر نیتروژن و آهن ریشه و قسمت هوایی سیاهدانه  
Table 7. Mean comparison effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on root and aerial part nitrogen and iron of black cumin

	N root	N aerial	Fe root	Fe aerial
Foliar application of iron oxide nanoparticle (g/L)				
Control	0.675 a	1.178 a	520.4 b	777.0 b
1.5	0.723 a	1.224 ab	577.6 ab	833.3 ab
3	0.719 a	1.261 a	607.3 a	860.1 a
Biofertilizers				
Control	0.546 c	0.865 d	323.0 e	619.2 d
<i>G. intraradices</i>	0.909 a	1.488 a	836.4 a	1079.3 a
<i>G. mosseae</i>	0.790 b	1.298 b	732.8 b	921.7 b
<i>Azospirillum</i>	0.711 b	1.292 b	530.7 c	806.7 c
<i>Azotobacter</i>	0.571 c	1.162 c	419.2 d	690.4 d

In each column means with similar letters do not have significant difference.

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل محلول پاشی نانو اکسید آهن و کودهای زیستی بر میزان آهن اندام هوایی سیاهدانه (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 ۳ گرم در لیتر و 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 میکوریزا *G. intraradices*، *G. mosseae*، باکتری های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر)

Figure 4. Mean comparison interaction effect of foliar application of nano iron oxide and biofertilizers on iron aerial part of black cumin (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, respectively, foliar application of nano iron oxide in concentrations of 0, 1.5 and 3 g/l and B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>4</sub>, as control, mycorrhiza *G. intraradices*, *G. mosseae*, *Azospirillum* and *Azotobacter* bacteria)

## نتیجه‌گیری کلی

*G. intraradices* می‌تواند در افزایش رشد طولی و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه سیاه‌دانه مؤثر باشد. همچنین این قارچ تأثیر به‌سزایی در افزایش جذب عناصر نیتروژن و آهن داشت. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد انتخاب قارچ میکوریزا *G. intraradices* و غلظت ۱/۵ گرم در لیتر نانو اکسید آهن بتواند شرایط مساعدی را جهت رشد برای گیاه دارویی سیاه‌دانه فراهم کند.

هر چند محلول‌پاشی با غلظت سه گرم نانو اکسید آهن در لیتر از کارایی بیشتری در تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار بود، اما با توجه به نتایج به دست آمده به‌نظر می‌رسد محلول‌پاشی غلظت ۱/۵ گرم نانو اکسید آهن در لیتر به‌همراه دو گونه قارچ‌های میکوریزا به‌ویژه

## REFERENCES

1. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121
2. Asrar A. W. A. & Elhindi, K. M. (2011). Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 93-98.
3. Azcón, G., de Aguilar, C., Azcón, R. & Barea, J. M. (1979). Endomycorrhizal fungi and *Rhizobium* as biological fertilisers for *Medicago sativa* in normal cultivation. *Nature Research Journal* 279: 325-236.
4. Azimi, R., Jangju, M. & Asghari, H. R. (2014). Effects of mycorrhiza symbiosis on initial establishment and morphological traits of thyme (*Thymus vulgaris*) under natural conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 11(4), 666-676. (in Farsi).
5. Bannister, J. V., Bannister, W. H. & Rotills, G. (1987). Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22, 110-180.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
7. Caris, C., Hordt, W., Hawkins, H. J., Romheld, V. & George, E. (1998). Studies of iron transport by arbuscular mycorrhizal hyphae from soil to peanut and sorghum plants. *Mycorrhiza*, 8, 35-39.
8. Carlberg, I. & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490.
9. Carmanol, F., Sinet, P. M., Rapin, J. & Jerome, H. (1981). Glutathione S-transferase of human red blood cells assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: hyperbilirubinemia and impaired renal function. *Clinica Chimica Acta*, 117, 209-217.
10. Chaudhary, V., Kapoor, R. & Bhatnagar, A. K. (2007). Effect of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*, 17, 581-587p.
11. Clive, L., Sze-Chung, S. & Nicholson, R. (1998). Reduction of light induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls implication for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiology*, 116, 979-989.
12. El-Fouly, M. M., Mobarak, Z. M. & Salama, Z. A. (2011). Micronutrients (Fe, Mn, Zn) foliar spray for increasing salinity tolerance in wheat *Triticum aestivum* L. *African Journal of Plant Science*, 5, 314-322.
13. Esmailpour, B. & Amani N. (2014). Investigating the effect of mycorrhizal inoculation on growth and uptake of nutrients in *Lactuca sativa* cv. Syaho. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 4 (2), 49-68. (in Farsi).
14. Eydzadeh K., Mahdavi Damghani A., Sabahi H. & Soufizadeh S. (2010). Effect of integrated application of biofertilizer and chemical fertilizer on growth of maize (*Zea mays* L.) in Shushtar. *Journal of Agroecology*, 2 (2), 292-301. (in Farsi).
15. Hejazi, A. & Kafashi sedghi, M. (2014). *Plant growth substances: principles and applications*. Tehran University Press. 362pp. (in Farsi).
16. Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
17. Kaymak, H. C., Yarali, F., Guvence, I. & Figen Donmez, M. (2008). The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 7(24), 4479-4483.
18. Khan, A. G. (2005) Mycorrhizas and phytoremediation. In: Willey N. (Ed.): *Method in Biotechnology-Phytoremediation: Methods and Reviews*. Totowa, USA: Humana Press.
19. Kokalis-Buerelle, N., Kloepper, J. W. & Reddy, M. S. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Journal of Applied Soil Ecology*, 31, 91-100.
20. 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.

21. Kuckaki, A. & Banaian, M. (1994). Crop physiology. Mashhad University Press. 380 pp. (in Farsi).
22. Mahmoudzadeh, M., Rasouli-Sadaghiani, M. H., Hassani, A. & Barin, M. (2015). The role of mycorrhizal inoculation on growth and essential oil of peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Horticultural Science*, 29(3), 342-348. (in Farsi)
23. Marius, S., Octavita, A., Eugen, U. & Vlad, A. (2005). Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 12 (2), 11-14.
24. Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Academic Press, pp: 889.
25. Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J. M. & Azcon, R. (2007). Drought tolerance and antioxidant activities in lauder plants colonized by native drought-tolerant of drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology*, 54, 543-552.
26. Mazaherinia, S., Astaraci, A, L., Fotovat, A. & Monsh, A. (2010). A comparison of uptake and concentration of iron (Fe) in wheat (*Triticum aestivum* L.) plant using ordinary and nano iron oxides. *Agronomy Journal*, 92, 103-111. (in Farsi)
27. 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 Farsi)
28. 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 that is inducible by sugars. *Plant Journal*, 11, 841-851.
29. 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 Farsi)
30. Moneral, C. M., Derosa, M., Mallubhotla, S. C., Bindraban, P. S. & Dimkp, A. C. (2015). The application of nanotechnology for micronutrients in soil-plant systems. Virtual Fertilizer Research Center. VFRC Report. 44 pp.
31. Nakano, Y. & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiology*, 28, 131-140.
32. Perkin, E. (1982). *Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry*. Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut, USA.
33. Peyvandi, M., Parande, H. & Mirza, M. (2011). Comparison on nano Fe chelate with Fe chelate on growth parameters and antioxidant enzymes active of *Satureja hortensis*. *New Cellular and Molecular Biotechnology*, 2(5), 25-32. (in Farsi)
34. Porcel, R. & Ruiz-Lozano, J. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1743-1750.
35. 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 Farsi)
36. Rodony A. S. (2000). *Plant nutrients*. Academic press. Orlando, FL.
37. Ruiz, J. M., Baghour, M. & Romers, L. (2000). Efficiency of the different genotypes of tomato in relation to foliar content of Fe and the response of some bio indicators. *Journal Plant Nutrition*, 23, 1777-86.
38. Samawati, S. & Malekoti, M. (2005). *The necessity of using organic acids for quantitative and qualitative increase of agricultural products*. Technical Publication No. 463. Senate Publications, Tehran, Iran. (in Farsi)
39. Selvaraj, T. & Chellappan, P. (2006). Arbuscular mycorrhizae: A diverse personality. *Journal of Central European Agriculture*, 7, 349-358.
40. Shady, M. A., Ibrahim, I. & Afify, A. H. (1984). Mobilization of elements and their effects on certain plant growth characteristics as influenced by some silicate bacteria. *Egyptian Journal of Botany*, 27(1-7), 17-30.
41. Sharma, P. K. & Hall, D. O. (1991). Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *Journal Plant Physiology*, 138 (5), 614 - 19.
42. Sinha, S. & Saxena, R. (2002). Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidant content in medicinal plant *Bacopa monnieri*. *Chemosphere*, 22(3), 134-132.
43. Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N. & Knezevic-Vukcevic, J. (2011). Improvement of common bean growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5919-5926.
44. Sun, B., Jing, Y., Chen, K., Song, L., Chen, F. & Zhang, L. (2007). Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). *Journal of Plant Physiology*, 164, 536-543.

45. Taherkhanchi, A., Akbari, Gh., Modares Sanavi, S. A. M. & Ghorbani Javid, M. (2012). Evaluation of effects of bio-fertilizers on some physiological and biochemical traits in soybean under water deficit condition. *Agricultural Crop Management*, 15(3), 141-153. (in Farsi)
46. Vattani, H., Keshavarz, N. & Baghaei, N. (2012). Effect of sprayed soluble different levels of iron chelate nano fertilizer on nutrient uptake efficiency in two varieties of spinach (Varamin88 and Virofly). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(S), 2651-2656.
47. Wahing, I, W., Van, V. J. G., Houba, J. & Vanderlee, J. (1989). *Soil and plant analysis, a series of syllabi*. part 7. plant analysis procedure. Wageningen Agriculture University.
48. Yousef Zadeh, 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 Farsi)
49. 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 Farsi)