

## اثر نانو ذرات اکسید آهن بر رشد و فیزیولوژی گیاه یونجه (*Medicago sativa L*) تلقیح یافته با *Rhizobium meliloti*

مهری عسکری <sup>\*</sup>Ph.D.، سید مهدی طالبی Ph.D.، معصومه شفیعی گواری M.Sc.

دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-askary@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر برهم کنش تلقیح باکتریایی و تیمار آهن (نانو و کلات آهن) بر خصوصیات فیزیولوژیکی یونجه می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه اثرات تلقیح *Rhizobium meliloti* سویه استاندارد، غلظت های مختلف آهن (کلات آهن، ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانو ذرات اکسید آهن) و اثر متقابل تلقیح باکتریایی و تیمار آهن به مدت ۴۵ روز بر گیاه یونجه در قالب آزمایشات فاکتوریل در یک طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مطالعه شده است. صفات مورد ارزیابی شامل شاخص های رشد، مقدار رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، پرولین، فعالیت آنتی اکسیدانت ها، درصد فعالیت بازدارندگی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و مقدار عناصر بودند.

**نتایج:** تلقیح ریزوبیومی به تنهایی اثرات سودمندی بر رشد یونجه نشان داد و باعث افزایش پارامترهای رشد، رنگیزه ها، میزان پروتئین و جذب پتاسیم و فسفر شد اما بر مقدار پرولین و آنتی اکسیدانت ها اثری نداشت. تیمار آهن بر پارامترهای رشد، رنگیزه ها، میزان پروتئین و جذب عناصر اثر مثبت داشت. بیشترین شاخص های رشد در غلظت ۲۵ میکرومولار نانو آهن مشاهده شد. بیشترین مقدار پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانتی در شاهد (۰ نانواهن) سنجش شد. از این رو این غلظت برای گیاه یونجه تنش محسوب می شود. اثرات منفی ناشی از تیمار ۰ میکرومولار نانو آهن بر گیاه یونجه تلقیح یافته با ریزوبیوم ملیوتی کاهش یافت. در واقع ریزوبیوم با کاهش شرایط تنش باعث افزایش مقاومت گیاهان تلقیح یافته می شود.

**نتیجه گیری:** هم زیستی ریزوبیوم-یونجه همراه با نانوکود آهن علاوه بر افزایش رشد گیاه می تواند باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش ها شود. بیشترین مقدار پارامترهای رشد، رنگیزه ها و پروتئین در گیاهان تلقیح یافته با ریزوبیوم ملیوتی و ۱۰ میکرومولار نانو آهن اندازه گیری شد.

**واژگان کلیدی:** آنتی اکسیدانت، پروتئین، تلقیح باکتریایی، شاخص های رشد، نانوکود

## مقدمه

یونجه *Medicago sativa* یکی از مهم‌ترین محصولات علوفه‌ای خانواده لگوم است که در سراسر جهان کشت می‌شود. در ریشه‌ی اغلب گیاهان خانواده‌ی لگومینوزه از جمله یونجه برآمدگی‌هایی (گرهک) حاوی باکتری ریزوبیوم قرار دارد (۱). ریزوبیوم از ریزوباکترهای محرک رشد گیاه *Plant Growth Promoting Rhizobacter* (PGPR) است. این باکتری‌ها به‌طور مستقیم با تثبیت نیتروژن، محلول‌سازی فسفر، افزایش آهن در دسترس، تولید ویتامین و هورمون‌های گیاهی (اکسین، سیتوکینین، ژبرلین و آبسیزیک اسید) و به‌طور غیرمستقیم با رهاسازی آهن از ریزوسفر، تولید آنتی‌بیوتیک، تخریب اتیلن از طریق آنزیم ACC دآمیناز و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (۲). در سال‌های اخیر کاربرد ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان به‌عنوان کود زیستی، بازده محصولات کشاورزی را بدون اثرات نامطلوب بر خواص خاک بالا برده است زیرا تولید محصولات کشاورزی مستلزم استفاده‌ی مداوم از کودهای شیمیایی است که تعادل طبیعی را برهم می‌زنند، سبب انباشت آلاینده‌ها شده و سود اقتصادی را کاهش می‌دهند (۳).

آهن از عناصر ضروری کم‌مصرف است که در فتوسنتز، تنفس و تثبیت نیتروژن نقش دارد، در بخش کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیا قرار گرفته و برای سنتز کلروفیل و RNA مورد نیاز است. آهن در طبیعت به دو فرم وجود دارد. فرم نسبتاً محلول در آب (آهن فرو  $Fe^{2+}$ ) و فرم غیرمحلول (آهن فریک  $Fe^{3+}$ ). آهن فریک فرم پایدار غالب در محیط‌های غنی از اکسیژن و خاک‌های خنثی و قلیایی است. یکی از مشکلات عمده خاک‌های قلیایی که بخش عمده‌ای از خاک مناطق خشک و نیمه‌خشک است، کمبود آهن قابل استفاده گیاه به‌دلیل pH بالای این خاک‌ها می‌باشد. با وجودی که بیشتر خاک‌ها آهن زیادی دارند ولی بیشتر آهن خاک‌ها به فرم هیدروکسید یا سایر کمپلکس‌های غیرمحلول رسوب کرده و در دسترس گیاه قرار نمی‌گیرد. انتخاب گیاه مناسب با تحمل بالا در خاک‌های قلیایی، اسیدی کردن خاک، افزودن سولفات آهن (II) به خاک که سبب اسیدی شدن خاک و افزایش حلالیت آهن می‌شود و استفاده از کلات آهن از راه‌های کاهش کمبود آهن می‌باشد (۴). استفاده از ریزوباکترهای محرک رشد که قادر به تولید سیدروفور یا سیستم جذب آهن هستند نیز مفید است (۵). یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری نانو در کشاورزی، استفاده از نانوکودها جهت تغذیه گیاهان می‌باشد. با بهره‌گیری از نانوکودها، عناصر غذایی به‌آرامی و با سرعتی مناسب در تمام فصل رشد گیاه آزاد می‌شوند و به‌دلیل کاهش آبشویی عناصر، گیاهان قادر به جذب بیشتر عناصر خواهند بود و آلودگی‌های زیست محیطی کاهش می‌یابد. نانو ذرات به‌علت سطح ویژه، چگالی بیشتر، نواحی واکنشی زیاد روی سطوح از واکنش‌پذیری زیاد برخوردار هستند. بنابراین جذب نانوکودها توسط گیاه آسان‌تر است. نانو اکسید آهن سبب اسیدی شدن خاک، افزایش حلالیت عناصری مثل مس و روی، افزایش نسبت  $Fe^{2+}$  به  $Fe^{3+}$  و در نتیجه سبب افزایش جذب عناصر فوق و افزایش رشد گیاه می‌شود (۶). نانو ذرات می‌توانند دارای اثرات خنثی، منفی یا مثبت بر رشد گیاهان، همچنین رشد و توسعه همزیستی ریزوبیومی داشته باشند. غلظت نانو ذرات مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده سمیت نانو ذرات است، زیرا حتی نانو ذرات کمتر سمی مثل نانو ذرات اکسیدروی نیز می‌توانند در غلظت‌های بالا مہارکننده باشند و نانو ذرات بسیار سمی مانند نقره می‌توانند در غلظت‌های پایین تحریک‌کننده رشد گیاهان باشند (۷). غلظت‌های محیط زیستی نانو ذرات بر جوامع میکروبی خاک، گردش مواد مغذی و انتشار گازهای گلخانه‌ای تاثیر می‌گذارد (۸). علاوه بر غلظت، نوع نانو ذرات، اندازه آن‌ها، روش کاربرد، گونه گیاهی هدف و شرایط آزمایشگاهی (۹ و ۱۰) نیز می‌تواند در نوع پاسخ موثر باشد. برخی مطالعات نشان می‌دهد که حضور نانو ذرات در خاک می‌تواند منجر به کاهش تنوع و عملکرد میکروارگانیسم‌های خاک شوند (۱۱) درحالی‌که مطالعاتی نیز بیان‌کننده اثرات مثبت نانو ذرات بر جوامع میکروبی خاک و عملکرد آن‌ها (۱۲) است. مثال‌های متعددی بیان‌کننده اثرات مثبت یا منفی نانو ذرات بر روی همزیستی ریزوبیومی است. به‌عنوان مثال، رشد و نمو گرهک در گیاهان سویا در معرض نانو ذرات  $Fe_3O_4$  افزایش یافته است (۱۳). همچنین در

بررسی اثر نانو ذرات اکسید آهن  $Fe_2O_3$  بر گرهک سازی و برقراری همزیستی در *pea-Rhizobium* در محیط ورمیکولیت، غلظت ۳ گرم در لیتر نانو ذرات طی ۲۰ روز اثر منفی و در مدت ۳۵ روز اثر مثبت داشت ولی با افزایش غلظت تا ۶ گرم در لیتر بدون توجه به تعداد روزهای در معرض (۲۰ تا ۳۵ روز) اثر معنی داری (نه منفی و نه مثبت) نداشت (۱۴). البته باید توجه داشت که اکثر مطالعات ریزوبیومی در محیط بدون خاک یا هیدروپونیک انجام شده، که در این محیطها فراهمی زیستی و تاثیرپذیری نانو ذرات با سیستم خاک خیلی متفاوت است (۷). به منظور بهره برداری از پتانسیل فناوری نانو برای بهبود امنیت غذایی جهان، کاهش اثرات بد رد پای محیطی نانو در کشاورزی و حفظ عملکرد و انعطاف پذیری اکوسیستم، احتیاج به تحقیقات روی برهم کنش های بین نانو ذرات و همزیست های ریزوبیومی می باشد. در این پژوهش تاثیر توام نانو ذرات اکسید آهن و تلقیح باکتری ریزوبیوم بر شاخص های رشد، جذب عناصر و فیزیولوژی گیاه یونجه بررسی شد.

### مواد و روش ها

**تهیه سویه باکتریایی:** ریزوبیوم *Rhizobium meliloti* استاندارد به صورت آمپول لیوفیلیزه (Persian Type Culture Collection: PTCC1684) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری و در شرایط استریل با کمک سوهان ضد عفونی شده، شکسته و با تزریق مقدار کمی آب استریل به حالت تعلیق درآمد. مقدار کمی از محلول باکتریایی فوق به محیط کشت YMA (۱۵) جامد منتقل شد. پلیت ها در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز انکوبه شدند. سپس کلنی های ریزوبیوم ملیوتی به اسلنت های محتوی محیط YMA جامد جهت ذخیره ماهیانه و استفاده در آزمایشات بعدی به یخچال انتقال یافتند.

**آماده سازی مایه تلقیح:** در شرایط استریل یک لوپ ریزوبیوم ملیوتی از محیط کشت جامد به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت YMA مایع منتقل و در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت روی انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۰۰ کشت داده شد (۱۵) غلظت مناسب ریزوبیوم جهت تلقیح موفقیت آمیز یونجه  $10^5 \text{ cfu ml}^{-1}$  می باشد (۱۶). جهت تهیه غلظت فوق از جذب نوری استفاده شد. اگر جذب نوری محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۰/۱ باشد غلظت ریزوبیوم  $10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$  در نظر گرفته می شود (۱۷). سپس غلظت  $10^5 \text{ cfu ml}^{-1}$  باکتری با رقیق نمودن محلول اولیه توسط YMA مایع تهیه شد.

**آماده سازی و تلقیح بذر:** بذر یونجه رقم همدانی *Medicago sativa cv. Hamedani* از مرکز تحقیقات سازمان جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. بذرها توسط اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (۵ دقیقه) ضد عفونی سطحی و به دو گروه تقسیم شدند: گروه بذرها تلقیحی، تعدادی بذر استریل در مایه تلقیح ریزوبیوم با غلظت  $10^5 \text{ cfu ml}^{-1}$  در درجه حرارت محیط به مدت ۲ ساعت تحت خلا حاصل از یک پمپ کوچک، به منظور تسهیل نفوذ سویه باکتریایی به درون بذر از طریق منافذ بذر، قرار گرفتند (۱۶) و گروه بذرها شاهد بدون تلقیح که در بافر فسفات استریل در همان شرایط قرار گرفتند.

**تهیه و آماده سازی نانو آهن:** نانو ذرات اکسید آهن  $Fe_2O_3$  از شرکت پیشگامان نانومواد مشهد تهیه شد. براساس کاربرد پراش اشعه ایکس XRD و تصویر میکروسکوپ SEM، ابعاد نانو ذرات اکسید آهن استفاده شده بین ۲۷ تا ۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۸). هر هفته ۰/۱۶ گرم از این ماده با آب مقطر دوبار تقطیر در بالن ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل نیم ساعت در دستگاه اولتراسونیک با توان ۱۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار داده شد (اولتراسونیک نانو

مواد را پخش می‌کند). سپس به منظور حل کردن نانو ذرات، ۴ ساعت روی شیکر همراه مگنت گذاشته تا نانومواد دوباره به هم نجسید (۱۹).

**کاشت گیاهان یونجه:** بذره‌های یونجه تلقیح‌یافته با ریزوبیوم و بذره‌های شاهد (تلقیح‌نشده) بر روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش‌های جداگانه ۲۴ ساعت در تاریکی و ۲۵ درجه سانتی‌گراد جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. سپس گیاهک‌های یک روزه به گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴×۱۲ سانتی‌متر حاوی پرلیت منتقل شدند. در هر گلدان ۱۵ گیاهک قرار گرفت. گلدان‌ها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۸ درجه سانتی‌گراد به‌هنگام روز و شب قرار گرفتند. آبیاری طی ۴۵ روز، هر هفته با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نیمه‌هولگند (غلظت ۱۸ میکرومولار کلات آهن) و یا محلول نیمه‌هولگند فاقد کلات آهن و محتوی غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار) انجام شد (۲۰). غلظت‌های فوق براساس غلظت آهن در محلول هولگند (کمتر و بیشتر از ۱۸ میکرومولار) انتخاب شدند. در غلظت‌های تیمار صفر آهن هیچ آهنی (نه نانو و نه کلات آهن) در کل دوره دریافت نکرده است. برداشت نهایی در روز ۴۵ انجام شد.

**اثبات حضور ریزوبیوم درون گیاهان تلقیح‌شده:** از هر گلدان، ریشه یک گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط YMA مایع به وسیله انبرک له شد و یک لوپ استریل از محلول فوق به YMA جامد انتقال یافت (۱۵). یک لوپ هم به ۱۰ میلی‌لیتر محیط YMA مایع منتقل شد، از این محلول نیز یک لوپ به محیط YMA جامد منتقل و غلظت یک‌صدم به‌دست آمد. پتری‌دیش‌های فوق به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند و ۲ روز بعد، ریزوبیوم‌ها براساس آزمایشات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کتاب برگ‌گی Bergeys Manual of systematic Bacteriology شناسایی و شمارش شدند (۲۱).

**اندازه‌گیری فاکتورهای رشد:** روز برداشت (روز ۴۵)، ارتفاع، سطح و تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ، ساقه و ریشه سه گیاه از هر تیمار اندازه‌گیری شد. جهت وزن خشک، نمونه‌ها ۲۴ ساعت در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد، تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی:** سنجش کلروفیل  $a$ ،  $b$  و کلروفیل کل با خواندن جذب عصاره برگ در استن در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر (۲۲)، اندازه‌گیری کاروتنوئیدها با خواندن جذب عصاره در طول موج ۴۷۰ نانومتر (۲۳)، اندازه‌گیری پرولین توسط معرف نین‌هیدرین (۲۴)، مقدار پروتئین به روش برادفورد (۲۵) با استفاده از پودر آلبومین سرم گاو BSA به‌عنوان محلول استاندارد اندازه‌گیری شد. کمیت آنتی‌اکسیدانتی %I با آزمون مهار فعالیت ۱ و ۱-آدی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل DPPH تعیین شد (۲۶)، به‌منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی، عصاره آنزیمی برگ تهیه شد (۲۷). در عصاره فوق فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD (۲۷)، کاتالاز CAT (۲۸) و گایاکول پراکسیداز GPOX (۲۹) سنجش شد.

اندازه‌گیری پتاسیم و سدیم در خاکستر بخش هوایی با دستگاه فلیم‌فوتومتر (مدل JEANWAYPFP7 ساخت انگلستان) و استانداردهای کلرور پتاسیم و سدیم (۳۰)، اندازه‌گیری فسفر با خواندن جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر (۳۱)، اندازه‌گیری آهن و روی با دستگاه جذب اتمی (مدل AA680- Shimadzu ساخت ژاپن) و مقایسه با منحنی استاندارد حاصل از محلول‌های با غلظت‌های مختلف کلرید آهن و نیترات روی (۳۲) انجام شد.

## آنالیز آماری

کل آزمایش‌ها در سه تکرار، در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش‌های فاکتوریل انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS16، مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و رسم نمودارها از نرم‌افزار IecxE استفاده شد.

## نتایج

در این آزمایش سویه استاندارد ریزوبیوم ملیوتی پس از فعال‌سازی جهت مایه تلقیح استفاده شد. پس از ۳ روز کشت حاصل از ریشه گیاهان تلقیح شده، کلنی‌های حلقوی، به قطر ۴-۲ میلی‌متر، محدب و برجسته، نیمه‌شفاف، مات، لزج و موسیلاژی در پتری‌دیش‌ها ظاهر شد که تأیید کننده باکتری ریزوبیوم ملیوتی بود. پس از واکشت، کلنی‌های منفرد، کدر و موسیلاژی تشکیل شد. به دنبال رنگ‌آمیزی گرم، ریزوبیوم ملیوتی به رنگ صورتی درآمد. در غلظت‌های یک‌صدم قادر به شمارش کلنی‌های منفرد باکتری شدیم، پس از شمارش تعداد کلنی‌ها آن‌ها را در عکس رقت ضرب کردیم و تعداد باکتری در هر تیمار مشخص شد. بررسی‌های میکروسکوپی و شمارش باکتری (جدول ۱) حضور و نفوذ باکتری را به‌طور وسیعی در ریشه گیاهان تلقیح شده نشان می‌دهد. برای ریشه گیاهان غیرتلقیحی نیز این مراحل انجام شد ولی هیچ کلنی باکتری و گرهکی دیده نشد.

جدول ۱: نتایج شمارش باکتری ریزوبیوم در ریشه گیاهان تلقیح شده و تیمارهای مختلف آهن

نانو ذرات اکسید آهن (میکرومولار $\mu\text{M}$ )					کلات آهن	تیمار آهن
$25\mu\text{M}$	$20\mu\text{M}$	$10\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$	صفر $\mu\text{M}$	$18\mu\text{M}$	
$53 \times 10^2$	$50 \times 10^2$	$302 \times 10^2$	$41 \times 10^2$	$112 \times 10^2$	$75 \times 10^2$	تعداد کلنی شمارش شده در گیاهان تلقیحی

نتایج آنالیز واریانس (جداول ۲ تا ۵) اثر معنی‌دار (سطح ۰/۰۵) تلقیح باکتریایی را بر سطح و تعداد برگ، ارتفاع، عمق ریشه، وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم، فسفر، روی و آهن (سطح ۰/۰۱)، اثر معنی‌دار (سطح ۰/۰۱) تیمار آهن و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن را بر سطح برگ، ارتفاع، عمق ریشه، وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، پروتئین، پتاسیم، فسفر، آهن و روی گیاهان یونجه ۴۵ روزه نشان می‌دهد. تیمار آهن بر کمیت آنتی‌اکسیدان‌تی ۱٪ و فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPOX اثر معنی‌دار (سطح ۰/۰۱) و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن بر فعالیت آنزیم SOD (سطح ۰/۰۱)، کمیت ۱٪ و آنزیم‌های CAT و GPOX اثر معنی‌دار (سطح ۰/۰۵) را نشان می‌دهد. تلقیح باکتریایی اثر معنی‌داری بر میزان پرولین، کمیت I، فعالیت SOD، CAT و GPOX نداشته است. تیمار آهن، تلقیح باکتریایی و اثر متقابل تیمار آهن-تلقیح باکتریایی بر میزان عنصر سدیم اثر معنی‌داری ندارد. تیمار آهن و اثر متقابل تیمار آهن-تلقیح باکتریایی بر تعداد برگ اثر معنی‌داری نشان نمی‌دهند.

جدول ۲: جدول آنالیز واریانس اثر تلقیح باکتریایی، تیمار آهن و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن بر وزن تر و خشک گیاه یونجه ۴۵ روزه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

وزن ریشه		وزن برگ		وزن ساقه		منابع تغییر
تر	خشک	تر	خشک	تر	خشک	
$0/26^*$	$0/05^*$	$0/72^*$	$0/3^*$	$0/065^*$	$1/04^*$	تلقیح باکتریایی
$148/7^{**}$	$165/89^{**}$	$68/15^{**}$	$163/42^{**}$	$114/47^{**}$	$181/72^{**}$	تیمار آهن
$230/04^{**}$	$255/52^{**}$	$132/27^*$	$273/67^{**}$	$165/43^{**}$	$255/1^{**}$	اثر متقابل تلقیح و آهن
		$^{**}$ معنی‌دار در سطح ۰/۰۱	$^*$ معنی‌دار در سطح ۰/۰۵	$^{ns}$ معنی‌دار نیست		

جدول ۳: آنالیز واریانس اثر تلقیح باکتریایی، تیمار آهن و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن بر رنگبزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، پروتئین و عمق ریشه یونجه ۴۵ روزه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پروکلین	پروتئین	عمق ریشه
تلقیح باکتریایی	۰/۶*	۰/۰۵*	۰/۱۴۸*	۲/۵۳*	۰/۴۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۷۸*	۱/۲۱*
تیمار آهن	۴۳۳/۶۶**	۲۶۱/۹۸**	۵۳۹/۴۵**	۱۵۶/۷۱**	۱۲۲/۳۳**	۲۵۶/۵۶**	۱۷۱/۵۷**
اثر متقابل تلقیح و تیمار آهن	۴۴۸/۵۵**	۲۸۶/۷۸**	۵۸۳/۰۴**	۱۹۹/۲۳**	۴۹/۷۵**	۴۰۵/۸۹**	۲۵۴/۳۹**
	<sup>ns</sup> معنی دار نیست	* معنی دار در سطح ۰/۰۵	* معنی دار در سطح ۰/۰۵	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱

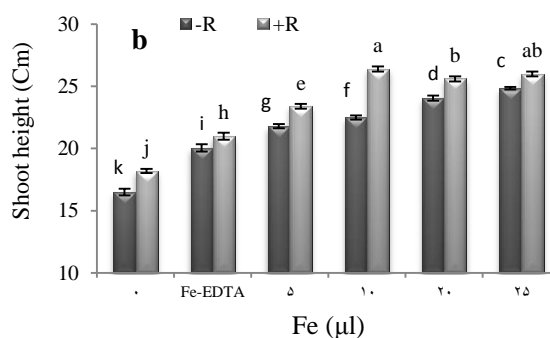
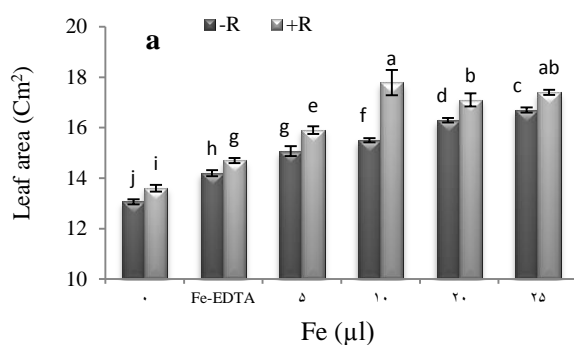
جدول ۴: آنالیز واریانس اثر تلقیح باکتریایی، تیمار آهن و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز، I کمیته آنتی اکسیدانتهی %، و ارتفاع گیاه یونجه ۴۵ روزه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	سوپراکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز	I کمیته آنتی اکسیدانتهی %	ارتفاع
تلقیح باکتریایی	۰/۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	۱/۴۳ <sup>ns</sup>	۰/۱۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۴۵*
تیمار آهن	۳/۹۹**	۳/۱۴**	۳/۲۶**	۲/۳۷**	۱۶۳/۸۱**
اثر متقابل تلقیح و تیمار آهن	۳/۵۸**	۲/۲۹*	۲/۳*	۳/۲۷*	۲۰۱/۸۳**
	<sup>ns</sup> معنی دار نیست	* معنی دار در سطح ۰/۰۵	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱

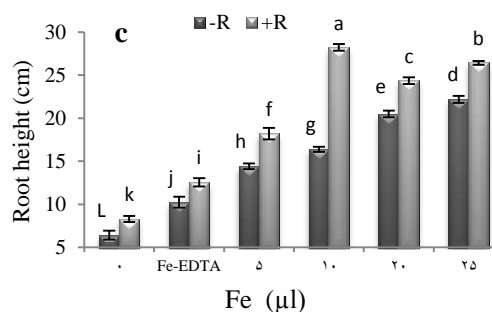
جدول ۵: آنالیز واریانس اثر تلقیح باکتریایی، تیمار آهن و اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن بر میزان پتاسیم، فسفر، سدیم، آهن و روی، سطح و تعداد برگ گیاه یونجه ۴۵ روزه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	پتاسیم	فسفر	سدیم	آهن	روی	سطح برگ	تعداد برگ
تلقیح باکتریایی	۳/۷۹	۴/۴۶*	۰/۰۱۷ <sup>ns</sup>	۱/۶۷**	۰/۵۴*	۰/۴۷*	۱۷/۹۶*
تیمار آهن	۵۴۰/۳۹**	۱۶۱/۱**	۳/۲۷ <sup>ns</sup>	۲۰۸/۴۳**	۱۳۰/۷**	۱۰۳/۸۲**	۰/۹۷ <sup>ns</sup>
اثر متقابل تلقیح و تیمار آهن	۱۱۹/۹۴**	۱۵۳/۹۱**	۲۵/۲۷ <sup>ns</sup>	۱۹۶/۶۸**	۱۵۹/۲۱۶**	۱۴۳/۴۹**	۲/۱۲ <sup>ns</sup>
	<sup>ns</sup> معنی دار نیست	* معنی دار در سطح ۰/۰۵	* معنی دار در سطح ۰/۰۵	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱	** معنی دار در سطح ۰/۰۱

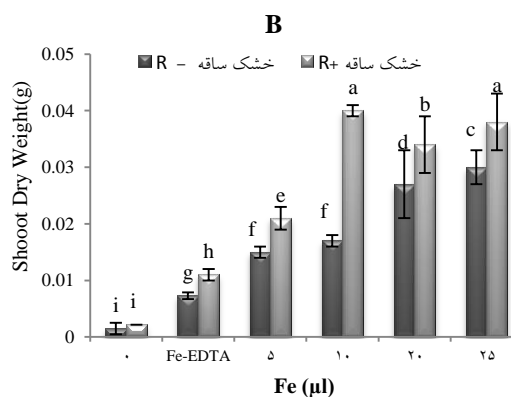
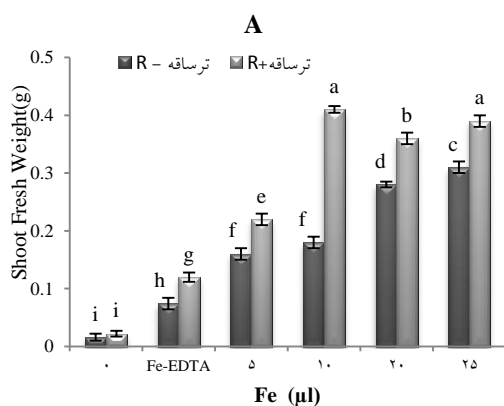
کمترین و بیشترین ارتفاع، عمق ریشه و سطح برگ به ترتیب متعلق به گیاهان شاهد (تلقیح نشده و صفر آهن) و گیاهان تلقیح شده در غلظت ۱۰ میکرومولار نانو ذرات اکسید آهن است. در گیاهان تلقیح شده در غلظت ۱۰ میکرومولار نانو آهن به ترتیب افزایش ۱/۶، ۴/۳۹ و ۱/۴ برابری ارتفاع، عمق ریشه و سطح برگ نسبت به شاهد مشاهده می شود. با افزودن آهن هم در گیاهان تلقیح نشده و هم گیاهان تلقیح شده، سطح برگ، ارتفاع گیاه و عمق ریشه افزایش معنی داری می یابد ولی این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیش از گیاهان تلقیح نشده است. افزایش سطح برگ، ارتفاع و عمق ریشه نسبت به شاهد حتی در حضور ۵ میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن است. در عدم حضور آهن در گیاهان تلقیح شده به ترتیب افزایش ۴/۱۳، ۱۰/۳ و ۲۹/۰۸ درصدی سطح برگ، ارتفاع و عمق ریشه نسبت به گیاهان شاهد مشاهده می شود (شکل ۱).

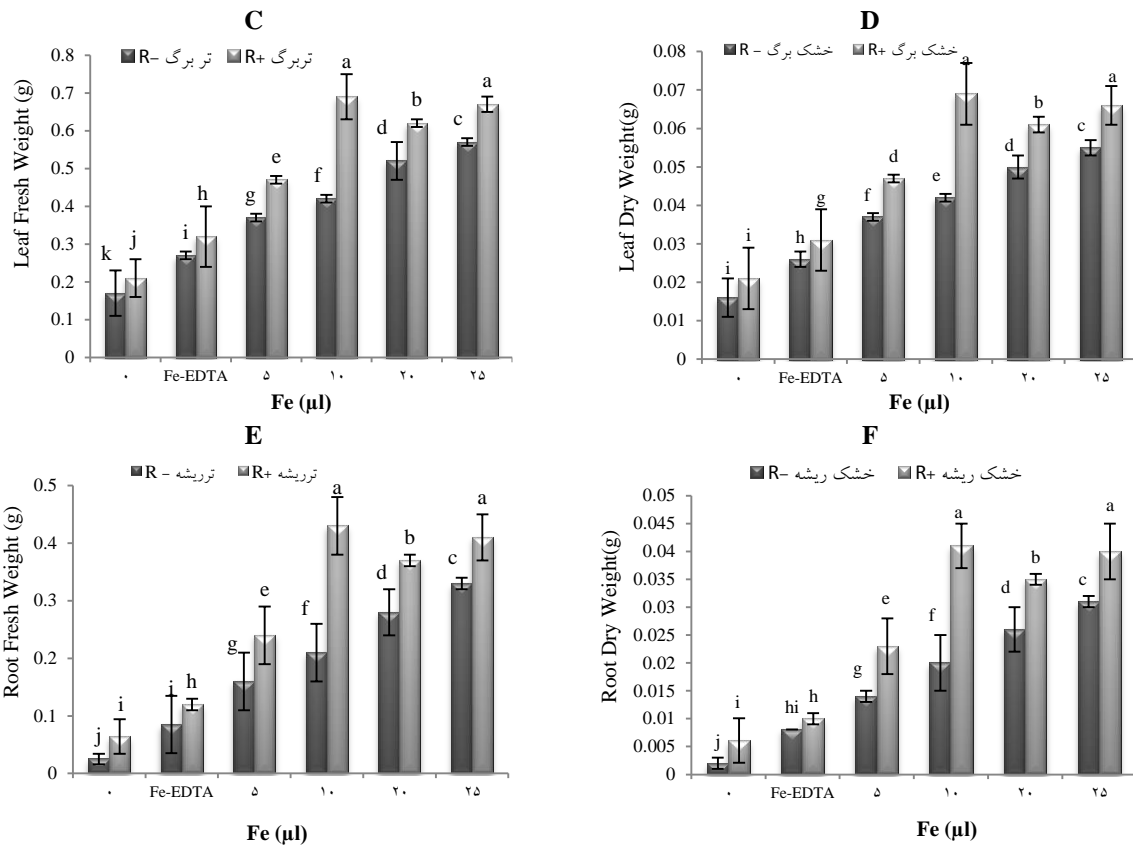


شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی-تیمار آهن (کلات آهن Fe-EDTA ۱۸ میکرومولار، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانو ذرات اکسید آهن) بر (a) سطح برگ (Cm<sup>2</sup>), (b) ارتفاع بخش هوایی (Cm) و (c) طول ریشه گیاه یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده SE و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن براساس آزمون دانکن است. -R: عدم تلقیح، +R: تلقیح با ریزوبیوم.



کمترین وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه در شاهد و بیشترین در گیاهان تلقیح شده و ۱۰ میکرومولار نانو آهن به ترتیب با افزایش ۲۵/۶۲ و ۸ برابری وزن تر و خشک ساقه، ۴/۰۵ و ۴/۳۷ برابری وزن تر و خشک برگ، ۱۷/۲ و ۲۰/۵ برابری وزن تر و خشک ریشه مشاهده شد. با افزودن آهن هم در گیاهان تلقیح شده و هم تلقیح نشده، شاخص‌های فوق افزایش داشتند ولی این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیش از تلقیح نشده است. در عدم حضور آهن در گیاهان تلقیح شده به ترتیب افزایش ۱/۲۵ و ۱/۴۶ برابری وزن تر و خشک ساقه، ۱/۲۳ و ۱/۲۵ برابری وزن تر و خشک برگ و ۲/۴ و ۳ برابری وزن تر و خشک ریشه مشاهده شد. افزایش شاخص‌های وزنی نسبت به شاهد حتی در حضور ۵ میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن است (شکل ۲).



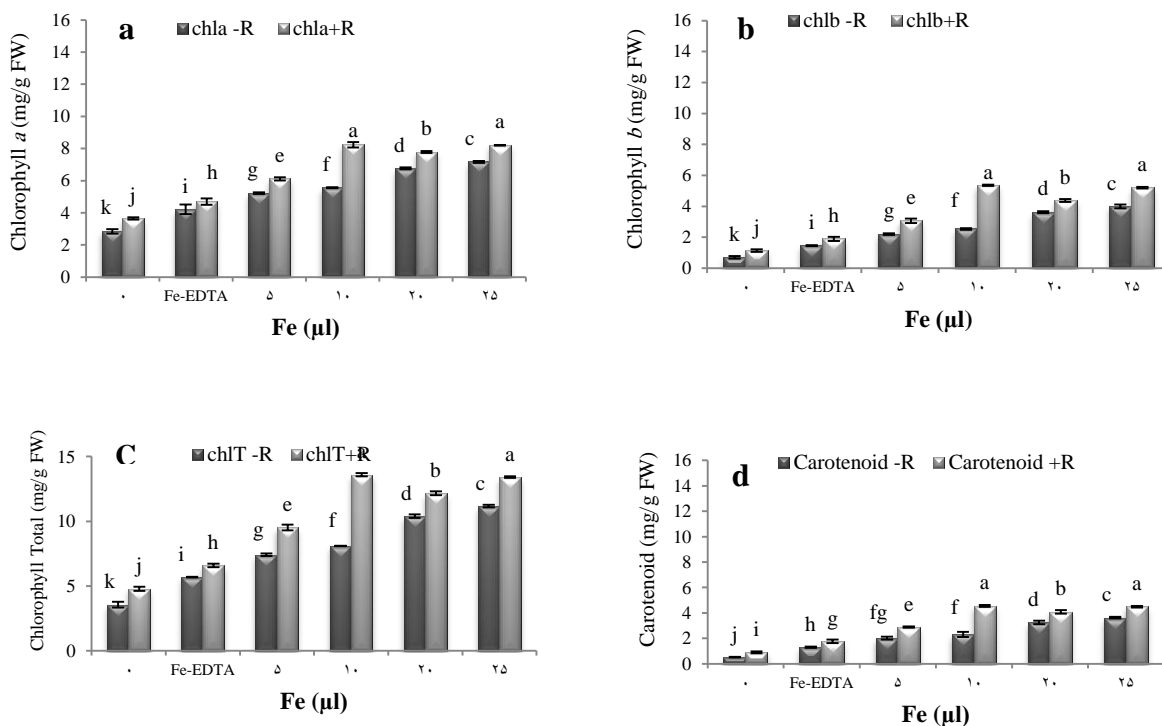


شکل ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی و تیمار آهن بر شاخص‌های وزنی گیاه یونجه. (a) وزن تر ساقه، (b) وزن خشک ساقه، (c) وزن تر برگ، (d) وزن خشک برگ، (e) وزن تر ریشه، (f) وزن خشک ریشه. خطوط نشان دهنده SE و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن است. R-: عدم تلقیح، R+: تلقیح با ریزوبیوم.

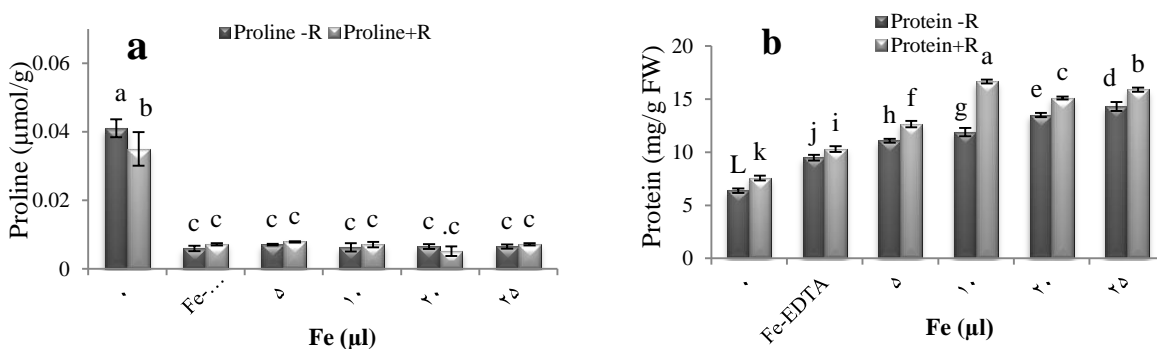
کم‌ترین میزان کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کارتنوئید در شاهد و بیش‌ترین میزان به‌ترتیب با ۲/۸۹، ۷/۵۴، ۳/۸۲ و ۸/۷۵ برابر افزایش نسبت به شاهد در گیاهان تلقیح شده و تحت غلظت ۱۰ میکرومولار نانو آهن مشاهده می‌شود. بین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان تلقیح شده تحت تیمار ۲۵ میکرومولار و ۱۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. با افزودن آهن هم در گیاهان تلقیح شده و هم تلقیح نشده مقدار رنگیزه‌ها افزایش معنی‌داری می‌یابد ولی این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیشتر است. افزایش مقدار رنگیزه‌ها در حضور ۵ میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن است (شکل ۳).

بیش‌ترین میزان پرولین (۰/۰۴۱۶ میکرومولار در گرم) در شاهد و کم‌ترین (۰/۰۳۵ میکرومولار در گرم) در گیاهان تلقیح شده و صفر آهن مشاهده شد یعنی تلقیح باکتریایی باعث کاهش ۱۵/۸۶ درصد پرولین شده است. در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری بین گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده مشاهده نمی‌شود (شکل ۴). کم‌ترین میزان پروتئین کل در شاهد و بیش‌ترین در گیاهان تلقیح شده و غلظت ۰۱ میکرومولار نانو آهن با افزایش ۲/۱۶ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد. با افزودن آهن هم در گیاهان تلقیح شده و هم گیاهان تلقیح نشده میزان پروتئین کل افزایش معنی‌داری نشان داد. این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیش از گیاهان تلقیح نشده است. افزایش میزان پروتئین کل در حضور ۵ میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن می‌باشد. در عدم حضور آهن در گیاهان تلقیح شده افزایش ۸۱/۸۶ درصدی میزان پروتئین نسبت به گیاهان تلقیح نشده مشاهده می‌شود (شکل ۴).





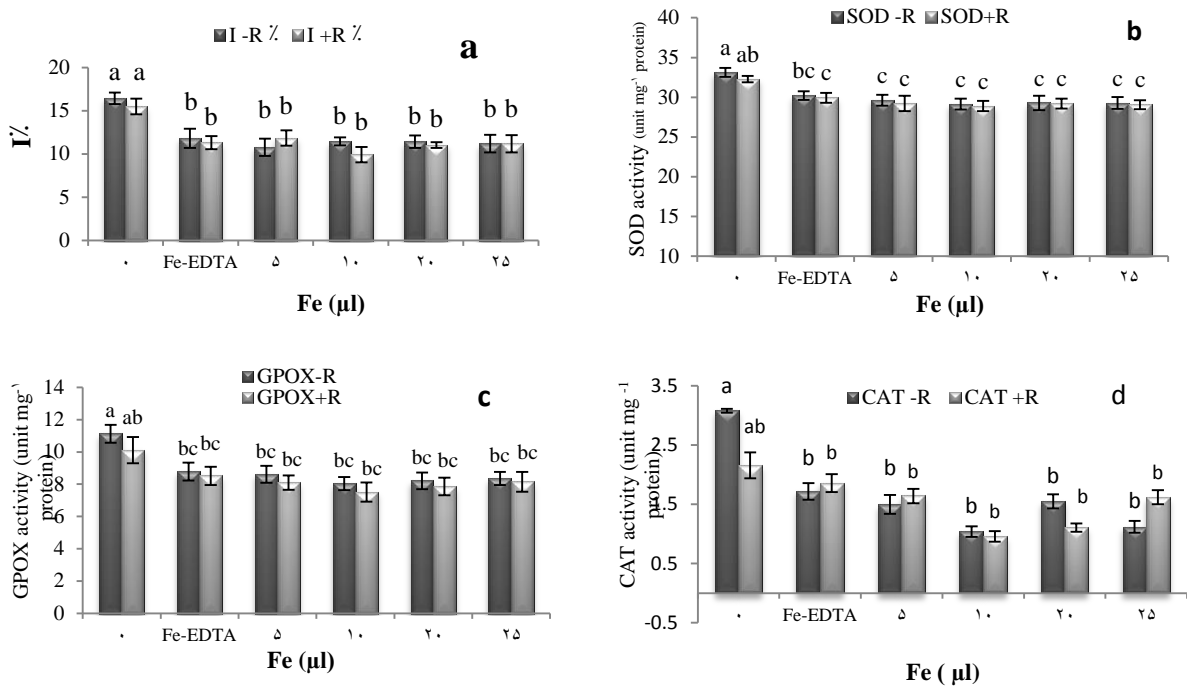
شکل ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی و تیمار آهن (کلات آهن Fe-EDTA ۱۸ میکرومولار، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانو ذرات اکسید آهن) بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی (mg/g FW). (a) کلروفیل a، (b) کلروفیل b، (c) کلروفیل کل، (d) کاروتنوئیدها. خطوط نشان دهنده SE و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن براساس آزمون دانکن است. -R: عدم تلقیح، +R: تلقیح باکتریایی.



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی و تیمار آهن (۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانو و کلات آهن Fe-EDTA ۱۸ میکرومولار) بر میزان پرولین (a) (μmol/g FW) و پروتئین کل (b) (mg/g FW) گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده SE و حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. -R: عدم تلقیح، +R: تلقیح باکتریایی.

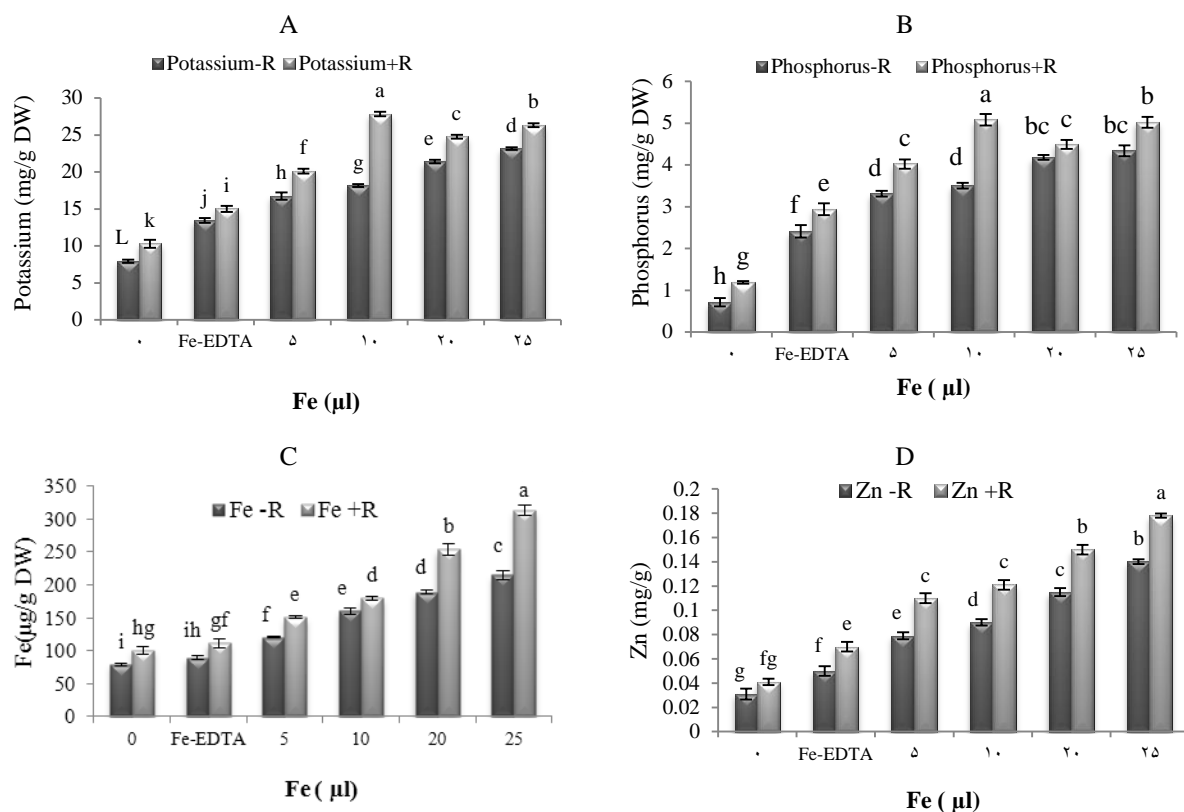
بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد ۱٪، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD، گایاکول پراکسیداز GPOX و کاتالاز CAT در شاهد مشاهده شد. بین گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده از نظر مقدار ۱٪، فعالیت SOD، GPOX و CAT اختلاف

معنی داری مشاهده نمی‌شود، ولی در حضور آهن کاهش معنی دار I، فعالیت SOD، GPOX و CAT نسبت به شاهد مشاهده می‌شود. بین تیمارهای آهن اختلاف معنی دار از نظر I، فعالیت SOD، GPOX و CAT مشاهده نمی‌شود (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی و تیمار آهن (0، 5، 10، 20 و 25 میکرومولار نانو آهن و کلات آهن Fe-EDTA 18 میکرومولار) بر مقدار کمی آنتی‌اکسیدانت I٪ (a)، میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD (b)، گایاکول پراکسیداز GPOX (c) و کاتالاز CAT (d) گیاهان یونجه 45 روزه. خطوط نشان دهنده SE و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. R- عدم تلقیح، R+ تلقیح باکتریایی.

کمترین مقدار عناصر پتاسیم، فسفر، آهن و روی در شاهد اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان تلقیح شده و غلظت 10 میکرومولار نانو آهن به ترتیب با 3/51 و 7/15 برابر افزایش نسبت به شاهد مشاهده می‌شود. بیشترین مقدار آهن و روی در گیاهان تلقیح شده و 25 میکرومولار نانو آهن به ترتیب با 3/94 و 5/74 برابر افزایش نسبت به شاهد مشاهده می‌شود. با افزودن آهن هم در گیاهان تلقیح شده و هم تلقیح نشده مقدار تمام عناصر افزایش معنی داری می‌یابد ولی این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیش از گیاهان تلقیح نشده است. افزایش میزان پتاسیم و فسفر نسبت به شاهد حتی در حضور 5 میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن است. در عدم حضور آهن در گیاهان تلقیح شده افزایش 29/88، 67/61، 33/22 و 27/93 درصدی میزان پتاسیم، فسفر، آهن و روی به ترتیب نسبت به شاهد مشاهده می‌شود (شکل 6).



شکل ۶: مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح باکتریایی و سطوح مختلف آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانو آهن و کلات آهن Fe-EDTA ۱۸ میکرومولار) بر مقدار پتاسیم (a) mg/g DW، فسفر (b) mg/g DW، آهن (c) μg/g DW و روی (d) mg/g DW گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده SE و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. -R: عدم تلقیح، +R: تلقیح باکتریایی.

## بحث

آهن به عنوان یک ریزمغذی در تشکیل کلروفیل، فتوسنتز و تنفس نقش اساسی دارد، برای برقراری همزیستی و عملکرد گرهک‌های درگیر در تثبیت نیتروژن ضروری است ولی به دلیل آهکی بودن یک سوم خاک‌های زیرکشت، گیاهان از کمبود آهن رنج می‌برند (۳۳). از طرفی باکتری‌های محرک رشد مثل ریزوبیوم از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و تولید هورمون‌های محرک رشد که نتیجه آن بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه است، می‌توانند رشد گیاه را افزایش دهند. استفاده از کودهای میکروبی می‌تواند استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژنی را کاهش داده و رشد گیاه را با کاهش قیمت تولید و خطرات محیطی افزایش دهد (۵).

در این مطالعه سطح برگ، ارتفاع، عمق ریشه، وزن تر و خشک گیاه در اثر تلقیح با ریزوبیوم نسبت به گیاهان تلقیح نیافته افزایش معنی دار یافتند. ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان PGPR از طریق افزایش ریشه‌های فرعی، جوانه‌زنی، سطح برگ، افزایش وزن، تجمع کربوهیدرات‌ها، جذب مواد مغذی، تولید هورمون‌های گیاهی، تثبیت نیتروژن، تنظیم تولید اتیلن ریشه، محلول کردن فسفات، تولید سیدروفور و کاهش سمیت فلزات سنگین سبب رشد گیاهان می‌شوند (۳۴). تلقیح گیاه *Chickpea* با PGPR سبب افزایش طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه گیاه شد (۳۵).

در این تحقیق کاربرد آهن (نانو و کلات آهن) سبب افزایش معنی دار رشد یونجه شد. بیشترین میزان متعلق به گیاهان تحت تیمار ۲۵ میکرومولار نانو آهن بود. حتی کاربرد ۵ میکرومولار نانو آهن تاثیر بهتری از کلات آهن داشت. در گیاهانی که هیچ آهنی دریافت نکردند کاهش معنی دار پارامترهای رشد مشاهده شد، نتایج مشابه در کاهو گزارش شده است (۶). آهن یک عنصر ضروری رشد گیاهان است زیرا برای عملکرد مناسب اغلب فرآیندهای متابولیک و آنزیماتیک مربوط به انتقال الکترون

تنفسی و فتوسنتزی، تثبیت نیتروژن، سنتز پروتئین، هورمون و DNA ضروری است (۶). در کمبود آهن کلروفیل به مقدار کافی تولید نمی‌شود. کاهش کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز، کاهش رشد و عدم تشکیل برگ‌های جدید می‌شود. ترکیبات نانو آهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا سریع‌تر توسط گیاهان جذب می‌شوند و کمبودهای گیاه را جبران می‌کنند. بنابراین استفاده از نانو ذرات اکسید آهن در گیاهان کارآمدتر از کودهای معمولی است و کاربرد این مواد سبب افزایش رشد گیاه می‌شود (۳۶). افزایش پارامترهای رشد گیاه *Cowpea* در تیمار با نانو کود آهن بسیار بیشتر از تیمار Fe-EDDHA بود (۳۷). نانو ذرات اکسید آهن  $Fe_3O_4$  در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش معنی‌دار ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن و مقدار کلروفیل گیاه یونجه در محیط هیدروپونیک نسبت به کنترل شد (۳۸). هیچ یک از غلظت‌های نانو ذرات اکسید آهن (۵ تا ۴۰ میکرومولار) اثر منفی بر رشد گیاه پریش نداشت، اگرچه بیش‌ترین مقدار پارامترهای رشد در سطح ۳۰ میکرومولار و کمترین در شاهد فاقد نانو ذرات اکسید آهن مشاهده شد (۳۹).

در این تحقیق تیمار آهن همراه تلقیح باکتریایی اثرات معنی‌داری بر رشد گیاه یونجه نشان داد. کم‌ترین شاخص‌های رشد در شاهد و بیشترین در گیاهان تلقیح‌شده و غلظت ۰۱ میکرومولار نانو آهن به دست آمد. تلقیح خیار با آزوسپیریلیوم همراه تیمار آهن سبب افزایش ۲۷ درصدی زیست توده شد، درحالی‌که تلقیح بدون آهن تنها ۹۴ درصد افزایش به دست آمد (۰۴). در مطالعه‌ای پاسخ سه ژنوتیپ *alutacnurt ogacideM* تلقیح یافته با دو سویه سینوریزوبیوم به کمبود آهن بررسی شد. نتایج اثرات مثبت تلقیح ریزوبیومی را بر تولید بیوماس گیاهان تحت شرایط کمبود آهن نشان داد. در هر دو سویه باکتری افزایش مقدار سیدروفور و اکسین مشاهده شد. سیدروفور می‌تواند مقدار آهن در دسترس را افزایش دهد و اکسین با افزایش رشد طولی ریشه در تغذیه معدنی گیاه می‌تواند موثر باشد. کمبود آهن سبب کاهش معنی‌دار بیوماس گیاه و مقدار کلروفیل شد. بیش‌ترین پراکسیداسیون لیپید و نشت الکترولیت‌ها (مشخصه تنش اکسیداتیو) در شرایط کمبود آهن مشاهده شد. تلقیح سینوریزوبیومی اثرات منفی کمبود آهن بر رشد گیاه و آثار تنش اکسیداتیو را از بین برد (۱۴). آهن ماده مغذی مهمی در تثبیت نیتروژن گرهک لگوم‌ها است. تقاضا برای این ریزومغذی هنگام برقراری همزیستی افزایش پیدا می‌یابد، زیرا جزء سازنده پروتئین‌های کلیدی از قبیل نیتروژناز است. در ساختمان این آنزیم آهن، مولیبدن و گوگرد شرکت دارد، لذا فراهم بودن این عناصر در خاک برای فعالیت این باکتری ضروری می‌باشد. از طرفی نیتروژن یکی از عناصر پرمصرف ضروری گیاه است که برای سنتز آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، کلروفیل، AND و ANR مورد نیاز است و RGPها طی تثبیت نیتروژن ملکولی آن را برای گیاه تامین می‌کنند (۲۴).

در این مطالعه تلقیح یونجه با ریزوبیوم میلیوتی باعث افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی شد. نتایج مشابه در تلقیح *Cicer arietinum* با ریزوبیوم لگومینوزاروم، مشاهده شد. افزایش این رنگیزه‌ها به افزایش تثبیت نیتروژن توسط این باکتری‌ها بر می‌شد. ترکیبات نیتروژنه ایجاد شده از تثبیت نیتروژن در گرهک‌های ریشه به شکل آلانتوئین و اسیدهای آلانتوئیک به ریشه ترشح و سپس به برگ منتقل می‌شوند و در آنجا برای بیوسنتز کلروفیل و پروتئین‌های ضروری برای فتوسنتز استفاده می‌شوند (۴۳). تیمار دانه ذرت با ریزوباکتر محرک رشد با اسیدی کردن خاک باعث افزایش جذب منیزیوم و فسفر می‌شود (۴۴) یعنی جذب منیزیوم که در ساختمان کلروفیل وجود دارد در اثر تلقیح افزایش می‌یابد (۳۴). ریزوبیوم، نیتروژن اتمسفری ( $N_2$ ) را به فرم قابل استفاده گیاه ( $NH_4$ ) تبدیل و در دسترس گیاه قرار می‌دهد. با توجه به نقش نیتروژن و منیزیوم در بیوسنتز کلروفیل، مقدار کلروفیل برگ گیاهان تلقیح شده افزایش می‌یابد و این هم سازوکاری جهت افزایش محصولات فتوسنتزی و در نتیجه رشد بهتر گیاه تلقیح‌شده، می‌شود (۴۵).

در بررسی حاضر با افزایش سطح آهن میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به گیاهان شاهد (صفر آهن) افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین رنگیزه‌ها در گیاهان تحت غلظت ۲۵ میکرومولار نانو آهن اندازه‌گیری شد. نتایج مشابه در سویا (۱۳)، ریحان (۴۶) و

خيار (۴۰) مشاهده شد. نقش عمده آهن، سنتز پروتئین‌های همراه کلروفیل است. کمبود آهن ساختار کلروپلاست و میزان فتوسنتز را کاهش می‌دهد، به‌همین علت کلروز رخ می‌دهد. اگر آهن به‌مقدار کافی و قابل جذب، در دسترس گیاه نباشد تولید کلروفیل در برگ کاهش می‌یابد. کلروپلاست حاوی ترکیبات متعدد حاوی آهن است، پروتئین‌هایی شامل ترکیبات همی مانند سیتوکروم‌ها، P450، پروتئین‌های حاوی آهن (2Fe-2S)، این ترکیبات در چرخه انتقال الکترون دستگاه فتوسنتزی و واکنش‌های ردوکس شرکت دارند (۳۳).

در این مطالعه بیش‌ترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تلقیح‌شده تحت غلظت ۱۰ میکرومولار نانوآهن و کمترین در شاهد مشاهده شد. با افزودن آهن (هم گیاهان تلقیح شده و هم تلقیح نشده) مقدار رنگیزه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد و این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیشتر است. نتایج مشابه در خیار مشاهده شد (۴۰). افزایش آهن در گیاهان تلقیح شده و در نتیجه افزایش کلروفیل، می‌تواند ناشی از سیدروفورهای تولیدی توسط RPGR باشد که به کسب آهن گیاهان کمک می‌کند (۴۰). سیدروفورها مولکول‌های پپتیدی کوچک با وزن مولکولی کم هستند که تمایل بالایی به  $Fe^{3+}$  دارند (۴۴). در این مطالعه میزان پرولین در گیاهان تلقیح‌یافته تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاهان تلقیح‌نشده نداشتند. از آن‌جا که در بسیاری از گیاهان، پرولین در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انباشته می‌شود (۴۷). بنابراین تلقیح ریزوبیومی برای یونجه یک تنش محسوب نمی‌شود و گیاه نیازی به افزایش مقدار پرولین ندارد.

در گیاهان تحت غلظت صفر میکرومولار نانو آهن افزایش معنی‌دار میزان پرولین نسبت به گیاهان تحت غلظت‌های مختلف آهن (کلات یا نانو) مشاهده شد. با کاربرد آهن مقدار پرولین کاهش معنی‌داری نشان داد. بین سطوح مختلف آهن در خصوص مقدار پرولین تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. از آنجا که در اکثر گیاهان میزان پرولین در تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد (۴۷) بنابراین کمبود آهن به‌عنوان تنش غیر زیستی عمل کرده و باعث شده محتوای پرولین در گیاهانی که آهن دریافت نکرده‌اند، افزایش پیدا کند ولی هیچ یک از غلظت‌های آهن به‌کار رفته در این تحقیق برای گیاه یونجه تنش نبوده است. پرولین در تنظیم اسمزی و حفاظت غشای سلولی از طریق جذب رادیکال‌های آزاد نقش دارد و سبب مقاومت به تنش می‌شود. افزایش پرولین نوعی راهبرد تنظیم اسمزی نیز است. پرولین از دو ماده گلوتامات (پیش‌ماده بیوسنتز کلروفیل) و اورنیتین تولید می‌شود بنابراین می‌تواند منجر به کاهش رشد گیاه شود (۴۷). بیشترین میزان پرولین در گیاهان شاهد اندازه‌گیری شد. تلقیح باکتریایی باعث کاهش معنی‌دار پرولین شده است. در سایر تیمارها (آهن) اختلاف معنی‌داری بین گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده مشاهده نمی‌شود. تلقیح باکتریایی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی میزان پرولین را نسبت به گیاهان تلقیح نشده کاهش می‌دهد که این نشان‌دهنده بهبود شرایط تنشی توسط تلقیح باکتریایی است (۴۸).

تلقیح ریزوبیومی یونجه میزان پروتئین را افزایش داد. باکتری‌های محرک رشد گیاه با تثبیت بیولوژیکی نیتروژن سبب رشد گیاه می‌شوند. نیتروژن عنصر ضروری در ساخت اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها است. آمونیوم حاصل از همزیستی ریزوبیوم لگوم به‌شکل آمینواسید در تشکیل پروتئین استفاده می‌شود (۴۹).

در این بررسی کم‌ترین میزان پروتئین در گیاهان شاهد (صفر آهن) مشاهده شد، با افزایش غلظت آهن میزان پروتئین افزایش معنی‌داری یافت. کاربرد ریزمغذی‌ها به‌ویژه آهن باعث افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین دانه‌های گندم شده است (۵۰). با توجه به نقش ساختاری عناصر ریزمغذی آهن، منگنز و روی در برخی آنزیم‌ها و همچنین نقش موثر آن‌ها در سنتز پروتئین‌ها، با مصرف این عناصر علاوه بر افزایش پروتئین و عملکرد، افزایش مقاومت گیاهان تحت تنش‌های محیطی مورد انتظار است (۵۰). عنصر آهن در متابولیسم نیتروژن دخالت دارد. نیتروژن یکی از عناصر ضروری در ساخت پروتئین است. آهن به‌طور غیرمستقیم سبب افزایش جذب نیتروژن می‌شود (۴).

در این مطالعه کمترین و بیشترین میزان پروتئین به ترتیب در شاهد و گیاهان تلقیح شده تحت غلظت ۱۰ میکرومولار نانواهن مشاهده شد. با افزودن آهن، افزایش معنی دار پروتئین مشاهده شد. این افزایش در گیاهان تلقیح شده بیشتر بود. یکی از سازوکارهای افزایش رشد گیاه توسط RPGRها، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن است. نیتروژن تثبیت شده برای سنتز اسیدهای آمینه استفاده می شود (۳۴). نتایج مشابه در لوبیا دیده شده است. در کمبود آهن گرهمها نقش مهمی در احیا آهن فریک دارند و جذب آهن را افزایش می دهند. مقدار بالای آهن در گرهم سبب فعالیت نیتروژناز می شود، آمونیوم تولید شده برای ساخت اسکلت کربنی و سنتز اسیدهای آمینه استفاده می شود (۴۲).

تلقیح ریزوبیوم اثر معنی داری بر توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و فعالیت آنتی اکسیدانتها (SOD, GPOX و CAT) نداشت زیرا ریزوبیوم همزیست طبیعی گیاه است بنابراین گیاه تحت تنش نیست تا آنتی اکسیدانت تولید کند. نتایج مشابه در کاهو گزارش شده است (۵۱). از آنجا که تولید متابولیت های ثانویه مثل آنتی اکسیدانتها، توکوفرول و محافظت کننده های اسمزی مثل پرولین به دنبال تنش رخ می دهد (۵۱ و ۵۲). بنابراین عدم افزایش آنتی اکسیدانتها دلیل دیگری بر این مسئله است که تلقیح ریزوبیومی برای یونجه تنش نیست.

گیاهانی که نانواهن دریافت نکردند بیشترین میزان ۱٪ و فعالیت SOD, GPOX و CAT را داشتند. در حضور آهن میزان ۱٪ و فعالیت آنتی اکسیدانتها نسبت به شاهد کاهش معنی دار پیدا کرد. در گیاهان تحت غلظت های مختلف آهن تغییر معنی داری مشاهده نشد. تحت شرایط نامساعد محیطی و تنش های مختلف، میزان تولید گونه های فعال و واکنش گر اکسیژن ROS افزایش می یابد. ROSها سبب تخریب نوکلئیک اسیدها، اکسیداسیون پروتئینها و پراکسیداسیون لیپیدهای سلول می شوند (۵۲). گیاهان در مقابل تنش های محیطی سازوکارهای متعدد دفاعی دارند. تولید انواع مختلف متابولیت های ثانویه ابزاری جهت مقابله با تنش، تحمل تنش و سازش به شرایط تنشی محیط و بنابراین بقا گیاه در برابر تنش است. سیستم دفاعی گیاهان در برابر ROSها، تولید انواع آنتی اکسیدانتها است (۵۲). آنتی اکسیدانتها متابولیت های ثانویه هستند که در شرایط نامساعد مانند محدودیت عناصر مغذی تولید می شوند. غلظت فلزات نقش مهمی در تعادل آنزیم های آنتی اکسیدانتی دارد. غلظت بالا و پایین فلزات باعث تجمع رادیکال های آزاد و در نتیجه آسیب غشایی می شود (۵۳). ترکیبات نانواهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا به سرعت توسط گیاه جذب می شوند و کمبود مواد غذایی گیاهان را برطرف می کنند. بنابراین با کاربرد این مواد شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد می شود و از ایجاد هرگونه تنش در گیاه جلوگیری می شود (۳۶ و ۳۷). نتایج مشابه در مطالعه *Ocimum Basilicum* تحت تاثیر کلات آهن و نانو کود آهن مشاهده شده است (۴۶).

بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد ۱٪ و فعالیت آنتی اکسیدانتها در گیاهان شاهد (عدم تلقیح و صفر آهن) مشاهده شد. بین گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده، همچنین بین تیمارهای مختلف آهن از این نظر اختلاف معنی داری مشاهده نشد، ولی در حضور آهن کاهش معنی دار فاکتورهای فوق رخ داد. کاربرد سویه های PGPR می تواند اثرات ناشی از تنش مانند مرگ سلولی برنامه ریزی شده و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی را تنظیم کند (۵۴). در تنش های غیرزیستی مانند تنش فلزات، تلقیح ریزوباکتر، آنزیم های آنتی اکسیدانتی مانند SOD و CAT را کاهش می دهد (۵۵). بنابراین تلقیح ریزوباکتر می تواند ابزار مفیدی برای کم کردن تنش در گیاهان باشد (۵۱).

تلقیح باکتریایی باعث افزایش میزان عناصر پتاسیم، فسفر، آهن و روی شد. تلقیح باکتریایی دانه از طریق محلول کردن فسفات، پتاسیم، تثبیت نیتروژن، کلات کردن آهن و مس، میزان عناصر معدنی در دسترس گیاه را افزایش می دهد (۴۹). فراوانی پتاسیم در خاک زیاد است ولی قسمت کوچکی از آن می تواند در دسترس گیاه قرار بگیرد زیرا به بارهای منفی خاک باند می شود. برخی باکترهای خاک با ترشح اسیدهای ارگانیک، پتاسیم خاک را محلول و در دسترس گیاه قرار می دهند (۵۶). فسفر دومین ماده مغذی مهم گیاهی است. خاکها معمولاً مقادیر بالای فسفر دارند اما بیشتر فسفر خاک به شکل فسفات آهن

و آلومینیوم در خاک اسیدی و فسفات کلسیم در خاک قلیایی رسوب می‌کند. ریزوباکترها قادر به تشکیل کمپلکس‌های محلول فسفر هستند (۵). سوبه‌های ریزوبیوم با آزاد سازی آنزیم‌هایی مثل فسفاتاز و یا ترشح اسیدهای ارگانیک مانند سیتریک اسید، گلوتامیک اسید، کربونیک اسید و گلوکونیک اسید، توانایی متحرک سازی فسفرهای باند شده (غیرمحلول) را دارند (۴۹). اثرات سودمند تلقیح باکتریایی اساسا ناشی از تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک ریشه مثل افزایش تعداد تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی گیاهان تلقیح شده می‌باشد که سبب کارایی جذب آب و مواد معدنی توسط ریشه می‌شود (۳۵).

تیمار آهن باعث افزایش معنی‌دار میزان عناصر پتاسیم، فسفر، آهن و روی شد. حتی افزایش مقدار عناصر فوق در غلظت ۵ میکرومولار نانو آهن بیش از کلات آهن بود. نتایج مشابه در سوپا (۵۷) و گندم (۵۸) گزارش شده است. مقادیر بالای آهن در ریشه ظرفیت جذب آنیون‌ها از قبیل فسفر را افزایش می‌دهد (۵۸). در مطالعه حاضر کمترین میزان آهن، روی، پتاسیم و فسفر در گیاهانی که هیچ آهنی دریافت نکردند مشاهده شد. کمبود آهن باعث برهم خوردن تعادل غذایی و کمبود عناصری از جمله پتاسیم، منگنز، روی و فسفر و در نهایت اختلال در رشد گیاه می‌شود. در کمبود آهن به علت کاهش دسترسی به انرژی، جذب آنیون‌ها (انتقال فعال اولیه یا ثانویه) در سلول‌های ریشه کاهش می‌یابد. همچنین در اثر کمبود آهن جذب کاتیون‌هایی مثل پتاسیم کم می‌شود که می‌تواند به علت نقش آهن در ساختار و فعالیت انتقال‌دهنده‌های کاتیون‌هایی مثل پتاسیم باشد (۵۹). استفاده از نانو آهن در افزایش غلظت عناصر در گیاهان کارآمدتر از کودهای معمولی است. احتمالا خصوصیت ذرات نانو، حلالیت بیشتر، سطح تماس بیشتر ذرات نانو با ریشه گیاهان علت این امر است (۶). استفاده از نانو آهن میزان جذب پتاسیم، منگنز، فسفر، روی، آهن و منیزیوم را در گیاه اسپاتی فیلوم افزایش داد (۳۶).

کم‌ترین مقدار عناصر در شاهد و بیش‌ترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان تلقیح شده تحت غلظت ۱۰ میکرومولار نانو آهن و بیش‌ترین مقدار آهن و روی هم در گیاهان تلقیح‌شده تحت غلظت ۲۵ میکرومولار نانو آهن مشاهده شد. یکی از مهم‌ترین فواید اثر متقابل بین گیاه و RPGRهای محرک رشد، افزایش جذب مواد مغذی است. ریزوباکترها قادر به افزایش تحرک آهن با آزادسازی ترکیبات کلات کننده به صورت سیدروفور هستند (۶۰). سیدروفورها مولکول‌های پپتیدی کوچک با زنجیره‌های کناری هستند که می‌توانند جایگاهی با میل ترکیبی بالا برای یون‌های فریک تهیه کنند. در شرایط کمبود آهن، آنزیم‌هایی برای سنتز سیدروفور و پروتئین رسپتور در غشا بیرونی ریزوباکتر سنتز می‌شود و سیدروفور آزاد می‌شود. سپس کمپلکس سیدروفور-آهن تشکیل می‌شود، این کمپلکس محلول و به درون سلول با گیرنده‌های غشایی ویژه منتقل می‌شوند (۵). در مطالعه گیاه خیار تلقیح با آروسپیریلیوم تحت کمبود آهن، علائم کمبود عناصر معدنی به سرعت برطرف شد. علت می‌تواند به سیدروفورهای آزاد شده توسط آروسپیریلیوم نسبت داده شود (۴۰). در کمبود آهن آروسپیریلیوم ترکیبات فنولی ترشح می‌کند که به سرعت اختلالات تغذیه‌ای ناشی از کمبود آهن را بهبود می‌دهد. بررسی ریشه و گرهک‌های لوبیای تلقیح‌شده، حضور پروتئین IRT1 را نشان می‌دهد. مقدار این پروتئین در کمبود آهن افزایش می‌یابد. IRT1 ناقل آهن است اما می‌تواند ناقل دیگر کاتیون‌های دو ظرفیتی از قبیل  $Zn^{2+}$  و  $Cd^{2+}$  تحت کمبود آهن باشد. در لگوم‌ها به واسطه ترشح پروتون توسط پمپ پروتون و تراوش کربوکسیلیک اسیدها (مخصوصا سیتریک اسید و مالیک اسید) در منطقه ریزوسفر، این منطقه اسیدی می‌شود بنابراین حلالیت عناصر و جذب آن‌ها افزایش می‌یابد (۴۱).

### نتیجه‌گیری

آهن یکی از عناصر ضروری است که نقش‌های مهمی در متابولیسم گیاه بازی می‌کند. به همین علت، فقدان آهن به عنوان یک تنش غیرزیستی بر کل فرآیندهای رشدی گیاه یونجه اثر منفی گذاشت. کمبود آهن باعث کاهش جذب عناصر غذایی گیاه شد. غلظت ۲۵ میکرومولار و ۱۰ میکرومولار نانو آهن با بیش‌ترین درصد افزایش شاخص‌های رشدی، به ترتیب غلظت مطلوب

برای یونجه تلقیح نشده و گیاهان تلقیح شده به دست آمد. اثرات منفی ناشی از نبود ریزمغذی آهن باعث کاهش پروتئین و کاهش ذخایر آهن و ایجاد حالت تنش برای گیاه شد. چون در تنش‌های مختلف غیر زیستی تولید گونه‌های فعال و واکنش‌گر اکسیژن ROS افزایش می‌یابد و تولید انواع متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌اکسیدانت‌ها و پرولین از سازوکارهای دفاعی گیاهان در برابر تنش‌ها است. گیاه یونجه در پاسخ به تنش کمبود آهن از این سازوکارها استفاده کرد.

تلقیح ریزوبیومی مستقیم و غیرمستقیم بر تمامی فرآیندهای رشدی یونجه اثر مثبت گذاشت. این اثرات به دلیل سازوکارهای متعدد است. به دنبال تلقیح ریزوبیومی، افزایش پارامترهای رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، جذب عناصر، میزان پروتئین که می‌تواند ناشی از تثبیت  $N_2$  و جذب بیشتر نیتروژن از محیط باشد رخ داد. تلقیح ریزوبیومی اثرات منفی ناشی از فقدان آهن (صفر میکرومولار) را کاهش داد. مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش در گیاهان تلقیح شده با شدت کمتر مشاهده شد. همین کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تلقیح‌یافته تحت تنش خود دلیل دیگری بر تاثیر تلقیح بر رشد غیرمستقیم گیاهان در شرایط تنش است، زیرا تولید متابولیت‌های ثانویه خود هزینه‌بر است. بنابراین تلقیح ریزوبیومی یونجه با افزایش سطح جذب ریشه و جذب عناصر، افزایش سطح برگ و رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه فتوسنتز بیشتر، افزایش جذب نیتروژن و در نتیجه افزایش تولید پروتئین سبب افزایش مستقیم رشد گیاه در شرایط تنش و عدم تنش می‌شود. بیشترین مقدار تمامی شاخص‌های رشد متعلق به گیاهان تلقیح‌شده و تیمار ۱۰ میکرومولار نانو آهن می‌باشد. لازم به ذکر است استفاده از هر ماده‌ای که در خاک پایدار و بی‌حرکت است مانند نانو ذرات، بایستی با احتیاط انجام شود. نانو ذرات فوق، عناصر هستند، بنابراین در محیط زیست تجزیه نمی‌شوند، ممکن است غلظت یک نانو ذره در حال حاضر سمی نباشد ولی بعد از ده سال کاربرد دائمی آن در خاک سمی شود. به نظر می‌رسد بسیاری از نانو ذرات پایدار و نسبتاً بی‌تحرک در خاک بسته به نوع نانوذره و خصوصیات خاک، در بیوتای خاک و بافت‌های گیاه ذخیره می‌شوند بنابراین لازم است دائم از طریق آزمایش‌های مختلف، اثرات افزودن تکراری نانو ذرات بر روی ویژگی‌های خاک و موجودات زنده آن بررسی شد تا غلظت آن‌ها به آستانه سمی نرسد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک جهت حمایت مالی و اجرایی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

### منابع

1. Delic D, Stajkovic-Srbinovic O, Radovic J, Kuzmanovic D. et al., Difference in symbiotic  $N_2$  fixation alfalfa, *Medicago sativa* L. cultivars and *Sinorhizobium* spp. strains in field conditions. Romanian Biotechnological Letters. 2013; 18 (6): 8743-8750.
2. Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. Microbiological Research. 2014; 169(1): 2-17.
3. Pesakovic M, Karaklajic-Stajic Z, Milenkovic S, Mitrovic O. Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) and soil micro-organisms. Scientia Horticulturae. 2013; 150: 238-243.
4. Thomine S, Vert G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. Current Opinion Plant Biology, 2013; 16(3): 322-327.
5. Niranjana SR, Hariprasad P. Understanding the mechanism involved in PGPR-mediated growth promotion and suppression of biotic and abiotic stress in plants. Springer Science, Business Media New York. 2014; 59-109.
6. Roosta HR, Jalali M, Vakili Shahrabaki MA. Effect of nano-chelate, Fe-Eddha and  $FeSO_4$  on vegetative growth, physiological parameters and some nutrient elements concentration of



- four varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L) in NFT system. *Journal of Plant Nutrition*; 2015; 38(14): 2176-2184.
7. Tian H, Kah M, Kariman Kh. Are Nanoparticles a Threat to Mycorrhizal and Rhizobial Symbioses? A Critical Review. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10:1-15.
  8. McKee MS, Filser J. Impacts of metal-based engineered nanomaterials on soil communities. *Environmental Science: Nano*. 2016; 3(3): 506–533.
  9. Hatami M, Kariman K, Ghorbanpour M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *The Science of Total Environment*. 2016; 571: 275–291.
  10. Kah M, Kookana RS, Gogos A, Bucheli TD. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*. 2018; 13(8): 677–684.
  11. Asadishad B, Chahal S, Akbari A, Cianciarelli V. et al. Amendment of agricultural soil with metal nanoparticles: effects on soil enzyme activity and microbial community composition. *Environmental Science and Technology*. 2018; 52(4): 1908–1918.
  12. Karunakaran G, Suriyaprabha R, Manivasakan P, Yuvakkumar R. et al. Effect of nanosilica and silicon sources on plant growth promoting rhizobacteria, soil nutrients and maize seed germination. *Iet Nanobiotechnology*. 2013; 7(3): 70–77.
  13. Burke DJ, Pietrasiak N, Situ SF, Abenojar EC, et al. Iron oxide and titanium dioxide nanoparticle effects on plant performance and root associated microbes. *International Journal of Molecular Science*. 2015; 16(10): 23630–23650.
  14. Sarabia-Castillo CR, Fernández-Luqueño F. TiO<sub>2</sub>, ZnO, and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles Effect on Rhizobium Leguminosarum-*Pisum Sativum* L. symbiosis. *Ciudad Obregón: 3rd Biotechnology Summit 2016*, 2016; 144–149.
  15. Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M, et al., Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 2001; 33(2001): 457-463.
  16. Caetano-Anolles G, Wall LG, De Micheli AT, Macchi EM, et al. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*. 1988; 86(4): 1228-1235.
  17. Bai Y, Zhou X, Smith DL. Crop ecology, management and quality: enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science*. 2003; 43: 1774-1781.
  18. Askary M, Talebi SM, Amini F, dousti balout bangan A. Effects of Iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress. *Biologija* . 2017; 63(1): 65-75.
  19. Prasad TNV, Sreepasad TS, Sajanlal PR, Pradeep T. Effect of nanoscales zinc oxide on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*. 2012; 35(6): 905-927.
  20. Dokhe SA, Mahajan P, Kamble R, Khanna A. Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. *Nanotechnology Development*. 2013; 3(1): 1-5.
  21. Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, et al. *Bergeys manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins Baltimore USA. 1994.
  22. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 1949; 24(1): 1-15.
  23. Lichtenthaler HK, Wellburn AR. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 1983; 11(5): 591-592.
  24. Bates LS, Waldren RP. Teare Rapid determination of free prolin for Water stress studies. *Plant and soil*. 1973; 39: 205-207.

25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254.
26. Abe N, Murata T, Hirota A. Novel 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl- radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1998; 62(4): 661-662.
27. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 1997; 59(2): 309-314.
28. Cakmak I, Marschner H. Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*. 1992; 98(4): 1222-1227.
29. Polle A, Otter T, Seifert F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*. 1994; 106(1): 53-56.
30. Wang BS, Zhao KF. Comparison of extractive methods of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> in wheat leave. *Plant Physiology Communication*. 1995; 31(1): 50-52.
31. Kohler J, Caravaca F, Roldan A. Interactions between a plant growth promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilizing fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*. 2007; 35 (3): 480-487.
32. Celik MC, Tureli M, Celik Y, Yanar U, et al., Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the North Eastern Mediterranean. *Food Chemistry*. 2004; 88: 271-273.
33. Briat JF, Dubos C, Gaymard F. Iron nutrition, biomass production and plant product quality. *Trends in Plant Science*. 2015; 20(1): 33-40.
34. Prasad R, Kumar M, Varma A. Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health. *Soil Biology*. 2015; 42: 247-260.
- 35- Khalid S, Asghar HN, Akhtar MJ, Aslam A, et al., Biofortification of iron in chickpea by plant growth promoting rhizobacteria. *Pakistan Journal Botany*. 2015; 47(3): 1191-1194.
36. Mohamadipoor R, Sedaghatoor S, Mahboub-Khomami A. Effect of application of iron fertilizer in two methods foliar and soil application on growth characteristics of *Spathyphyllum illusion*. *European Journal of Experimental Biology*. 2013; 3(1): 232-240.
37. Jokar L, Ronaghi A, Karimian N, Ghasemi-Fasaei R. Effect of different Fe levels from Fe-nano-chelate and Fe-EDDHA Sources on growth and some nutrients concentration in cowpea in a calcareous soil. *Journal Science & Technology. Greenhouse Culture*. 2014; 6 (22): 19.
38. Kokina I, Plaksenkova I, Jermajonoka M, Petrova A. Impact of iron oxide nanoparticles on yellow medick (*Medicago falcata* L.) plants. *Journal of Plant Interactions*. 2020; 15(1): 1-7.
39. Askary m, Amirjani m, Saberi t. Comparison of the effects of nano-iron fertilizer with iron-chelate on growth parameters and some biochemical properties of *Catharanthus roseus*. *Journal of plant nutrition*. 2017; 40(7): 974-982.
40. Pii Y, Penn A, Terzano R, Crecchio C, et al. Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015; 87: 45-52.
41. Kallala N, Mšehli W, Jelali K, Kais Z. et al., Inoculation with efficient nitrogen fixing and indolacetic acid producing bacterial microsymbionet enhance tolerance of the model legume *Medicago truncatula* to iron deficiency. *Biomed Research International*. 2018; 2018: 1-14.
42. Slatni T, Vigani G, Salah IB, Kouas S, et al. Metabolic changes of iron uptake in N<sub>2</sub>-fixing common bean nodules during iron deficiency. *Plant Science*. 2011; 181(2): 151-158.

43. Bejandi T, Sharifi R, Sedghi M, Namvar A. Effects of plant density Rhizobium inoculation and microelements on nodulation chlorophyll content and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Annals of Biological Research*. 2012; 3(2): 951-958.
44. Sharma P, Kumawat KC, Kaur S. Plant growth promoting rhizobacteria in nutrient enrichment: current perspectives. *Biofortification of Food Crops*. 2016; 4: 263-289.
45. Bashan Y, Bustillos JJ, Leyva LA, Hernandez JP, et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils*. 2006; 42(4): 279-285.
46. Peyvandi M, Parande H, Mirza M. Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Ocimum Basilicum*. *New Cell Molecular Biotechnology*. 2011; 1(4): 89-99.
47. Verbruggen N, Hermans C. Proline accumulation in plants. *Amino Acids*. 2008; 35: 753-759.
- 48- Rabie GH, Almadani AM. Role of bioinoculants in development of salt- tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African Journal of biotechnology*. 2005; 4(3): 210-222.
49. Naveed M, Mehboob I, Hussain MB, Zahir ZA. perspective of rhizobial inoculation for sustainable crop production. *Plant Microbes Symbiosis*. 2015; 209-239.
50. Rawashdeh HM, Florin S. Foliar application with iron as a vital factor of wheat crop growth, yield quantity and quality: A Review. *International Journal of Agricultural Policy and Research*. 2015; 3(9): 368-376.
51. Kohler J, Antonio Hernandez J, Caravaca F, Roldan A. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR Versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to sever salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2009; 65(2-3): 245-252.
52. Foyer CH, Noctor G. Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 2005; 17: 1866-1875.
53. Yadav SK. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Africa Journal Botany*. 2010; 76(2): 169-179.
54. Jha Y, Subramanian RB. PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Physiology Molecular Biology Plants*. 2014; 20(2): 201-207.
55. Selvakumar G, Panneerselvam P, Ganeshamurthy AN. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiology: stress management*. Springer Berlin. 2012; 205-224.
56. Maheshwari DK, Dheeman S, Agarwal M. Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. Springer International Publishing Switzerland. 2015; 159-189.
57. Kobraee S, NoorMohamadi G, HeidariSharifAbad H, DarvishKajori F, et al. Micronutrients Distribution in soybean plant with Zn, Fe and Mn application. *Annual Review & Research in Biology*. 2013; 3(2): 83-91.
58. Abbas G, Hussain F, Anwar Z, Khattak JZK, Ishaque M, Asmat U. Effect of iron on the wheat crop (*Triticum aestivum* L.) by uptake of nitrogen, phosphorus and potassium. *Asian Journal Agriculture Science*. 2012; 4(3): 229-235.
59. Mahmoudi K. Differences in responses to iron deficiency between two legumes: lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Plant Physiology*. 2005; 162(11): 1237-1254.
60. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial sidrophores: a mini review. *Journal Basic Microbiology*. 2013; 53(4): 303-317.

## Effect of iron oxid nanoparticle on the growth and physiology of inoculated alfalfa (*Medicago sativa L.*) with *Rhizobium meliloti*

Askary M, Ph.D. \*, Talebi SM, Ph.D., Shafieigavari M, M.Sc.

. Department of biology, Faculty of Basic Science, Arak university, Arak, Iran

\* Email corresponding author: m-askary@araku.ac.ir

Received: 14 Feb. 2020

Accepted: 5 Jul. 2020

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study is to evaluate the interaction of bacterial inoculation and iron treatment (nano and Fe-chelate) on physiological traits of alfalfa.

**Material and Methods:** In this study, effects of inoculation with standard *Rhizobium meliloti*, effects of different levels of iron (Fe-chelate, 0, 5, 10, 20 and 25  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles) and the interaction of bacterial inoculation and iron treatment were investigated on alfalfa in a factorial experiment in completely randomized design with three replications for 45 days. The measured traits were growth indexes, photosynthetic pigments, protein, proline, antioxidants activity, DPPH(diphenyl-picryl-hydrazyl)-radical scavenging activity percent and elements content.

**Results:** *Rhizobium* inoculation alone showed beneficial effects on the alfalfa growth and was caused increasing in growth parameters, pigments, protein content, potassium and phosphorus uptake. However inoculation did not effect on the proline and antioxidant content. Iron treatment had a positive effect on the growth parameters, pigments, protein content and element uptake. Highest values of growth parameters was observed 25 $\mu\text{M}$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles. The highest values of proline and antioxidants activity were measured in control (0 $\mu\text{M}$  nanoparticles). Since this concentration is considered a stress for alfalfa. Negative effects of 0 $\mu\text{M}$  nanoparticles decreased in inoculated alfalfa plants with *R. meliloti*. Indeed *rhizobium* causes increasing in inoculated plant resistant by reducing stressful conditions.

**Conclusion:** *Rhizobium*-alfalfa symbiosis plus iron nanofertilizer can cause increasing in plant resistance to stress, in addition to increase growth of plant. The highest amount of growth parameters, pigments and protein content was measured in inoculated plant with *Rhizobium meliloti* and 10 $\mu\text{M}$  nanoparticles.

**Key word:** Antioxidant, Bacterial inoculation, Growth parameters, Nano fertilizer, Protein