نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۲ شماره ۲ صفحه‌های ۲۵ تا ۴۱/ سال ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز ، غلظت آهن و نیترات در اسفناج تلقیح شده با دو گونه باکتری سودوموناس در سطوح مختلف نیتروژن

افسانه کلانتری[1]* ، ناصر علی‌اصغرزاد[2]، نصرت‌اله نجفی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

۱-فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: afsanekalantary@yahoo.com

چکیده

اسفناج با نام علمی ((*Spinacia oleracea*) به‌عنوان یک سبزی غنی از آهن شناخته شده است ولی به‌دلیل کاشت این گیاه در حاشیه شهرها و آبیاری با آب آلوده، نه‌تنها غنی از آهن نبوده بلکه تجمع نیترات نیز در آن دیده می‌شود. به نظر می‌رسد، باکتری‌های *سودوموناس* بتوانند با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در گیاه و همچنین تولید سیدروفور ضمن کاهش تجمع نیترات، سبب افزایش جذب آهن شوند. برای دستیابی به این هدف، در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار، گیاه اسفناج با باکتری‌های *سودوموناس*(*Pseudomonas fluorescens* ChaO، *Pseudomonas putida* Tabriz و شاهد بدون باکتری) تلقیح شده و با سه سطح نیتروژن صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک از منبع اوره، تیمار گردید. نتایج تجزیه آماری نشان داد با افزایش سطوح نیتروژن از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، غلظت نیترات و آهن بخش هوایی به‌طور معناداری افزایش یافت در حالی که فعالیت آنزیم در بخش هوایی تغییر معناداری نداشت. با مایه‌زنی باکتری‌ها فعالیت آنزیم در بخش هوایی به‌طور معناداری افزایش یافت و بیشترین فعالیت آنزیم در گیاهان تلقیح شده با *P.putida* با حدود ۱۸۰/۵۱ درصد بیشتر از گیاهان بدون باکتری مشاهده شد. غلظت نیترات در گیاهان تلقیحی با باکتری *P.putida* ، ۳۲/۹۸ درصد نسبت به تیمارهای شاهد کاهش داشت. همچنین غلظت آهن در تیمارهای دارای باکتری افزایش معناداری در ریشه و بخش هوایی اسفناج داشت به‌طوری که غلظت آهن در تیمارهای دارای *P.putida* و *P.fluorescens* به‌ترتیب معادل ٤٠ و ٢٦/٨٥ درصد در بخش هوایی و ۸/۰۹ و ۹ درصد در ریشه نسبت به شاهد افزایش داشت. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، بیشترین کاهش غلظت نیترات، بالاترین فعالیت آنزیم و غلظت آهن در بخش هوایی در حضور باکتری *P.putida* حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: آهن، آنزیم، اسفناج، باکتری محرک رشد گیاه، تجمع نیترات

Nitrate Reductase Activity, Iron and Nitrate Concentrations in Spinach Inoculated with Two Species of Pseudomonas under Different Nitrogen Levels

Afsaneh Kalantari[1*], Nasser Aliasgharzad[2] and Nosratollah Najafi[3]

1. MSc Graduate, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2.Prof., Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz
3.Prof. Prof. Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz
* Corresponding author: afsanekalantary@yahoo.com

Abstract

Spinach (*Spinacia oleracea* L.) has been known as iron rich vegetable but in many cases, it not only lacks enough iron but accumulates a high amount of nitrate due to irrigation with polluted water around the cities as well as chemical fertilization. It seems that *Pseudomonas* species could diminish nitrate accumulation by inducing nitrate reductase activity (NRA) and could increase iron uptake by producing siderophore. To achiev this purpose, in a factorial experiment based on randomized complete block design with two factors and three replications, spinach plants were inoculated with bacteria (*Pseudomons fluorescens* ChaO, *P.putida* Tabriz and non-bacterial) and treated with three levels of nitrogen (0, 125 and 250 mg N Kg^{-1} as urea). Statistical analysis showed that with increasing levels of nitrogen in soil from 0 to 250 mg kg^{-1}, nitrate and iron concentrations were significantly increased in shoot while shoot NRA had not significant changes. By applying the bacteria, nitrate reductase activity, significantly increased in shoot and the most increase of NRA (~180.51%) was observed in plants inoculated with *P.putida* compared to the non-inoculated treatment. Nitrate concentration showed about 32.98% decrease in *P.putida* compared to the control. Also iron concentration, increased up to 40 and 26.85% in shoot and 8.09 and 9% in root in *P.putida* and *P.fluorescens* treated plants, respectively compared to the non-bacterial . Based on the result obtained in this study, The highest decrease in nitrate accumulation and the highest NRA and iron concentration in spinach shoots were achieved by *P.putida* inoculation.

Keywords: Enzyme, Iron, Nitrate accumulation, Plant growth promoting bacteria, Spinach

مقدمه

نیتروژن یکی از عناصر غذایی پرمصرف در تغذیه گیاهان است. این عنصر نقش حیاتی در بافت‌های گیاهی ایفا می‌کند و یک جزء کلیدی از مولکول‌های زیستی ضروری مانند اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و نوکلئوتیدهاست (الکساندر و همکاران ۲۰۰۸). این عنصر یک تا پنج درصد وزن خشک بافت‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد (علیزاده و همکاران ۱۹۹۸). عرضه کافی نیتروژن می‌تواند موجب توسعه رشد گیاه و افزایش تولید محصولات شود اما استفاده بیش از حد و نابجا در خاک سبب افزایش جذب نیترات توسط ریشه می‌شود در حالی که احیاء و آسمیلاسیون[1] آن در داخل گیاه به همان نسبت انجام نمی‌شود و چون نیترات توانائی بالایی برای تجمع در گیاه دارد به صورت بالقوه تجمع می‌یابد (لورنز ۱۹۷۸ و الکساندر و همکاران ۲۰۰۸). تجمع نیترات در گیاهان نگرانی عمده بوده و یک مشکل شناخته شده در بسیاری از محصولات باغبانی است (کاردناز-ناوارو و همکاران ۱۹۹۹). اسفناج یکی از سبزیجات مهم خانواده چغندریان است، این گیاه ارزش غذایی زیادی داشته و به‌دلیل دارا بودن ۱۰ نوع از ویتامین‌ها و مواد معدنی، پروتئین‌ها و به ویژه آسکوربیک اسید رتبه دوم را در بین ٤۲ میوه و سبزی به خود اختصاص می‌دهد (هاتم جعفری و تزرو ۲۰۱۳). کشت این گیاه عموماً در اراضی پایین دست شهرها و در محیط‌های سرشار از نیتروژن صورت می‌گیرد و اسفناج به‌دلیل سیستم جذب بسیار کارآمد و سیستم احیاکنندگی ناکارآمد یکی از بالاترین تجمع‌دهندگان نیترات است (ماینارد و همکاران ۱۹۷٦). غلظت نیترات در بخش قابل مصرف گیاه اسفناج میتواند بین ۱۳۰ تا ٤۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر متغییر باشد. (لیروندل ۲۰۰۲). یکی از معیارهای سلامت سبزی‌ها عدم تجمع نیترات در آن‌ها می‌باشد. بالا بودن غلظت نیترات در اندام‌های قابل مصرف سبزی‌ها انواع مسمومیت در حد مرگ، ایجاد بیماری کم‌خونی در کودکان و تولید ماده سرطان‌زای نیتروزآمین را در بزرگسالان به وجود می‌آورد. سازمان بهداشت جهانی غلظت مجاز نیترات در اسفناج را ۳٤٥-۳۸۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر بیان کرده است (ایشیواتا و همکاران ۲۰۰۲). آهن نیز از جمله عناصر کم‌مصرف برای تغذیه و رشد گیاهان، حیوانات و انسان محسوب می‌شود و وجود غلظت‌های مناسبی از این عنصر در بافت‌های گیاهان نه‌تنها برای رشد و عملکرد مطلوب گیاهان بلکه در زنجیره غذایی برای رشد و سلامتی حیوانات و انسان ضروری است (ویچ ۲۰۰۲؛ فاگریا و همکاران ۲۰۰۲). در سال‌های اخیر بروز کمبود عناصر غذایی کم‌مصرف در گیاهان باغی مختلف به‌دلیل کشت متراکم، فرسایش خاک سطحی، آبشویی، کاهش مصرف کودهای آلی نسبت به کودهای شیمیایی، pH زیاد، آهکی بودن خاک‌ها و کیفیت نامناسب آب آبیاری گسترش داشته است (فاگریا و همکاران ۲۰۰۲ و هاولین و همکاران ۲۰۰٤). در این راستا افزایش تولید مواد غذایی و افزایش غلظت عناصر غذایی در مواد غذایی مصرفی انسان‌ها و دام‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (ویچ ۲۰۰۲ و لیندزی و همکاران ۲۰۰٦). در حال حاضر بیوتکنولوژی خاک با هدف استفاده از پتانسیل جانداران مفید خاکزی برای تولید حداکثر محصول همراه با بهبود کیفیت خاک، رعایت بهداشت محصولات غذایی و ایمنی محیط زیست مورد توجه قرار گرفته است (حاجیلو و همکاران ۲۰۱۱). تعداد زیادی از ریزجانداران موجود در خاک قادر به اعمال تأثیرات مفید در رشد گیاه می‌باشند و کیفیت آن را ارتقاء می‌دهند (وسی ۲۰۰۳). باکتری‌های جنس *سودوموناس* از جمله مهم‌ترین ریزجانداران هستند که از طریق سازوکارهای مختلفی مانند تولید سیانید، سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌های گیاهی، سیدروفورها و همچنین تولید مواد سرکوب کننده پاتوژن‌های ریشه، رشد گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهند (شرف زاده ۲۰۱۲). بررسی‌ها نشان داده

[1] Assimilation

است که کاربرد سویه‌های باکتری جنس *سودوموناس* می تواند سبب افزایش طول ریشه و اندام هوایی در کاهو کلزا و گوجه فرنگی شود (گلیک و همکاران ۱۹۹۷). در گندم باکتری *Pseudomonas. sp* تحت شرایط تنش محیطی از طریق کاهش جذب یون‌های سمی، افزایش تولید هورمون اکسین و پروتئین‌های مخصوص موجب تحریک رشد گیاه شد (داوودی فرد ۲۰۱۱). بررسی‌های انجام شده توسط بدزیک و همکاران (۱۹۹۹) نشان می-دهند که برخی گونه‌های باکتری *سودوموناس* علاوه بر تولید سیدروفور، دارای فعالیت نیترات ریداکتازی قابل توجهی هستند. همچنین علی‌اصغرزاد و همکاران (۲۰۱٤) و سومیاتی و همکاران در سال (۲۰۱٦) نشان دادند PGPR ها نقش بسزایی در افزایش NRA گیاهان دارند.

بنابراین با توجه به مصرف تازه خوری و اهمیت بهداشتی میزان نیترات در سبزیجات و نقش آن‌ها در سلامتی انسان و نظر به استفاده از فاضلاب‌های خام شهری در حواشی شهرهای بزرگ و مراکز استان‌ها به منظور آبیاری سبزیجات منجمله اسفناج که از بالاترین تجمع دهندگان نیترات است این تحقیق برای بررسی تأثیرگونه‌های باکتری *سودوموناس* بر فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز غلظت نیترات و آهن ریشه و بخش هوایی اسفناج در شرایط گلخانه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور شامل کود نیتروژن در سه سطح (صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک که معادل صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار از منبع اوره) و گونه باکتری در سه سطح (*P.fluorescens* ChaO، *P.putida* Tabriz و شاهد بدون باکتری) با سه تکرار انجام شد. ابتدا مقادیر لازم کودها به همراه آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شد سپس باکتری‌ها به صورت زادمایه به گلدان‌های مربوطه تلقیح شد. در این آزمایش از دو گونه باکتری *سودوموناس* که از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک دانشگاه تبریز دریافت شد، استفاده گردید. برخی صفات محرک رشدی این باکتری‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- برخی تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در این آزمایش (قادری ۲۰۰۶).

گونه باکتری	انحلال تری کلسیم فسفات (قطر هاله به قطر کلنی)	* تولید پروتون (قطر هاله به قطر کلنی)	تولید سیدروفور (قطر هاله به قطر کلنی)
P. fluorescens ChaO	٤/۰±۲/۳	۲/۰±۱/۲	۰±۲/۳
P. putida Tabriz	۰±٤/٥	۲/۰±۲/۳	۱/۰±۸/۲

* منظور از تولید پروتون همان کاهش pH است که با تغییر رنگ شناساگر و ایجاد هاله رنگی مشخص می‌شود.چون شناساگرهای pH به غلظت پروتون (اسیدیته) واکنش می‌دهند.

جهت آماده سازی زاد مایه باکتریایی از محیط کشت مایع کینگ ب[۲] استفاده شد. (کینگ و همکاران ۱۹۵٤). بدین منظور از هر دو گونه باکتریایی موجود در محیط کشت جامد، باکتری با استفاده از لوپ برداشته شد و به ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح گردید. ارلن‌ها به مدت ۲٤ ساعت داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت جمعیت باکتری در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ nm تعیین شد و آماده مایه‌زنی در ریشه گیاه گردید.

ویژگی‌های خاک شامل بافت خاک به روش هیدرومتر (گی و اور ۲۰۰۲)، pH گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (EC_e) (گوپتا ۲۰۰۰)، کربن آلی به روش والکلی-بلک اصلاح شده (نلسون و سامرز ۱۹۸۲)، پتاسیم قابل‌جذب با عصاره‌گیر استات آمونیم (گوپتا ۲۰۰۰)، فسفر قابل‌جذب با بی‌کربنات سدیم (اولسن و سامرز ۱۹۸۲) و رطوبت ظرفیت مزرعه با دستگاه صفحه‌های فشار (کمپبل و همکاران ۱۹۸٦) تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش.

بافت خاک	pH	FC (%)	EC_e (dS m^{-1})	OC (%)	N (%)	K (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})
شن لومی	۷/۸۱	۱۲	۱/۴	۰/۲۲	۰/۰۲۲	۱۸۲/٦	٤/٤

در نهایت خاک مورد نظراز ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری نمونه برداری شد و پس از عبور از غربال چهار میلی‌متری در گونی-های کنفی پر شد و به مدت دو ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ بار استریل شد. بذر گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) از رقم بومی تبریز انتخاب شد. بذرها به مدت دو ساعت در آب مقطر خیس خورده و به مدت ۱۵ ثانیه در الکل ۹٦٪ قرار گرفتند و سپس به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند. به هر گلدان دو کیلوگرم خاک استریل اضافه شد و بر اساس آزمون خاک (فسفر به مقدار ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از منبع منوکلسیم فسفات) و (پتاسیم به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک از منبع سولفات پتاسیم) به‌طور یکنواخت به همه گلدان‌ها اضافه شد. سطوح نیتروژن با مقادیر صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی-گرم نیتروژن بر کیلوگرم خاک از منبع اوره در سه مرحله به گلدان‌ها افزوده شد. برای هر گلدان حدود هشت میلی-لیتر سوسپانسیون باکتری با جمعیت $۱/۱\times۱۰^{۸}$ با حدود ۱۱ گرم پرلیت ریز و استریل مخلوط شد تا یک پودر مرطوب به‌دست آید و این زادمایه به‌صورت یک لایه نازک در عمق دو سانتی‌متری از سطح خاک پخش شد. سپس بذور اسفناج به تعداد ۱۵ بذر در عمق یک سانتی‌متری خاک قرار گرفتند و برای تیمارهای بدون باکتری همان مقدار پرلیت به همراه محیط کشت بدون باکتری اضافه گردید. در هنگام کاشت بذور از طریق توزین رطوبت تمامی گلدان‌ها در سطح ۰/۹-۰/۸ظرفیت مزرعه‌ای تنظیم شد. گلدان‌ها ۱٦ ساعت دوره روشنایی با نور تکمیلی فلورسنت در اتاق کشت قرار داده شدند.

[2] King B

برداشت گیاهان حدود ۱۲ هفته بعد کاشت انجام گرفت. غلظت آهن بعد از عصاره‌گیری نمونه‌ها به روش ترسوزانی (والینگ و همکاران ۱۹۸۹) با استفاده از دستگاه جذب اتمی تعیین شد. غلظت نیترات در گیاه با روش سولفوسالیسیلیک اسید (کاتالدو و همکاران ۱۹۷۵) اندازه گیری شد. حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های خشک و پودر شده اسفناج توزین و در ارلن ۱۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و ۲۵ میلی‌لیتر آب داغ ۹۰ درجه سلسیوس به آن افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه شیک مخلوط صاف شد و مقدار ۵۰۰µl از عصاره گیاه درون لوله فالکون ریخته و مقدار ۱ ml معرف سولفوسالیسیلیک اسید به آن افزوده و خوب بهم زده شد سپس به مدت نیم ساعت به همان حالت باقی ماند و بعد از این مدت مقدار ۱۰ ml سود ٤ نرمال به این محلول اضافه کرده و به مدت یک ساعت نگه داشته تا رنگ زرد تشکیل شود و بعد از یک ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤١٠nm قرائت شد. فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز با روش پیشنهادی استوارت و همکاران (۱۹۷۲) اندازه گیری شد. در هر مرحله مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه پهنک برگ یا بخش انتهایی ریشه در محلول بافر فسفات (۱۰۰ میلی-مول،pH=۷/۵) حاوی پروپانول ٤٪ و نیترات پتاسیم قرار داده شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول سولفانیلیک اسید محلول در اسید کلریدریک ۲ نرمال و یک میلی‌لیتر محلول نفتیل اتیلن در آمید (۰/۰۲ درصد) افزوده شد و بعد از ۲۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ٥٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه محلول استاندارد از نیتریت سدیم ($NaNO_2$) استفاده شد و فعالیت آنزیم بر اساس میکرو مول نیتریت در گرم وزن تازه بافت در ساعت محاسبه گردید. تحلیل آماری داده‌ها از قبیل آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار MSTATC انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید و نمودارها با نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

نیترات بخش هوایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر اصلی و متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر غلظت و جذب نیترات بخش هوایی اسفناج در سطح احتمال ۱٪ معنادار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطوح نیتروژن در محیط رشد، غلظت و جذب نیترات بخش هوایی اسفناج به‌طور معناداری افزایش یافت (جدول ٤). کودهای نیتروژنی بیشترین مقدار نیترات را در گیاه ایجاد می‌کنند که ممکن است به‌دلیل اثر مستقیم آزادسازی سریع نیتروژن به واسطه کودهای شیمیایی بیش از توانایی مورد نیاز گیاه باشد. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط گولسر (۲۰۰۵) مطابقت دارد، وی گزارش کرد وقتی ورود نیتروژن از نیازهای گیاه تجاوز می‌کند غلظت نیترات در گیاه افزایش می‌یابد. لورنز (۱۹۷۸) بیان کرد مصرف زیاد کود نیتروژن در خاک سبب افزایش جذب نیترات توسط ریشه می‌شود در حالی که آسمیلاسیون (همگون سازی) آن در داخل گیاه به همان نسبت افزایش نمی‌یابد و در نتیجه نیترات در گیاه تجمع می‌یابد. نجفی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که گیاه اسفناج نیترات را به آمونیوم ترجیح می‌دهد و یک پاسخ دهنده بزرگ به کودهای نیتروژنی است. یافته‌های مشابه در رابطه با تأثیر کودهای نیتروژنی بر افزایش غلظت و مقدار نیترات در اسفناج توسط محققان دیگری (ژنگ ین ۲۰۰۳ و احمدی و همکاران ۲۰۱۰) ارائه شده است. در بخشی از نتایج آزمایش که در مقاله دیگری به چاپ رسیده است. وزن خشک در گیاهان دارای باکتری-های *P.putida* Tabriz و *P.fluorescens* ChaO به ترتیب معادل ٦/٨ و ۲۰ درصد در بخش هوایی و ۲۳/۷ و ۲۸/۱ در ریشه نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد (کلانتری و همکاران ۲۰۱۸). بنابراین با توجه به اینکه مقدار از

حاصلضرب غلظت در ماده خشک به‌دست می‌آید، افزایش مقدار نیترات با افزایش سطوح نیتروژن را می‌توان به افزایش ماده خشک نیز نسبت داد.

جدول۳- تجزیه واریانس تأثیرسطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر فعالیت آنزیم، غلظت وجذب نیترات بخش هوایی و ریشه اسفناج.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		غلظت نیترات بخش هوایی	جذب نیترات بخش بخش هوایی	فعالیت آنزیم بخش هوایی	فعالیت آنزیم ریشه
بلوک	۲	۹۰۲۸/۳$^{n.s}$	۰/۵۷$^{n.s}$	۰/۰٤*	۰/۲$^{n.s}$
نیتروژن	۲	۲٦٤۷۸۰/۱**	٥٦٦۹/۹۷**	۰/۰۷*	٦/۲٤**
باکتری	۲	٥۷۳٥۰۲/۱**	٤٥۳/٦٤**	۷٥/۹۸**	۲۰۰/۱۱**
نیتروژن× باکتری	٤	۲۹۱۹۲/۹**	۸٦/۷۱**	۱۱/۱۲**	۱۰/۹٥**
خطای آزمایشی	۱۲	۳٤۹۳.۲۲	۱۰/۹٦	۰/۰٤	۰/۰٦
ضریب تغییرات (درصد)		٦/۰٦	۱۱/۲۲	۳/۲۲	۲/۲٦

$^{n.s}$، * و ** به‌ترتیب غیرمعنادار، معنادار در سطح احتمال ٥ درصد و ۱ درصد

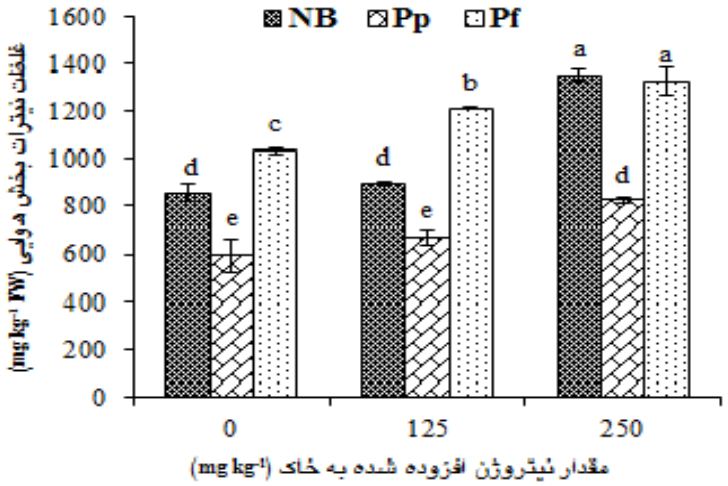
جدول۴- مقایسه میانگین اثرات اصلی سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر فعالیت آنزیم، غلظت و جذب نیترات بخش هوایی و ریشه اسفناج.

عامل	سطوح	غلظت نیترات بخش هوایی (mg kg^{-1} FW)	جذب نیترات بخش هوایی (mg pot^{-1})	فعالیت آنزیم بخش هوایی (µmol N g^{-1} FW h^{-1})	فعالیت آنزیم ریشه (µmol N g^{-1} FW h^{-1})
نیتروژن	صفر	۸۳٤/٦^{c}	۳/٦۹^{c}	٦/٤٦^{a}	۱۰/۳۰^{c}
	۱۲٥	۹۲٦/۷^{b}	۳۰/۹۹^{b}	٦/۲۹^{a}	۱۱/۹۳^{a}
	۲٥۰	۱۱٦۷^{a}	٥۳/۸۳^{a}	٦/۳۱^{a}	۱۰/۷۸^{b}
مایه‌زنی باکتری	بدون مایه‌زنی	۱۰٤۱^{b}	۲۸/۰۳^{b}	۳/۱۳^{c}	۱٥/۲٤^{a}
	سودوموناس پوتیدا تبریز	٦۹۷/٦^{c}	۲۳/۲٦^{c}	۸/۷۸^{a}	۱۱/۸٥^{b}
	سودوموناس فلورسنس چائو	۱۱۹۰^{a}	۳۷/۲۲^{a}	۷/۱٤^{b}	٥/۲۹^{c}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن تفاوت معناداری ندارند.

شکل ۱ نشان می‌دهد در تمامی سطوح نیتروژن باکتری *سودوموناس پوتیدا* به‌طور معناداری غلظت نیترات را نسبت به سایر تیمارها کاهش می‌دهد. همانطور که در بخش مقدمه اشاره شد طی مطالعاتی که بدزیک و همکاران (۱۹۹۹) انجام دادند مشخص شد این باکتری‌ها هم در غشا و هم در فضای پری پلاسمیک دارای آنزیم نیترات ریداکتاز می‌باشند. آنزیم متصل به غشاء در شرایط با پتانسیل ریداکس کم قادر به فعالیت است و آنزیم موجود در فضای پری پلاسمیک در هر دو شرایط با پتانسیل ریداکس بالا و پایین قادر به فعالیت است و چون اکثر فعالیت‌های احیای نیترات تحت شرایط با پتانسیل ریداکس پایین صورت می‌گیرد که در این شرایط بیان نیترات ریداکتاز فضای پری پلاسمیک افزایش یافته و این آنزیم نقش مهمی در

احیای نیترات طی فرآیند نیترات زدایی دارد. همانطور که در جدول ٤ مشاهده می‌شود جذب نیترات در تیمارهای دارای باکتری *سودوموناس پوتیدا* کاهش می‌یابد که احتمالا به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در گیاه توسط این گونه باکتری می‌باشد و با توجه به اینکه جذب از حاصلضرب غلظت در ماده خشک به‌دست می‌آید در نتیجه کاهش معنادار جذب نیترات در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری به‌دلیل کاهش قابل توجه غلظت نیترات می‌باشد. استانداردهای مختلفی برای حداکثر غلظت مجاز نیترات در سبزی‌ها وجود دارد. محدوده مجاز غلظت نیترات در ایران برای سبزی‌های مختلف فعلاً مشخص نشده است (ملکوتی ۲۰۰۰). اتحادیه اروپا در سال ۲۰۰۷ حداکثر غلظت مجاز نیترات در اسفناج را ۲۵۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم وزن تر تعیین نموده است (آنجانا و همکاران ۲۰۰۷). برای مقایسه با استاندارد اتحادیه اروپا در شکل ۳ غلظت نیترات بر اساس وزن تر اسفناج محاسبه گردید. همانطور که در شکل مذکور مشاهده می‌شود غلظت نیترات اسفناج تولید شده در تمامی تیمارها مورد مطالعه در این بررسی از حد مجاز اتحادیه اروپا کمتر است. بیشترین غلظت نیترات بر اساس وزن تر حدود ۱٤۰۰ میلی‌گرم نیترات بر کیلوگرم وزن تر اسفناج می‌باشد که در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم نیتروژن بر کیلوگرم خاک و شاهد بدون باکتری مشاهده می‌شود. با توجه به سطح کودی افزوده شده انتظار بر این بود که غلظت نیترات بیش از حد مجاز به‌دست آید اما چون حجم خاک کم بود لذا احتمالا نتوانسته تکافوی نیاز گیاه را نموده و مقدار مازاد کمتر بوده است. خود خاک نیز دارای نیتروژن کمتری بود. همچنین حجم کم گلدان و تعداد زیاد گیاه سبب شده نیترات گیاه به حد بالای مجاز نرسد. برای تأمین ماده گیاهی جهت آنالیز، نیاز به تعداد کافی گیاه داشتیم که نتوانستیم تعداد گیاه را کاهش دهیم.



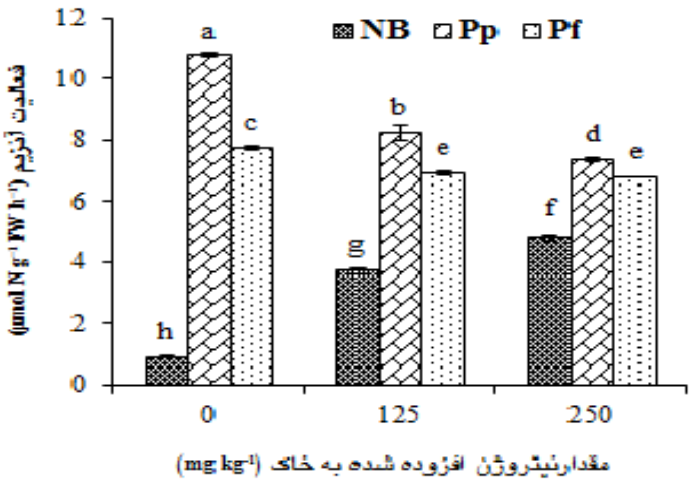
شکل ۱- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری (NP،Pp و Pf به ترتیب شاهد بدون باکتری، *Pseudomonas putida*Tabriz و *P. fluorescens* ChaO) بر غلظت نیترات بخش هوایی.

فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در گیاه

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر اصلی نیتروژن در سطح احتمال ۵٪، اثر اصلی باکتری و اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در بخش هوایی اسفناج معنادار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش سطوح نیتروژن از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، نسبت به شاهد بدون نیتروژن در فعالیت آنزیم بخش هوایی تفاوت معناداری مشاهده نشد (جدول ٤). نیترات ریداکتاز یک آنزیم القایی است که رابطه نزدیکی بین فعالیت این آنزیم و غلظت نیترات در گیاهان وجود دارد (اسکرلتا و همکاران ۱۹۷۹). در مورد رابطه بین فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز و غلظت نیترات گزارشات متعددی وجود دارد. برخی مطالعات نشان می‌دهند وقتی فعالیت آنزیم بالا باشد احیای نیترات بیشتر می‌شود بنابراین، رابطه منفی بین فعالیت آنزیم و غلظت نیترات وجود دارد (هوو و همکاران ۱۹۹۲). برخی مطالعات نشان می‌دهند القای آنزیم نیترات ریداکتاز ناشی از غلظت بالای نیترات در گیاه بوده و با افزایش غلظت نیترات در گیاه فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد و همبستگی مثبتی بین آن‌ها وجود دارد (ایواشیکینا و همکاران ۱۹۹۷). طبق نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، با افزایش سطوح نیتروژن در خاک نسبت به تیمارهای شاهد بدون نیتروژن در فعالیت آنزیم بخش هوایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج جوزف و همکاران (۱۹۷۹) و مت و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. آنان بیان کردند که مقدار بسیار اندکی از نیترات برای القای آنزیم کافی است و زمانی که غلظت نیترات از حد معینی بالاتر باشد نیترات ریداکتاز القا نمی‌شود. چن و همکاران (۲۰۰٤) اثرات عرضه نیترات بر غلظت نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز را در سه سبزی برگی از جمله اسفناج مطالعه و مشاهده کردند با افزایش سطح نیترات تفاوت معناداری در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد یک آستانه‌ای از غلظت نیترات در سیتوزول برای القای فعالیت این آنزیم وجود دارد و تنها زمانی که عرضه نیترات کم باشد اثر مثبتی روی فعالیت آنزیم دارد در حالی که در غلظت‌های بالاتر فعالیت آنزیم به حداکثر رسیده (اشباع آنزیمی) و یا حتی کاهش می‌یابد. البته اثر زمان برداشت نیز در میزان فعالیت آنزیم و تجمع نیترات مؤثر است. آنجانا و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی غلظت نیترات در ژنوتیپ‌های مختلف اسفناج در دو زمان ۳ و ٦ هفتگی بعد از کاشت نشان دادند میزان انباشت نیترات در ٦ هفته بعد از کاشت به‌طور معناداری بیش از ۳ هفتگی می‌باشد و میزان فعالیت آنزیم در کل بخش هوایی اسفناج به اندازه‌ای نیست که بتواند با انباشت نیترات در گیاه مقابله کند. در این تحقیق با توجه به اینکه فعالیت آنزیم حدود ۱۲ هفته بعد از کاشت اندازه‌گیری شد در نتیجه فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافته و نمی‌تواند با انباشت نیترات به خصوص در سطوح بالاتر نیتروژن در گیاه مقابله کند (شکل ۲).

با توجه به شکل ۲ در تیمارهای بدون باکتری با افزایش سطح کود نیتروژن، فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز بخش هوایی به‌طور معناداری افزایش یافت ولی در حضور باکتری‌ها ، با افزایش سطوح نیتروژن فعالیت آنزیم روند کاهشی نشان داد. نیترات ریداکتاز آنزیمی سیتوزولیک است که نیترات را به نیتریت احیا میکند و سپس نیتریت تواید شده، توسط آنزیم نیتریت ریداکتاز به آمونیوم تبدیل می‌شود (دروارت و همکاران ۲۰۰۰). همچنین نیترات ریداکتاز یک آنزیم القایی است و رابطه نزدیکی بین فعالیت این آنزیم و غلظت نیترات در گیاهان وجود دارد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت، به موازات افزایش نیتروژن در ریشه فعالیت آنزیم در آنجا زیاد شده و نیترات متابولیزه گردیده و کمتر به بخش هوایی می‌رسد. در نتیجه چون سوبسترا کم می‌شود فعالیت آنزیم نیز کاهش یافته است. همچنین در تمامی سطوح نیتروژن فعالیت آنزیم در گیاهان دارای باکتری بیشتر از گیاهان بدون باکتری می‌باشد و گونه

P.putida Tabriz گونه کاراتری می‌باشد. همانطور که در نتایج مربوط به نیترات در این مقاله به‌دست آمد، غلظت نیترات در تیمارهای دارای گونه *P.putida* Tabriz به طور معنی داری کمتر از تیمارهای دیگر بود که صحت نقش این باکتری‌ها در افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز و کاهش غلظت نیترات در گیاه را به درستی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج سومیاتی و همکاران (۲۰۱٦) که تأثیر PGPR ها را روی رشد و عملکرد موسیر مورد بررسی قرار دادند مطابقت دارد. آنها بیان کردند فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز گیاه توسط PGPR ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد و به عبارت دیگر منجربه افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در گیاه می‌شوند. همچنین بیان کردند فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در این ریزجانداران با فعالیت نیترات ریداکتاز در گیاه که نقش مهمی در فرآیند فتوسنتز دارد در ارتباط تنگاتنگ می‌باشند. همچنین علی‌اصغرزاد و همکاران (۲۰۱٤) تأثیر *آزوسپیریلوم* را روی فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز و جذب نیتروژن در گیاه گندم مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند در گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری، فعالیت آنزیم ریداکتاز بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد بدون باکتری افزایش معناداری داشت.

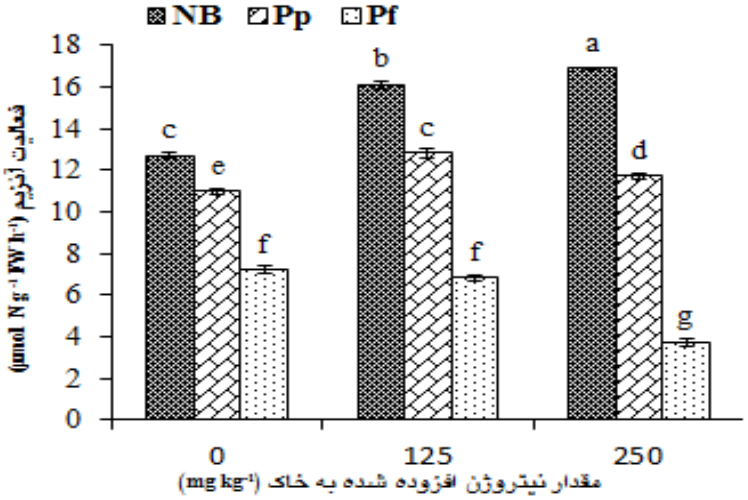


شکل ۲- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری(NP،Pp و Pf به ترتیب شاهد بدون باکتری، *Pseudomonas putida*Tabriz و *P. fluorescens* ChaO) بر فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز بخش هوایی.

فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد (جدول ۳) اثر اصلی و متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت آنزیم در ریشه معنادار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد با افزایش غلظت نیتروژن، فعالیت آنزیم ریشه به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (جدول ٤). در واقع گیاهان برای جلوگیری از تجمع نیترات، با افزایش نیتروژن خاک، طول ریشه‌های خود را کاهش می‌دهند در نتیجه غلظت نیترات در ریشه کم و فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. تحقیقات عالمیان و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گیاه اسفناج نشان داد غلظت نیترات ریشه با بیشتر شدن دوره رشد کاهش می‌یابد و فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در ریشه با افزایش دوره رشد گیاه افزایش می‌یابد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. همچنین با توجه به شکل ۳ بر خلاف بخش هوایی، فعالیت آنزیم در ریشه‌ی گیاهان دارای باکتری کمتر از گیاهان شاهد بدون باکتری می‌باشد که ممکن

است به این دلیل باشد که در حضور باکتری نیترات، بیشتر به سمت بخش هوایی انتقال یافته و میزان نیترات در ریشه کم شده و به همان نسبت فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. عامل دیگر می‌تواند عدم تجمع نیترات در ریشه در حضور باکتری باشد یعنی باکتری به متابولیسم نیتروژن در ریشه و آسمیلاسیون آن در ریشه کمک کرده است. برتراند و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که PGPR ها به طور مستقیم متابولیسم نیتروژن را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. آن‌ها نشان دادند در گیاه کلزا که ریشه گیاه با PGPR ها تلقیح شد متابولیسم نیتروژن افزایش یافت. همچنین طی مطالعاتی که بالدانی (۲۰۰۵) انجام داد بیان کرد که فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز با آسمیلاسیون نیتروژن در ارتباط است به‌طوری که در گندم، فعایت آنزیم نیترات ریداکتاز باکتری آزوسپیریلوم منجربه بهبود آسمیلاسیون نیتروژن در ریشه گیاه شد. همچنین با توجه به وضعیت نامناسب نور و شدت فتوسنتز، احتمالاً انتقال مواد فتوسنتزی به ریشه کاهش یافته و تولید ATP نیز به همان نسبت کاهش می‌یابد و آنزیم NR که به شدت به ATP نیاز دارد فعالیت کمتری نشان می‌دهد. بوسول و همکاران(۱۹۹۵) بیان کردند فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز عمدتاً توسط نیترات، نور و ATP تنظیم میشود و با کاهش عوامل فوق فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. همچنین هاگمن و فلسیر(۱۹۶۰) نشان دادند که در برگهای گیاهان عالی فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در تاریکی کاهش یافته و مجددا وقتی در معرض نور قرار می‌گیرند فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد.



شکل۳- برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری (NP،Pp و Pf به ترتیب شاهد بدون باکتری، *Pseudomonas putida*Tabriz و *P. fluorescens* ChaO) بر فعالیت آنزیم ریشه.

غلظت آهن بخش هوایی

نتایج تجزیه واریانس جدول ۵ نشان می‌دهد که اثر اصلی کود نیتروژن در سطح احتمال ۵٪ و اثر اصلی باکتری و اثر متقابل نیتروژن و باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر غلظت آهن بخش هوایی معنادار می‌باشد. همچنین اثر اصلی و متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر جذب آهن بخش هوایی معنادار می‌باشد. مقایسه میانگین‌های اثر اصلی سطوح نیتروژن نشان می‌دهد که با افزایش نیتروژن از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، هم غلظت و هم جذب آهن بخش هوایی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (جدول ٦).

این افزایش ناشی از کاهش pH خاک است که با نتایج آسینگ و همکاران (۲۰۰۸) و آکاهانه و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. طبق مطالعات انجام شده توسط (هاولین و همکاران ۲۰۰٤) اوره پس از مصرف در خاک هیدرولیز شده و کربنات آمونیوم تولید می‌کند که در کوتاه مدت سبب افزایش pH خاک می‌شود ولی با گذشت زمان بر اثر فرآیندهای نیترات سازی و جذب آمونیوم به وسیله ریشه گیاه که هر دو فرآیند H^+ به رایزوسفر آزاد می‌کنند pH خاک کاهش یافته و آهن قابل جذب گیاه در خاک بالا می‌رود. نجفی و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که با افزایش غلظت NH_4^+ محلول غذایی غلظت آهن بخش هوایی و ریشه اسفناج افزایش می‌یابد. افزایش غلظت آهن در گندم نیز با مصرف کود اوره توسط ایرانی (۲۰۱۱) گزارش شده است.

جدول۵- تجزیه واریانس تأثیرسطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر غلظت وجذب آهن بخش هوایی و ریشه اسفناج.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		غلظت آهن بخش هوایی	جذب آهن بخش هوایی	غلظت آهن ریشه	جذب آهن ریشه
بلوک	۲	۱۹۵۲/۷۸$^{n.s}$	۰/۱۲۵$^{n.s}$	٦۱۹۲/۸۱$^{n.s}$	۰/۰۱۳$^{n.s}$
نیتروژن	۲	۲٤٤۲۰/۵۲*	۳۹/۷۹۱**	۲۳۷۹٤۲۱/٤**	۲۵/۱۸**
باکتری	۲	۵۸۸۸۲/۹۵**	۲/۰۳۸**	۳۰۹۳۵/۲۸$^{n.s}$	۱/٦۳**
نیتروژن× باکتری	٤	۲۰۲۰۳/۱٦**	۰/٦٤**	۲۸۷۰/٦$^{n.s}$	۰/٦۰۳**
خطای آزمایشی	۱۲	۳۳۲٤/٤۷	۰/۰۷۹	۱۵۷۱۵/۵۸	۰/۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۱۱/۹	۱۰/۳٦	۹/۹۹	٦/۷۳

$^{n.s.}$ ، * و ** به‌ترتیب غیرمعنادار، معنادار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

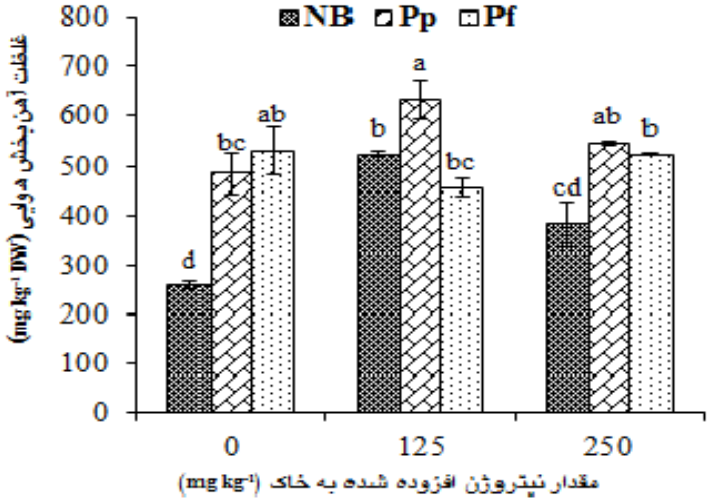
جدول۶- مقایسه میانگین اثرات اصلی سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر غلظت و جذب آهن و روی بخش هوایی اسفناج.

عامل	سطوح	ماده خشک بخش هوایی (g pot^{-1})	غلظت آهن بخش هوایی (mg kg^{-1} dw)	جذب آهن بخش هوایی (mg pot^{-1})	غلظت آهن ریشه (mg kg^{-1} dw)	جذب آهن ریشه (mg pot^{-1})
نیتروژن	صفر	۰/۹۹۷^{c}	٤۳۳/۳^{b}	۰/٤۰^{c}	۷۱٤^{c}	۰/۱۸^{c}
	۱۲۵	٦/۳۵^{b}	۵۳۷/۵^{a}	۳/۱۹^{b}	۱۳۱۲^{b}	۲/۵۲^{b}
	۲۵۰	۸/۸۵^{a}	٤۸۳/۳^{ab}	٤/۵۳^{a}	۱۷۳۸^{a}	۳/٤۳^{a}
مایه‌زنی باکتری	بدون مایه‌زنی	٤/۹٦^{b}	۳۹٦/۳^{b}	۲/۱٦^{b}	۱۱۸۷^{a}	۱/۵۷^{c}
	سودوموناس پوتیدا تبریز	۵/۲۹^{b}	۵۵۵^{a}	۲/۹٦^{a}	۱۲۸۳^{a}	۲/۱۵^{b}
	سودوموناس فلورسنس چائو	۵/۹۵^{a}	۵۰۲/۷^{a}	۳^{a}	۱۲۹٤^{a}	۲/٤^{a}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن تفاوت معناداری ندارند.

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود در تمامی سطوح نیتروژن غلظت آهن در گیاهان دارای باکتری *سودوموناس* افزایش می‌یابد که نتایج به دست آمده از این تحقیق با یافته‌های اسپاپن و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. آنان بیان کردند تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد گیاه موجب تسهیل جذب عناصر غذایی کم مصرف می‌شود. اغلب جانداران هوازی سازوکار فعالی را برای کسب آهن ایجاد کرده‌اند. در ریزجانداران این سازوکار بر پایه ترشح سیدروفور و ایجاد کیلیت آهن-سیدروفور است. این کیلیت به‌وسیله ریزجانداران تولیدکننده

سیدروفور به‌طور اختصاصی شناسایی شده و جذب می‌گردد (ویسکا و همکاران ۲۰۰۷). سیدروفور تولید شده توسط این ریزجاندارن به عنوان منبعی برای تأمین آهن گیاهان مطرح است. ونسویت و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند افزودن کیلیت آهن-پایووردین در مقایسه با Fe-EDTA به‌طور بسیار معناداری سبب افزایش رشد، میزان کلروفیل و آهن در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* می‌گردد. در ایران نیز رسولی صدقیانی (۲۰۰۶) با استفاده از پایووردین متصل به آهن نشاندار گزارش کرد که سیدروفور نوع پایووردین *سودوموناس فلورسنس* نقش مهمی در تأمین آهن گندم ایفا می‌کند. همچنین شارما و همکاران (۲۰۰۳) در یک آزمایش گلدانی نقش مؤثر سیدروفور میکروبی تولید شده توسط *سودوموناس* را در تغذیه آهن ماش مورد مطالعه قرار دادند و در پایان گیاهان کاهش علائم کلروز را نشان دادند و کل محتوای کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با باکتری حدود ۳۹٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. همچنین با توجه به اینکه مقدار از حاصلضرب غلظت در ماده خشک به‌دست می‌آید، این افزایش مقدار آهن در گیاهان دارای باکتری را می‌توان به افزایش ماده خشک و افزایش غلظت آهن نسبت داد.

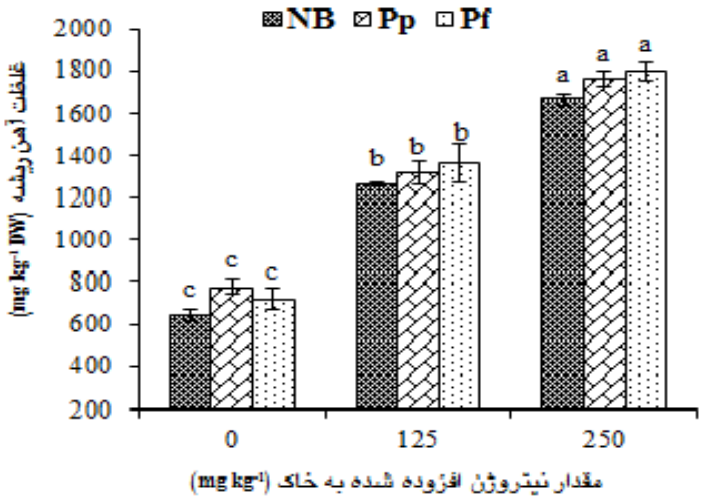


شکل۴- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری (Pp،NP و Pf به ترتیب شاهد بدون باکتری، *Pseudomonas putida* Tabriz و *P. fluorescens* ChaO) بر غلظت آهن بخش هوایی.

غلظت آهن ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد (جدول ۵) اثر اصلی سطوح نیتروژن بر غلظت آهن ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنادار می‌باشد ولی اثر اصلی باکتری و اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر غلظت آهن ریشه معنادار نمی‌باشد. همچنین اثر اصلی و متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر جذب آهن ریشه معنادار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد در ریشه نیز همانند بخش هوایی با افزایش سطوح نیتروژن غلظت و جذب آهن افزایش می‌یابد (جدول ٦) که مربوط به دلایل ذکر شده در بالا می‌باشد

ولی با توجه به شکل ۵ در تمامی سطوح نیتروژن غلظت آهن ریشه در تیمارهای دارای باکتری و شاهد بدون باکتری تفاوت معناداری با هم ندارند. این نتیجه می‌تواند مربوط به غلظت بالای آهن در ریشه نسبت به بخش هوایی باشد. چون وقتی ریشه در خاک مخصوصاً در گلدان با حجم محدود خاک نفوذ می‌کند بر اثر فشار وارده از طرف ریشه به اطراف، برخی ذرات ریز خاک در دیواره‌های سلولی وارد می‌شوند که هنگام جداسازی ریشه از خاک از آن جدا نمی‌شوند و با توجه به اینکه غلظت آهن خاک بیشتر از ریشه است و حتی به ۱ درصد هم می‌رسد، بنابراین حضور ذرات ریزخاک باعث افزایش غلظت آهن ریشه می‌شود. البته رسوب آهن در ریشه هم دلیل دیگری برای زیادی آهن در ریشه است. مطالعات مولکولی مشخص کرده که بیان ژن‌های تولید سیدروفور تحت تنظیم میزان آهن محیط است لذا بالا بودن آهن نیاز به تولید سیدروفور را در این باکتری‌ها مرتفع می‌سازد (ویسکا و همکاران ۲۰۰۷) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.



شکل۵- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری (Pp،NP و Pf به ترتیب شاهد بدون باکتری، *Pseudomonas putida* Tabriz و *P. fluorescens* ChaO) بر غلظت آهن ریشه.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که هر دو گونه باکتری *P.putida* Tabriz و *P.fluorescens* ChaO توانستند غلظت و جذب آهن بخش هوایی و ریشه اسفناج را نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری افزایش دهند. همچنین از دو گونه باکتری به کار رفته در این تحقیق گونه *P.putida* با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز و کاهش غلظت نیترات نسبت به *P.fluorescens* به عنوان گونه مؤثر و کارا معرفی می‌گردد. بنابراین، توصیه می‌شود در کاشت اسفناج از پتانسیل چنین باکتری‌هایی استفاده گردد تا با کاهش غلظت نیترات از طریق افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز و افزایش آهن گیاه کیفیت و ارزش غذایی این محصول افزایش یابد. گرچه برای توصیه در شرایط مزرعه نیاز به آزمایش های مزرعه ای بوده و با استفاده از نتایج تحقیقات گلدانی نمی‌توان برای شرایط مزرعه توصیه نمود.

منابع مورد استفاده

Ahmadi H, Akbarpour V, Dashti F and Shojaeian A, 2010. Effect of different levels of nitrogen fertilizer on yield, nitrate accumulation and several quantitative attributes of five Iranian spinach accessions. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science 8: 468- 473.

Akahane I, Makino T and Maejima Y, 2010. Effects of nitrogen fertilizer pH and electrical conductivity on the solubility of cadmium in soil solution. Japanese Society of Pedology 53: 101-107.

Alamian M, Eftekhari SA, Heydari M and Alemzadeh -Ansari N, 2013. Evaluation of nitrate accumulation and nitrate reductase activity at different stages of growth in some masses of spinach (*Spinacia oleracea* L.) native to Iran. Journal of Crop Production and Processing 10:25-35. (In Persian with English abstract).

Alizadeh O, Mazaheri D and Hashmidezfouli A, 1998. The effect of urea and urea covered with sulfur on yield and yield components of corn (*Zea mays*). Crop Science 3:42-45. (In Persian with Englisg abstract).

Aliasgharzad N, Heydaryan Z and Sarikhani MR, 2014. *Azospirillum* inoculation alters nitrate reductase activity and nitrogen uptake in wheat plant under water deficit conditions. International Journal on Advanced Science Engineering Imformation Technology 4:2088-5334

Anjana, Umar S and Iqbal M, 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. Agronomy for Sustainable Development 27:45-57.

Asing J, Saggar S, Singh J and Bolan NS, 2008. Assessment of nitrogen losses from urea and an organic manure with and without nitrification inhibitor, dicyandiamide, applied to lettuce under glasshouse conditions. Soil Research 46: 535-541.

Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP and Dogliotti E, 2008. Nitrate in vegetables: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. European Food Safety Authority Journal 689:1-79.

Baldani JI, 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 77: 549–579.

Bedzyk L, Wang T and Rick WY, 1999. The Periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. Journal of Bacteriology 181: 2802-2806.

Bertrand H, Plassard C and Pinochet X, 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). Canadian Journal of Microbiology 46: 229–236.

Boswell FC, Meisinger JJ and Case WL, 1995. Production, Marketing and Use of Nitrogen Fertilizers. Fertilizer Technology and Use. 3rd ed. SSSA Madison, WI.

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

Cardenaz-Navarro RC, Adamowicz S and Robin P, 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. Journal of Experimental Botany 50: 613-624.

Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE and Young VL, 1975. Determination of nitrate by spectrophotometer. Communication in Soil Science and Plant Analysis 6: 71-80.

Chen BM, Wang ZH, Li SX, Wang GX, Song HX and Wang XN, 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. Plant Science 167: 635-643.

Davoodifard M, Habibi D, Paknejad F, Fazeli F and Farhanipad F, 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and foliar application of amino acids and silicic acid on antioxidant enzyme activity of wheat under drought stress. Journal of Agriculture and Plant Breeding 4:11-36. (In Persian with English abstract).

Druart N, Goupil P, Dewaele E, Boutin JP and Rambour S, 2000. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intibus* L.) which acquire radial growth. Journal of Experimental Botany 51: 539–546

Fageria NK, Baligar VC and Clark RB, 2002. Micronutrients in crop production. Advances in Agronomy 77: 185-268.

Gee GW and Or D, 2002. Partical-size analysis. Pp:255-295. In : Dane JH and Topp GC (eds). Methods of Soil Analysis. Part 4. Physical Methods. Soil Science Society of American, Madison , Visconsin, USA.

Ghaderi A, 2006. Study of the ability of three *Pseudomonas* isolates to release phosphate from mineral surfaces. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Glick BR, Liu C, Ghosh S and Dumbroff EB, 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Soil Biology and Biochemistry 29: 1233-1239.

Gulser F, 2005. Effect of ammonium sulphate and urea on NO^-_3 and NO^-_2 accumulation nutrient content and yield criteria in spinach. Scientia Horticulturae 106: 330- 340.

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

Hage-man R H and Flesiier D, 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. Plant Physiology 35: 700-08.

Hajjilu M, Salimi H, Asghari H and Khavazi K, 2011. The use of plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers for the sustainability of agricultural ecosystems. 1th Iranian Fertilizer Challenges Congress: Half a Century of Fertilize Consumption, March 1-3, Tehran, Iran.

Hatamjafari F and Tazarv M, 2013. Study of antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. Journal of Chemistry 2: 451-455.

Havlin JL, Beaton JD, Tisdale SL and Nelson WL, 2004. Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management. 7th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Hu CX, Deng DE and Liu TC, 1992. Effects of nitrogen fertilizer on nitrate accumulation by the Chinese cabbage (*Brossica chinensis*) and tomato (*Lycopersicum esculentum*). Journal of Huazhong Agricultutal University 11: 239-243.

Irani N, 2011. Effects of urea on nutrient availability, growth and chemical composition of wheat and rice plants under different conditions in loamy sand and clay loam soils. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Ishiwata H, Yamada T, Yoshiike N, Nishijima M, Kawamoto A and Uyama Y, 2002. Daily intake of food additives in Japan in five age groups estimated by the market basket method. European Food Research Technology 215: 367–374.

Ivashikina NV and Sokolov OA, 1997. Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate. Plant Science 123: 29-37.

Joseph HS and Michael JP, 1979. *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves. Plant Physiology 63: 346–353.

Kalantari A, Aaliasgharzad N and Najafi N, 2018. Effects of two species of *Pseudomonas* and nitrogen levels on dry matter, chlorophyll index and N and Zn uptake by spinach plant. Applied Soil Research 1:62-72. (In Persian with English abstract).

King EO, Ward MK and Rainey M, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory Chinese Medicine 44: 301-307

Lhirondel JL, 2002. Nitrate and Man: Toxic, Harmless or Beneficial? CABI Publishing, Oxford, UK. 168 P.

Lindsay A, Benoist B, Dary O and Hurrell R, 2006. Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva, Switzerland.

Lorenz OA, 1978. Potential nitrate levels in edible plant parts. Pp. 201-2019. In: Nielsen DR and Mac Donald JG (eds). Nitrogen in the Environment. Academic Press.

Malakouti MJ, 2000. Control the concentration of nitrates in potatoes, onions and vegetables, undeniable necessity in maintaining healthy communities. Sustainable Agriculture 12: 1-5. (In Persian with English abstract).

Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A and Stitt M, 2001. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. Plant, Cell and Environment 24: 177–190.

Maynard DN, Barker AV, Minotti PL and Peck NH, 1976. Nitrate accumulation in vegetables. Advances in Agronomy 28: 71-118.

Najafi N, Parsazadeg M, Tabatabai SJ and Oustan Sh, 2011. Effects of nitrogen form and pH of nutrient solution on the uptake Iron, zinc, copper and manganese by spinach in hydroponic culture. Soil and Water Research 2:283-295. (In Persian with English abstract).

Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. Pp.539-579. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR, (eds). Methods of Soil Analysis. Soil Science Society of America, Madison.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus. Pp. 403-430. In: Page AL, Miller LH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy Monograph, American Society of Agronomy, Madison.

Sadaghiani MH, Khavazi K, Rahimiyan H, Malakouti MJ and Asadi-Rahmani H, 2006. Capability evaluation native species of *Pseudomonas fluorescens* wheat rhizosphere for the production of siderophore. Soil and Water Science. 1: 135-143. (In Persian with English abstract).

Sharafzadeh S, 2012. Effects of PGPR on growth and nutrients uptake of tomato. International Journal of Advances in Engineering and Technology 2: 27-31.

Sharma A, Johri BN, Sharma AK and Glick BR, 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiate* L. Wilzeck). Soil Biology and Biochemistry 35: 887-894.

Skrdleta V, Gaudinova A and Nemcova M, 1979. Relationships between nitrate level, nitrate reductase activity and anaerobic nitrite production in *Pisum sativum* leaf tissue. Biologia Plantarum 21: 307-310.

Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A and Vanderleyden J, 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant and Soil 312: 15-23.

Stewart GR, Lee JA and Orebamjo TO, 1972. Nitrogen metabolism of halophyte: Nitrate reductase activity and utilization. New Phytologyist 72: 539- 546.

Sumiyati, Endang S and Arif W, 2016. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and yield of shallot in sandy coastal land. Ilmu Pertanian (Agricultural Science) 3:105-110.

Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C and Lemanceau P, 2007. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions 20: 441-447.

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

Visca P, Imperi F and Lamont IL, 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends in Microbiology 15: 22-30.

Waling I, Vark WV, Houba VJG and Van der lee JJ, 1989. Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant analysis procedures. Wageningen Agriculture University, The Netherlands.

Welch RM, 2002. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. Plant and Soil 247: 83-90.

Zhengyin W, Huihe L, Baoshen L, Xuejian Y, Pengshou S, Henglin D and Tianchang X, 2003. Influence of nitrogen rates, soil fertility and harvest time on nitrate in *Chinese cabbage.* Science Agricultural Sinica 36: 1057-1064.

.