J. Soil and Plant Interactions, Vol. 14, No. 3, Fall 2023, pp. 53-71. Research Article
https://jspi.iut.ac.ir EISSN: 2783-5286 https://doi.org/10.47176/jspi.14.3.19712

Effect of Azolla Culture Medium on Biomass, Nutrient and Protein Concentrations of Azolla and Its Application as a Nutrient Supply for Bell Pepper

M. Fatahi Vanani[1] and B. Khalili*

(Received: 3 May 2023; Accepted: 12 August 2023)

Abstract

Azolla extracts are biodegradable and non-polluting to the environment, and because of its unique composition, it was subjected to integrated biorefineries for organic fertilizer and plant growth stimulants production. Here we investigated the effect of media culture on productivity and chemical composition of *Azolla filiculoides* and *Azolla Caroliniana* and then application of Azolla extract as an organic fertilizer. This research was conducted in the two studies at the Soil-Plant Interaction Research Center of Isfahan University of Technology. The Azolla culture media treatments showed significant effect ($p < 0.05$) on Azolla iron and zinc concentration. In the both Azolla species, addition of 20% of sulfur and phosphorus to the culture media significantly increased concentrations of nitrogen and acidic, alkaline, polar, aromatic and aliphatic amino acids. In the second study, Johnson and half Johnson media contained 5% and 10% Azolla extract showed highest fruit yield (i.e., fresh and dry weights) and concentrations of iron, zinc and nitrogen in the fruit, shoot and root of bell pepper, in which some of them were significant ($p < 0.05$). In total, our results showed that Azolla culture media composition may change quality and quantity of the Azolla extract and application of the extract may led to biofortification of bell pepper significantly.

Keyword: *Azolla filiculoides*, *Azolla Caroliniana*, Fe and Zn concentrations, Protein and amino acids, Bell pepper, Azolla extract.

Background and Objective: Micronutrient malnutrition or hidden hunger remains a major global challenge for human health and wellness. Being free floating aquatic plants, *Azolla* can be produced independently of arable lands. The aquatic fern Azolla is a special case among free-floating aquatic plants because it has evolved a symbiosis with the cyanobacterium *Nostoc azollae*, which fixes atmospheric nitrogen (N_2). Azolla ferns occur across many continents and across various climates. Using Azolla extract as a biofertilizer to replace artificial nitrogen fertilizer reduces pollution by nitrogen losses of various cultivation and provides added value to farmers (Brouwer, 2017; Brouwer et al., 2018). Here, we investigated the effect of media culture on productivity and chemical composition of *Azolla filiculoides* and *Azolla Caroliniana* and then application of Azolla extract as an organic fertilizer.

Methods: We tested two hypotheses: 1) Azolla culture medium could affect biomass, nutrient and protein

1- Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran.
* Corresponding author, Email: bkhalili@iut.ac.ir

concentrations of Azolla, and 2) Azolla extract application may improve fruit quality and cover some required nutrients of plant. The treatments of first study included a) IRRI2 culture media (the standard Azolla medium) (control), b) IRRI2 culture media + 10% extra sulfur concentration, c) IRRI2 culture media + extra 20% sulfur concentration, d) IRRI2 culture media + 10% extra phosphorus concentration, e) IRRI culture medium + 20% extra phosphorus concentration, f) IRRI2 + 10% sulfur + 20% phosphorus concentration, and g) IRRI2 + 20% extra sulfur + 20% extra phosphorus concentrations. The second study treatments were a) Johnson media (control), b) Johnson media + 5% Azolla extrat, c) Johnson media + 10% Azolla extrat, d) half Johnson media + 5% Azolla extract, and e) half Johnson media + 10% Azolla extract. Analysis of variance, comparison of the Azolla culture media and application of the extract in bell pepper growing media were done by completely randomized design with a one-way treatment structure using SAS 9.0 software.

Results: The results of the first study showed that the highest concentrations of iron and zinc in the third generation of *Azolla filiculoides* were detected in the IRRI2 + 10% sulfur + 20% phosphorus culture media and the highest concentrations of zinc in the first and third generation of *Azolla Caroliniana* and the first generation of *Azolla filiculoides* were detected in the IRRI2 + 20% sulfur culture media. The IRRI2 + 20% sulfur + 20% phosphorus culture media treatment increased concentrations of nitrogen and acidic, alkaline, polar, aromatic and aliphatic amino acids in the both Azolla species. Although, the highest dry weight yield of the both Azolla species was observed in the IRRI2 + 10% phosphorus treatment. In the second study, Johnson and half Johnson media contained 5% and 10% Azolla extract showed highest fruit yield (i.e., fresh and dry weights) and concentrations of iron, zinc and nitrogen in the fruit, shoot and root of bell pepper, in which some of them were significant ($p < 0.05$).

Conclusions: The fast-growing, nitrogen fixing, aquatic fern Azolla could be a promising novel crop for the production of organic and eco-friendly fertilizer, due to its high protein content, favorable amino acid profile and micronutrient contents.

References:

1. Brouwer, P., 2017. Turning The Aquatic Weed Azolla into a Sustainable Crop. PhD Thesis, Utrecht University, The Netherlands.

2. Brouwer, P., Schluepmann, H., Nierop, K.G.J., Elderson, J., Bijl, P.K., van der Meer, I., de Visser, W., Reichart, G.J., Smeekens, S., van der Werf, A., 2018. Growing Azolla to produce sustainable protein feed: the effect of differing species and CO_2 concentrations on biomass productivity and chemical composition. J. Sci. Food Agric. 98, 4759–4768. https://doi.org/10.1002/jsfa.9016.

روابط خاک و گیاه/ سال چهاردهم / شماره سوم / پاییز ۱۴۰۲ / صفحات ۷۱-۵۳
https://doi.org/10.47176/jspi.14.3.19712 EISSN: 2783-5286 https://jspi.iut.ac.ir
مقاله پژوهشی

تأثیر نوع محیط کشت بر زیست‌توده، غلظت عناصر غذایی و محتوی پروتئین آزولا، و کاربرد عصاره آن در تغذیه فلفل دلمه‌ای

محمد فتاحی وانانی[1] و بنفشه خلیلی*

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۱)

چکیده

عصاره آزولا ترکیبی تجزیه‌پذیر و غنی از عناصر غذایی و ترکیب شیمیایی و بدون ترکیبات آلوده‌کننده محیط زیست است، بنابراین در سال‌های اخیر تبدیل آزولا به کود آلی محرک رشد گیاه مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش تأثیر ترکیب شیمیایی محیط کشت بر عملکرد و ترکیب شیمیایی *آزولا فیلیکلوئیدس* و *آزولا کارولینیانا* و کاربرد عصاره آزولا به‌عنوان کود آلی در محیط کشت فلفل دلمه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش در مرکز پژوهشی روابط خاک و گیاه دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گرفت. نتایج نشان داد تیمارهای محیط کشت آزولا تأثیر معنی‌داری ($p<0.05$) بر غلظت آهن و روی دو گونه آزولا داشته‌اند. همچنین تیمار افزایش ۲۰٪ گوگرد و فسفر به محیط کشت آزولا غلظت آمینواسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک دو گونه آزولا را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داده است. از سوی دیگر نتایج مطالعه دوم نشان داد تیمارهای کاربرد ۵ و ۱۰ درصد عصاره آزولا در محیط کشت جانسون و نیم‌جانسون بیش‌ترین عملکرد میوه و غلظت آهن، روی و پروتئین را در میوه، شاخصاره و ریشه فلفل دلمه‌ای نشان داده‌اند اگر چه تنها در برخی موارد این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار ($p<0.05$) بود. به‌طور کلی، ترکیب محیط کشت آزولا ممکن است بر کمّیت و کیفیت آزولا تأثیرگذار باشد و کاربرد عصاره غنی آزولا می‌تواند موجب غنی‌سازی زیستی در فلفل دلمه‌ای شود.

واژه‌های کلیدی: *آزولا فیلیکلوئیدس*، *آزولا کارولینیانا*، آهن و روی، پروتئین و آمینواسیدها، فلفل دلمه‌ای، عصاره آزولا.

مقدمه

علی‌رغم افزایش بیش از دو برابری جمعیت جهان در نیم‌قرن گذشته، به‌کارگیری روش‌های نوین کشاورزی و افزایش درآمد سرانه باعث کاهش گرسنگی در سراسر جهان شده است. با این‌حال با توجه به آثار مخرب زیست‌محیطی کشاورزی فشرده، از منظر کشاورزی پایدار این روش‌ها دیگر نمی‌تواند گزینه سودمندی باشد (Bleakley and Hayes, 2017). پروتئین یکی از مواد اصلی در تغذیه انسان و دام است که با توجه به روند افزایش جمعیت، محدودیت تولیدات کشاورزی و تمرکز جغرافیایی تولید گیاهان پروتئینی، در آینده دچار کمبود خواهد

۱- گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bkhalili@iut.ac.ir

شد. بنابراین جایگزینی منابع جدید پروتئینی به جای منابع سنتی مانند سویا و همچنین روش‌های جدید تولید به‌ویژه در مناطق معتدل لازم است تا نیازهای پروتئین پیش‌بینی‌شده را تأمین نموده و تقاضای مصرف‌کنندگان را برآورده سازد (Bleakley and Hayes, 2017, Brouwer et al., 2018). جلبک‌های دریایی و ریزجلبک‌ها با توجه به مشخصات آمینواسیدی مطلوب و سطوح پروتئینی مشابه با منابع سنتی پروتئین مانند سویا، گوشت، تخم‌مرغ و شیر به‌عنوان یک منبع پروتئینی جدید و ماندگار در نظر گرفته می‌شوند (Bleakley and Hayes, 2017, Macartain et al., 2007).

آزولا نوعی سرخس شناور آزاد متعلق به خانواده تک‌هسته‌ای *Azollaceae* است و دارای هفت گونه و سه زیرگونه است (Katole et al., 2017). به‌طور گسترده در مناطق گرم و مرطوب، حوضچه ها، آبگیرها و کانال های دارای آب راکد رشد می‌کند و به‌عنوان محصولی جدید و امیدوارکننده در تولید خوراک دام و غذا با توجه به رشد سریع و محتوای پروتئینی بالا و همچنین مشخصات آمینواسیدی مطلوب نسبت به سویا، مطرح‌شده است (Becerra et al., 1995, Brouwer et al., 2018). مورفولوژی آزولا متفاوت از سایر سرخس‌هاست. به‌ویژه تفاوت در ساختار برگ آن باعث ایجاد محیطی مطلوب برای همزیستی با *سیانوباکتر آنابنا* شده است. درنتیجه همزیستی *سیانوباکتر آنابنا* و آزولا، این سرخس قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی است (Carrapico, 2010). مقدار تثبیت نیتروژن در آزولا ۰/۱۵–۰/۱۷ میلی‌گرم نیتروژن بر ساعت در هر گرم زیست‌توده خشک است که به‌طور چشم‌گیری از نیتروژن تثبیت‌شده در غده‌های موجود در ریشه سویا با مقدار ۰/۰۸ میلی‌گرم بر ساعت در هر گرم زیست‌توده خشک، بیش‌تر است (Brouwer et al., 2018).

باوجود این‌که گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* در ایران به‌عنوان یک‌گونه شناخته شده مطرح است و به‌نظر می‌رسد گونه‌های دیگر آزولا نیز در برخی مناطق ایران یافت شوند اما هیچ‌گونه‌ای از آزولا در ایران به‌عنوان گونه بومی ثبت نشده است (Farahpour-Haghani et al., 2017). علاوه بر ایران (Khoshravesh et al., 2009)، در کشورهای دیگری مانند پرتغال، انگلیس، فرانسه (Hill and McConnachie, 2009)، آلمان (Hussner et al., 2010)، تانزانیا (Witt and Luke, 2017)، آفریقای جنوبی (Buyel et al., 2015) و ایالت تگزاس در ایالات‌متحده (Richerson and Grigarick, 1967) آزولا به‌عنوان یک‌گونه مهاجم شناخته شده است. در ایران وزارت کشاورزی در سال ۱۹۸۶ به منظور انجام پژوهش های مربوط به ظرفیت تثبیت نیتروژن، واردات آزولا از فیلیپین به بندر انزلی در شمال استان گیلان را آغاز کرد. در مدت زمان کوتاهی آزولا در شمال ایران پخش شد (Delnavaz and Azimi, 2009).

آزولا به عنوان گیاه آبزی سرشار از پروتئین (۳۷–۲۰ درصد وزن خشک) معرفی شده است (Katole et al., 2017). برآورد مواد معدنی مختلف آزولا نشان می دهد آزولا حاوی ۸ درصد ماده خشک، ۲۴/۶۱– ۲۱/۴ درصد پروتئین خام، ۱۵–۱۲/۷ درصد فیبر خام، ۴۷/۰۸– ۴۳/۸ درصد فیبر شوینده طبیعی[1] (NDF)، ۳۶/۰۸ درصد فیبر شوینده اسیدی[2] (ADF)، ۳/۸ درصد عصاره اتیلن، ۴/۱ درصد نشاسته و ۱۵/۹ درصد خاکستر کل بر اساس ماده خشک است (Katole et al., 2017).

رشد جلبک‌ها تابعی از شدت نور، چگونگی جذب مواد مغذی، افزایش pH با جذب کربن محیط و انباشتگی متابولیت‌های سلولی است. علاوه بر نور، CO_2 و pH، نوع و غلظت مواد مغذی یکی از عوامل نرخ رشد متفاوت در گونه‌های مختلف ریز جلبک است (Macartain et al., 2007). به‌طورکلی شرایط رشد و تولید آزولا تفاوت چندانی با جلبک‌های آبزی ندارد. بر اساس پژوهش‌های سینگ (۱۹۷۷)، آزولا توانایی زنده‌ماندن در محدوده گسترده‌ای از دما را داراست اما دمای بهینه برای بیش‌تر گونه‌ها در دامنه ۲۸–۱۸ درجه سلسیوس است. همچنین آزولا توانایی زنده‌ماندن در دامنه وسیعی از pH (۱۰–۳/۵) را دارد (Singh, 1977). پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد تغییرات زیاد ترکیبات

1. Neutral detergent fibre
2. Acid detergent fibre

شیمیایی محیط رشد، نوع گونه و شرایط رشد نه‌تنها کمّیت بلکه کیفیت زیست‌توده آزولا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Brouwer, 2017). فراهمی فسفر یکی از اصلی‌ترین علل افزایش رشد آزولا است. به‌عنوان مثال افزایش غلظت فسفر باعث افزایش زیست‌توده چهار گونه *آزولا مکزیکانا*، *میکروفیلا* و گونه *پیناتا* با دو زیرگونه *ایمبریکا* و *پیناتا* شده است (Kushari and Watanabe, 1992). همچنین افزایش غلظت آهن در محیط کشت آزولا باعث افزایش غلظت نیتروژن در آزولا می‌شود که این امر بیانگر تأثیر آهن بر رشد و میزان تثبیت نیتروژن در سیانوباکترهای همزیست با آزولا است (Temmink et al., 2018, Wagner, 1997). افزایش غلظت CO_2 تا ۸۰۰ppm در محیط کشت دو گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* و *پیناتا* طیف آمینواسید دو گونه را تغییر داده است (Brouwer et al., 2018). پژوهش‌ها نشان می‌دهد گوگرد نقش اساسی در بیوسنتز آمینواسید سیستئین و متیونین دارد؛ بنابراین کاربرد این عنصر در محیط کشت *آزولا پیناتا* می‌تواند بر غلظت این دو آمینواسید در آزولا تأثیرگذار باشد (Silva and Silva, 2007).

با توجه به توانایی تولید آزولا در همه مناطق جهان، آزولا می‌تواند به‌عنوان یک راه‌حل مناسب و دائمی برای تأمین نیتروژن در کشاورزی به‌منظور افزایش حاصلخیزی خاک، تأمین غذا و رفع گرسنگی به‌کار رود (Datta, 2011). با افزایش علاقه به روش‌های سالم و بیولوژیک تولید محصولات زراعی و با توجه به برخی پیامدهای زیان‌بار کودهای شیمیایی، عصاره جلبک‌های دریایی به‌عنوان یک کود بیولوژیک در برخی سرزمین‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد (Colavita et al., 2011). در همین ارتباط Bund and Norre (2011) بیان کردند که استفاده از عصاره جلبک دریایی *Ascophyllum nodosum* موجب افزایش اندازه میوه، بهبود شکل ظاهری و رنگ میوه می‌شود. پژوهش‌ها در هند نشان می‌دهد بیش‌ترین عملکرد گندم با کاربرد ۲۰ تن آزولا به همراه ۶۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار حاصل شده است (Raoof et al., 2006). همچنین استفاده از مقادیر ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ تن در هکتار آزولا تازه در خاک باعث کاهش چگالی ظاهری و pH خاک، افزایش گنجایش نگهداری آب، کربن آلی، غلظت نیتروژن آمونیومی، نیترات، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم خاک و کاهش مقدار شوری خاک از ۳۵ به ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر شده است (Raoof et al., 2006, Raja et al., 2012).

پژوهش‌ها در مورد تأثیر عصاره آزولا بر عملکرد رشد گیاه نخودفرنگی نشان می‌دهد استفاده از عصاره ۲۰ درصد آزولا به‌صورت محلول‌پاشی برگی، باعث افزایش معنی‌داری در مقدار وزن تازه، وزن خشک، طول ساقه، طول ریشه و درصد جوانه‌زنی شده است (Bindhu, 2013). کاربرد عصاره آزولا و برخی از جلبک‌های سبز آبی بر تولید، کیفیت و کمّیت میوه زردآلو تأثیرگذار بوده است (Taha and El-Shahat, 2017). همچنین کاربرد آزولا تازه به همراه کمپوست در بستر کاشت گیاه لوبیای فرانسوی باعث افزایش معنی‌داری در مقدار عملکرد غلاف، درصد جوانه‌زنی، قدرت نهال و مقدار زیست‌توده این گیاه شده است (Tejaswini et al., 2015). کاربرد کود زیستی *آزولا فیلیکلوئیدس* باعث افزایش تعداد برگ، افزایش سطح برگ، قطر میوه، تعداد میوه و عملکرد کل فلفل در دو واریته *Sunny* و *Cheyenne* شده است (Boye et al., 2018). سایر پژوهش‌ها حاکی از این است آزولا غنی‌شده با آهن به‌عنوان یک کود کندرهش، باعث افزایش عملکرد خیار در کشت هیدروپونیک می‌شود. به‌طوری‌که در تیمار کاربرد کمپلکس Fe-Azolla بیش‌ترین رشد ریشه و شاخه حاصل شده است (Plessner et al., 1998). همچنین کاربرد خاکی عصاره آزولا می‌تواند بر ویژگی‌های بیولوژیک خاک تأثیرگذار باشد. برای نمونه ناهید و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند کاربرد عصاره آزولا به همراه کمپوست چای و مخمر باعث افزایش فعالیت میکروبی خاک شد که به‌دنبال آن همبستگی مثبتی بین فعالیت میکروبی و فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشاهده شده است (EL-Shimi et al., 2015).

این پژوهش با فرض تأثیر ترکیب شیمیایی محیط کشت بر ویژگی‌های آزولا و با هدف بهینه‌سازی این محیط کشت برای

دستیابی به بیش‌ترین عملکرد در واحد سطح، افزایش غلظت عناصر غذایی و غلظت پروتئین و اسیدهای آمینه در عصاره آزولا انجام شد. همچنین با توجه به محتوای غنی آزولا از پروتئین‌ها، آمینواسیدها و عناصر غذایی، کاربرد عصاره آزولا در محیط کشت فلفل دلمه‌ای می‌تواند موجب بهبود کیفیت و کمیّت میوه این گیاه شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مرکز پژوهشی روابط خاک و گیاه دانشگاه صنعتی اصفهان به صورت دو مطالعه جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در مطالعه اول اثر محیط کشت آزولا بر زیست‌توده آزولا، عناصر غذایی و محتوی پروتئین و آمینواسیدهای عصاره *آزولا فیلیکلوئیدس* و *آزولا کارولینیانا* بررسی گردید. مطالعه دوم به‌منظور بررسی اثر کاربرد عصاره آزولا (کشت‌یافته در محیط IRRI2 + ۲۰٪ غلظت فسفر و گوگرد) بر عملکرد و کیفیت میوه فلفل دلمه‌ای با ۵ تیمار در ۴ تکرار انجام شد.

مطالعه اول

در این بخش از پژوهش، ۲ گونه آزولا در ۷ نوع تیمار مختلف محیط کشت با ۳ تکرار در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. برای کشت و تکثیر دو گونه آزولا از محلول غذایی IRRI2 (محیط کشت توسعه‌یافته در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج، IRRI) به‌عنوان محیط کشت متداول برای تغذیه آزولا استفاده شد.

تیمارهای مطالعه اول به شرح زیر بود:

۱- IRRI2 به‌عنوان محیط کشت شاهد (Carrapico, 2009)

۲- IRRI2 + ۱۰ درصد گوگرد

۳- IRRI2 + ۲۰ درصد گوگرد

۴- IRRI2 + ۱۰ درصد فسفر

۵- IRRI2 + ۲۰ درصد فسفر

۶- IRRI2 + ۱۰ درصد گوگرد + ۲۰ درصد فسفر

۷- IRRI2 + ۲۰ درصد گوگرد + ۲۰ درصد فسفر

به‌منظور تأمین غلظت‌های بیش‌تر عنصر فسفر در این مطالعه از NaH_2PO_4 و برای تأمین غلظت های ۱۰ و ۲۰ درصد بیش‌تر عنصر گوگرد از $MgSO_4.7H_2O$ استفاده شد. کشت دو گونه آزولا تا سه نسل پیاپی انجام شد؛ بدین‌صورت که با رسیدن اولین تیمار به بیش‌ترین عملکرد در واحد سطح (زمانی که فضای بیش‌تری در سطح برای رشد وجود نداشته باشد) تمامی آزولا از سطل‌ها برداشت شده و تعداد سه عدد آزولا پس از نشانه‌گذاری برای کشت و تکثیر به محیط کشت‌های جدید منتقل شدند.

اندازه‌گیری صفات رویشی

پس از برداشت هر نسل عملکرد به‌صورت وزن تازه و وزن خشک و زمان دو برابر شدن (DT) اندازه‌گیری شد. مدت‌زمان موردنیاز برای افزایش زیست‌توده آزولا به دو برابر مقدار اولیه خود بر اساس معادله (۱) برآورد شد (Peters and Meeks, 2003):

$$DT = \frac{t}{\left[\log\left(\frac{W_t}{W_0}\right)/0.301\right]} \quad (۱)$$

t: مدت‌زمان رشد آزولا

W_t: زیست‌توده نهایی آزولا در زمان t

W_0: زیست‌توده آزولا در زمان شروع آزمایش

اندازه‌گیری غلظت نیتروژن و پروتئین آمینواسیدها در آزولا

غلظت نیتروژن و پروتئین به روش تقطیر با بخار آب با دستگاه کلدال (KJELTEC AUTO 1030 Analyzer) (Singh, 1977) و غلظت آمینواسیدهای عصاره آزولا با استفاده از دستگاه آنالیز آمینواسید (مدل ARACUS) در نسل‌های اول و سوم اندازه‌گیری شد (Kouzuma et al., 2004).

اندازه‌گیری غلظت آهن، روی، کربن، هیدروژن و گوگرد

غلظت آهن و روی (در نسل‌های اول و سوم) به روش هضم

تر و با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Wright and Stuczynski, 1996). غلظت عناصر کربن، هیدروژن و گوگرد با دستگاه CHNS Analyzer (مدل Vario EL III) اندازه‌گیری شد.

مطالعه دوم

پس از انتخاب بهترین تیمار محیط کشت آزولا با بیش‌ترین عملکرد در واحد سطح، بیش‌ترین غلظت آهن و بیش‌ترین غلظت آمینواسیدها، *آزولا فیلیکلوئیدس* در این تیمار دوباره کشت داده شد. سپس عصاره آزولا تکثیرشده به روش اصلاح‌شده Brouwer (2017) استخراج شده و به‌عنوان کود زیستی در کشت فلفل دلمه‌ای (مطالعه دوم) مورد آزمایش قرار گرفت.

به‌منظور بررسی اثر عصاره آزولا بر ویژگی‌های رویشی و عملکرد فلفل دلمه‌ای، ۵ نوع محیط کشت در ۴ تکرار و در مجموع ۲۰ گلدان که هرکدام حاوی یک گیاه فلفل دلمه‌ای بود در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره استخراج‌شده آزولا به‌عنوان عصاره ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و برای استفاده در محیط کشت فلفل دلمه‌ای از عصاره با غلظت ۳۰ درصد استفاده گردید.

تیمارهای این آزمایش در هر بار تعویض محلول جانسون به شرح زیر اعمال شد:

۱- محلول جانسون کامل + ۵ درصد (v/v) عصاره آزولا

۲- محلول جانسون کامل + ۱۰ درصد (v/v) عصاره آزولا

۳- محلول جانسون حاوی ۵۰ درصد از غلظت نیتروژن و آهن + ۵ درصد (v/v) عصاره آزولا

۴- محلول جانسون حاوی ۵۰ درصد از غلظت نیتروژن و آهن + ۱۰ درصد (v/v) عصاره آزولا

۵- محلول جانسون کامل به‌عنوان شاهد

دو ماه پس از اعمال تیمارهای فوق، گیاهان از بسترهای کشت خارج شده، ریشه‌ها از قسمت طوقه از ساقه اصلی جدا شده و پس از حذف رطوبت اضافی، وزن شاخساره و ریشه هر بوته به‌صورت جداگانه به‌وسیله ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. نمونه‌های ریشه و شاخساره به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس در خشک‌کن قرار گرفتند. سپس وزن خشک آن‌ها به‌طور جداگانه توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. پس از خشک‌شدن بافت گیاهی، برگ‌ها از قسمت انتهایی دمبرگ از ساقه جدا شده و سپس آسیاب شد. همچنین مقدار موردنیاز ریشه و میوه برداشت شده و پس از آسیاب‌شدن برای اندازه‌گیری غلظت عناصر به آزمایشگاه منتقل گردید. غلظت عناصر آهن و روی در نمونه‌های برگ، میوه و ریشه به روش هضم تر و با استفاده از دستگاه جذب اتمی و غلظت نیتروژن نیز به روش کجلدال اندازه‌گیری شد (Wright and Stuczynski, 1996).

محاسبات آماری با نرم‌افزار آماری SAS 9.0، مقایسه میانگین‌ها با آزمون کم‌ترین اختلاف معنی‌دار (LSD) و رسم نمودارها با نرم‌افزار MS Excel 2016 انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر ترکیب شیمیایی محیط کشت بر غلظت عناصر غذایی، محتوی پروتئین و زیست‌توده دو گونه آزولا

نتایج حاصل از اعمال تیمارهای مختلف بر غلظت آهن عصاره هر دو گونه آزولا در جدول (۱) ارائه شده است. نتایج نشان داد بیش‌ترین غلظت آهن در نسل اول (۱/۵۲ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به تیمار IRRI2 + ٪۲۰ فسفر است. همچنین تمام سطوح تیماری در نسل سوم نیز باعث افزایش غلظت آهن نسبت به شاهد شد به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت آهن (۲/۶۳ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار IRRI2 + ٪۱۰ گوگرد + ٪۲۰ فسفر حاصل شده است. همچنین غلظت آهن در نسل سوم با میانگین غلظت ۲/۱۹ میلی‌گرم بر گرم، نسبت به نسل اول با میانگین ۱/۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج اعمال تیمارهای مختلف بر غلظت آهن گونه *آزولا کارولینیانا* نشان داد سایر تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌اند به‌طوری‌که تیمار IRRI2 + ٪۲۰ فسفر+ ۱۰ درصد گوگرد با مقدار ۳/۱۶ میلی‌گرم آهن بر گرم وزن خشک

جدول ۱. مقایسه میانگین غلظت آهن (Fe) و روی (Zn) در تیمارهای مختلف محیط کشت دو گونه آزولا در نسل‌های اول و سوم.

Table 1. Comparison of the iron (Fe) and zinc (Zn) concentration in different treatments of the culture medium of two *Azolla* species in the first and third generations.

Third generation نسل سوم				First generation نسل اول				
caroliniana		*filiculoides*		*Caroliniana*		*filiculoides*		
Zn (mg/g)	Fe (mg/g)	Zn (mg/g)	Fe (mg/g)	Zn (mg/g)	Fe (mg/g)	Zn (mg/g)	Fe (mg/g)	Treatment تیمار
0.066^{b}	2.42^{b}	0.060^{ab}	2.20^{ab}	0.070^{a}	1.42^{e}	0.062^{ab}	❋1.13^{c}	IRRI2 + 10% S
0.074^{a}	2.52^{b}	0.068^{a}	1.99^{b}	0.070^{a}	1.27^{f}	0.066^{a}	0.66^{d}	IRRI2 + 20% S
0.062^{b}	3.16^{a}	0.056^{bc}	2.53^{ab}	0.070^{a}	2.19^{c}	0.050^{c}	1.52^{a}	IRRI2 + 10% P
0.052^{c}	2.90^{ab}	0.048^{c}	1.99^{b}	0.052^{d}	3.16^{a}	0.039^{d}	1.49^{b}	IRRI2 + 20% P
0.055^{c}	2.81^{ab}	0.067^{a}	2.63^{a}	0.060^{c}	1.57^{d}	0.051^{c}	1.47^{b}	IRRI2 + 10% S + 20% P
0.055^{c}	3.22^{a}	0.054^{bc}	2.43^{ab}	0.065^{b}	2.91^{b}	0.048^{c}	1.48^{b}	IRRI2 + 20% S + 20% P
0.051^{c}	1.02^{c}	0.058^{b}	0.67^{c}	0.051^{e}	1.02^{g}	0.058^{b}	0.67^{d}	Control
0.005	0.630	0.009	0.546	0.0009	0.0231	0.005	0.0286	LSD ($p < 0.05$)

❋ در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

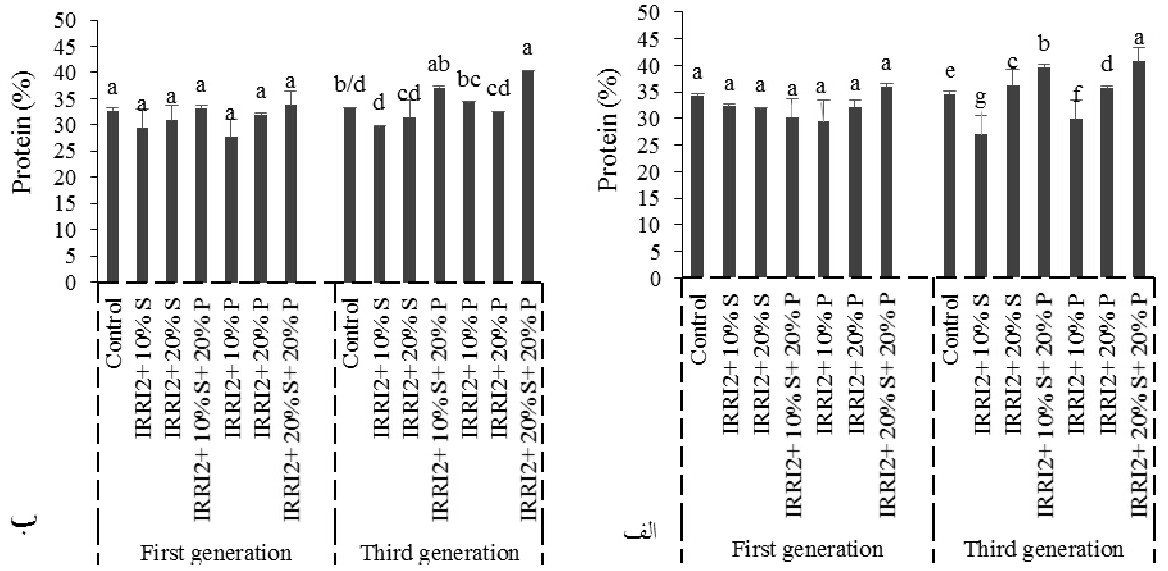
❋ In each column, numbers with similar letters are not significantly different (LSD, $p < 0.05$).

تیمار IRRI2 (Treatment) + 10% S: محیط کشت متداول آزولا + ۱۰٪ گوگرد، IRRI2 + 20% S: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد، IRRI2 + 10% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 10% S + 20% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% S +20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، Control: شاهد

آزولا بیش‌ترین غلظت آهن را به همراه داشته است. همچنین در نسل سوم نیز تیمار IRRI2 + ۲۰٪ فسفر + ۲۰٪ گوگرد با مقدار ۳/۲۲ میلی‌گرم آهن بر گرم آزولا بیش‌ترین مقدار را داشته است. نتایج غلظت آهن در هر دو گونه آزولا نشان داد غلظت این عنصر در نسل سوم نسبت به نسل اول افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۱).

نتایج نشان می‌دهد افزایش ۲۰ درصدی غلظت گوگرد در محیط کشت آزولا باعث افزایش غلظت روی در عصاره هر دو گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* و *کارولینیانا* شده است. به‌طوری‌که در نسل اول بیش‌ترین غلظت روی *آزولا فیلیکلوئیدس* (۰/۰۶۶ میلی‌گرم روی بر گرم) در تیمار IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد حاصل شده است. این تیمار در نسل سوم نیز موجب افزایش غلظت روی نسبت به شاهد (۰/۰۶۸ میلی‌گرم بر گرم) شده است.

همچنین بیش‌ترین غلظت روی *آزولا کارولینیانا* در نسل اول (۰/۰۷ میلی‌گرم بر گرم) و در نسل سوم (۰/۰۷۴ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد مشاهده شد. کم‌ترین غلظت روی مربوط به تیمار شاهد با مقدار ۰/۰۵۱ میلی‌گرم روی بر گرم آزولا بوده است (جدول ۱). اگر چه پژوهش‌ها در زمینه تأثیر محیط کشت آزولا بر محتوی عناصر ریزمغذی آن محدود است، Kushari and Watanabe (1992) بیان کردند افزایش غلظت فسفر محیط کشت باعث افزایش زیست‌توده ۴ گونه *آزولا مکزیکانا*، *میکروفیلا* و گونه *پیناتا* با دو زیرگونه ایمبریکا و پیناتا شده است. آنها همچنین اظهار داشتند که افزایش غلظت فسفر در محیط کشت آزولا، درصد فسفر، درصد نیتروژن و درصد پتاسیم این چهار گونه را نیز افزایش داده است (Kushari and Watanabe, 1992). نتایج سایر



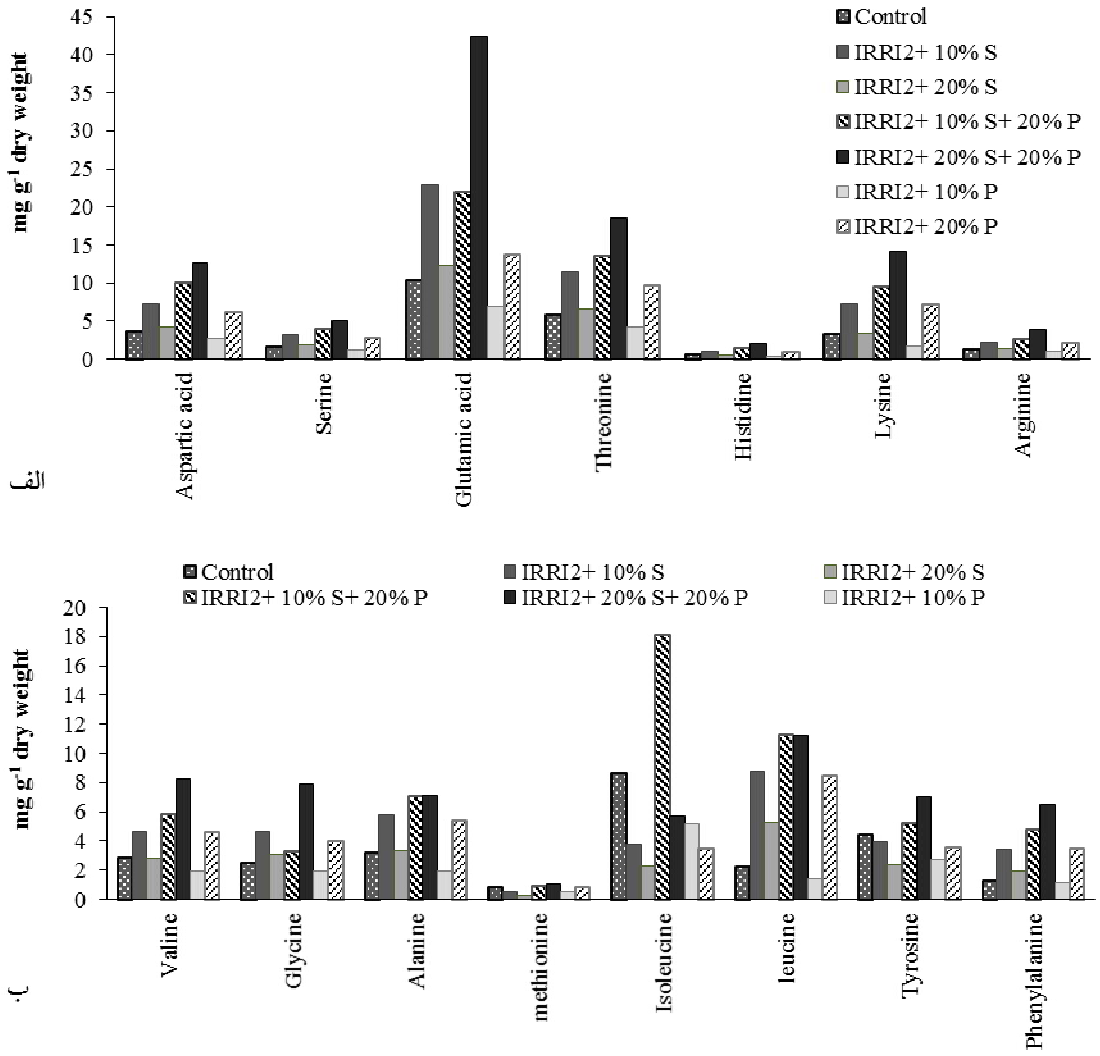
شکل ۱. غلظت پروتئین در *آزولا فیلیکلوئیدس* (الف) و *آزولا کارولینیانا* (ب) در نسل اول و نسل سوم در تیمارهای محیط کشت؛ حروف یکسان در نمودارها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای هریک از نسل‌ها است (LSD, $p < 0.05$).

Fig. 1. Protein concentration of (a) *Azolla filiculoides* and (b) *Azolla caroliniana* in the first and third generations; The identical letters in the graphs indicate that there is no significant difference in the treatments (LSD, $p < 0.05$).

First generation: نسل اول، Third generation: نسل سوم، IRRI2 + 10% S: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد، IRRI2 + 20% S: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد، IRRI2 + 10% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 10% S + 20% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% S +20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، Control: شاهد

پژوهش‌ها نشان داده است که افزایش غلظت آهن در محیط کشت آزولا بر غلظت نیتروژن آزولا تأثیرگذار بوده، به‌طوری‌که افزایش غلظت آهن در محیط کشت آزولا باعث افزایش غلظت نیتروژن در آزولا شده است. این یافته بیانگر تأثیر آهن بر رشد و میزان تثبیت نیتروژن در سیانوباکترهای همزیست با آزولا است (Temmink et al., 2018, Wagner, 1997). همچنین *آزولا فیلیکلوئیدس* قادر به پاسخ پویا به فراهمی فسفر در محیط کشت است، اما این سطح پاسخ در یک غلظت معین از فسفر محدود خواهد شد (Brouwer et al., 2018). در همین خصوص پژوهش‌های مشابهی انجام شد که نشان می‌دهد کمبود آهن و بروز علائمی مانند رنگ‌پریدگی ناشی از کمبود آهن در غلظت‌های زیاد فسفر می‌تواند به دلیل بی‌تحرکی آهن در مقادیر زیاد فسفر و تشکیل کمپلکس $Fe\text{-}PO_4$ باشد (Rajaie and Tavakoly, 2018, Römheld, 2000).

نتایج حاصل از اعمال تیمارهای مختلف نشان می‌دهد اعمال تیمار IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر تا نسل سوم موجب افزایش معنی‌دار درصد پروتئین در عصاره *آزولا فیلیکلوئیدس* (۴۰/۷۵ درصد) و *آزولا کارولینیانا* (۴۰/۳۵ درصد) نسبت به شاهد شده است (شکل ۱). همچنین درصد پروتئین *آزولا فیلیکلوئیدس* در نسل سوم نسبت به نسل اول افزایش معنی‌داری داشته است. کاربرد عنصر فسفر نسبت به کاربرد عنصر گوگرد تا نسل سوم *آزولا کارولینیانا* درصد پروتئین را ۲/۷ درصد افزایش داده است. Cary and Weerts (1992) گزارش کردند با افزایش فسفر از ۰/۰۱ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت آزولا، غلظت نیتروژن ۱۳ درصد و پتاسیم ۳۳/۷ درصد افزایش یافته است. همچنین افزایش غلظت فسفر از ۲ به ۵ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش تقریباً دو برابری نیتروژن شده اما غلظت فسفر تغییری را نشان نداده است. همچنین افزایش



شکل ۲. طیف آمینواسیدهای (الف) اسیدی، بازی و قطبی (ب) آلیفاتیک و آروماتیک *آزولا فیلیکلوئیدس* در تیمارهای مختلف محیط کشت.

Fig. 2. The range of (a) acidic, basic and polar amino acids and (b) aliphatic and aromatic amino acids of *Azolla filicloides* in different treatments of culture medium.

IRRI2 + 10% S: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد، IRRI2 + 20% S: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد، IRRI2 + 10% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 10% S + 20% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% S +20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، Control: شاهد

غلظت فسفر در محیط باعث کاهش غلظت سدیم در آزولا شده است با این‌حال تأثیری در غلظت کلسیم، منیزیم و پتاسیم نداشته است (Cary and Weerts, 1992). سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد شرایط محیطی تولید و ترکیب محیط کشت جلبک‌ها در مقدار پروتئین و ترکیب آمینواسیدهای جلبک تأثیرگذار است. در همین خصوص Temmink et al. (2018) با بررسی اثر تیمارهای مختلف فسفر بر عملکرد و محتوای نیتروژن آزولا نشان دادند بیش‌ترین مقدار نیتروژن به‌دنبال کاربرد تیمار ۵۰ میکرومولار و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار ۰/۵ و ۲ میکرومولار فسفر بوده است (Temmink et al., 2018).

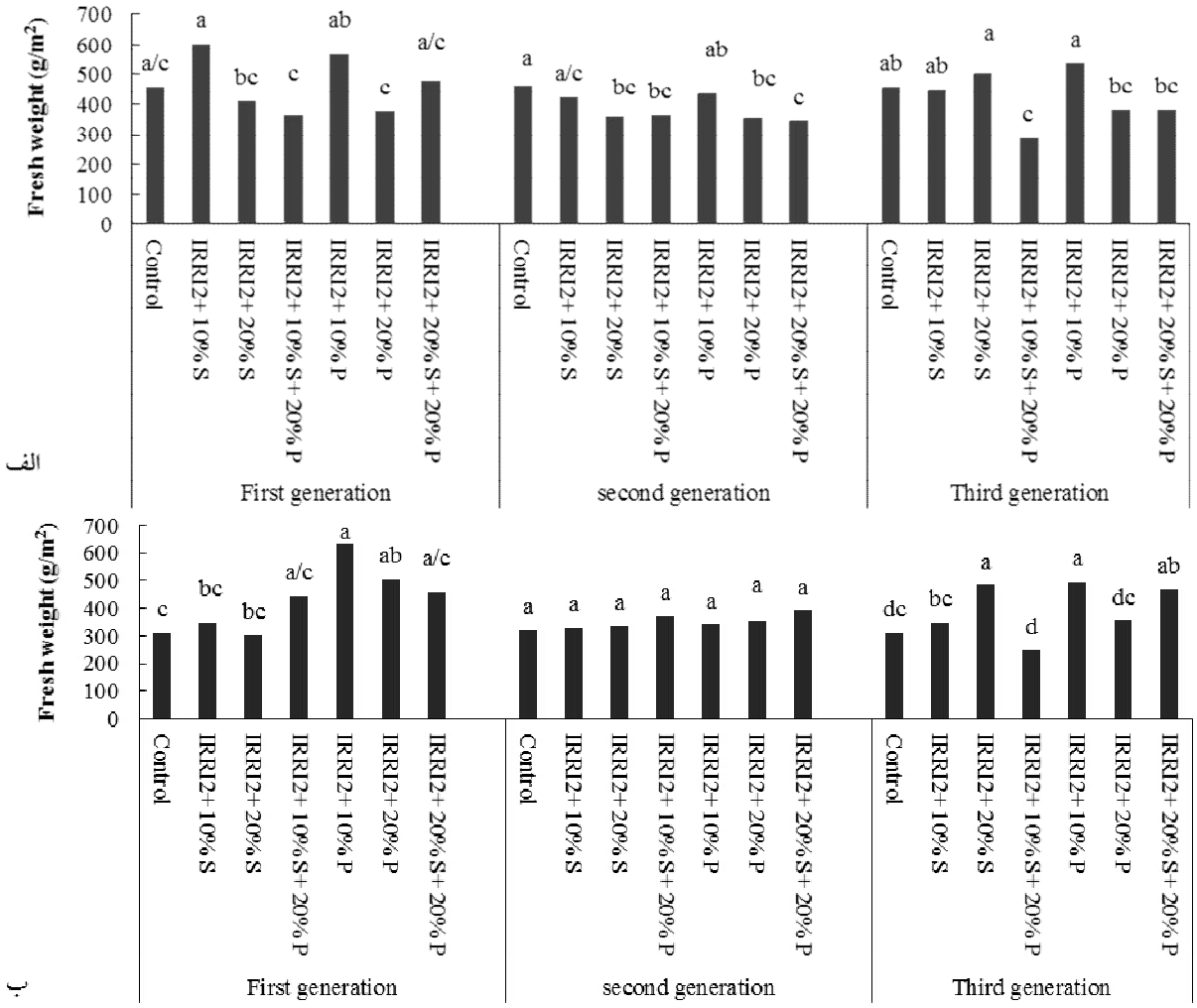
نتایج مقایسه میانگین غلظت آمینواسید دو گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* و *کارولینیانا* در نسل سوم نشان می‌دهد تفاوت

معنی‌داری بین این دو گونه آزولا از نظر غلظت آمینواسید وجود ندارد (شکل ۲). با توجه به نتایج گلوتامیک اسید با میزان ۲۰ درصد فراوان‌ترین اسید آمینه در *آزولا فیلیکلوئیدس* بوده و سپس ایزولوسین با مقدار ۱۷ درصد، ترئونین ۱۱٪، تیروزین ۹ درصد، آسپارتیک اسید ۷ درصد، والین ۶ درصد، آلانین ۶ درصد، لیزین ۶ درصد، گلایسین ۵ درصد، لوسین ۴ درصد، آرژنین ۳ درصد، سرین ۳ درصد، متیونین ۳ درصد، هیستیدین ۱ درصد و فنیل آلانین ۱ درصد از کل محتوای آمینواسید *آزولا فیلیکلوئیدس* را شامل می‌شوند. نتایج نشان می‌دهد تیمار IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، غلظت آمینواسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک *آزولا فیلیکلوئیدس* را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داده است. به‌طوری‌که غلظت آمینواسید آسپارتیک اسید از ۳/۶۲ میلی‌گرم بر گرم در نمونه شاهد به ۱۲/۶۷ میلی‌گرم بر گرم، غلظت گلوتامیک اسید از ۱۰/۳۱ میلی‌گرم بر گرم در نمونه شاهد به ۴۲/۴۴ میلی‌گرم بر گرم، ترئونین از ۵/۸۹ در نمونه شاهد به ۱۸/۴۷ میلی‌گرم بر گرم و لیزین از ۳/۳ میلی‌گرم بر گرم در نمونه شاهد به ۱۴/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک افزایش یافته است.

اعمال تیمارهای محیط کشت غلظت آمینواسیدهای اسیدی، بازی و قطبی *آزولا کارولینیانا* را تغییر داده است، به‌طوری‌که تیمار IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر غلظت آمینواسید آسپارتیک اسید را از ۴/۱۷ به ۱۶/۶۶ میلی‌گرم بر گرم افزایش داده است. نتایج اندازه‌گیری غلظت آمینواسیدهای آلیفاتیک و آروماتیک در *آزولا کارولینیانا* نشان می‌دهد به‌غیر از تیمار IRRI2 + ۱۰٪ فسفر، سایر تیمارهای اعمال‌شده غلظت آمینواسیدها را افزایش داده‌اند (شکل ۲).

Brouwer et al. (2018) نشان دادند افزایش غلظت CO_2 تا ۸۰۰ppm در محیط کشت دو گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* و *آزولا پیناتا* طیف آمینواسید دو گونه را تغییر داده است. به‌طوری‌که غلظت تریپتوفان و آلانین به ترتیب ۱۸ و ۱۷ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش داشته است اما غلظت سیستئین و هیستیدین در *آزولا فیلیکلوئیدس* به‌ترتیب ۱۴ و ۱۱ درصد کاهش داشته است (Brouwer et al., 2018). پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد گوگرد نقش اساسی در بیوسنتز آمینواسید سیستئین و متیونین دارد. بنابراین کاربرد این عنصر در محیط کشت *آزولا پیناتا* می‌تواند بر غلظت این دو آمینواسید در آزولا تأثیرگذار باشد؛ به‌طوری‌که افزایش غلظت این عنصر در کشت آزولا غلظت متیونین در عصاره آزولا را ۱۵ درصد و غلظت سیستئین را تا ۳۰ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش می دهد (Silva and Silva, 2007). ترکیب و غلظت آمینواسیدهای آزاد در *آزولا جاپونیکا* تحت تأثیر گونه، مرحله رشد، بافت گیاه و عوامل طبیعی مانند فراهمی عناصر غذایی است (Kitoh et al., 1992). بررسی تأثیر کاربرد اوره بر متابولیسم اسیدهای آمینه و پراکسیداسیون لیپید در غشاء آزولا نشان می‌دهد تغییر در ترکیب محیط کشت و عناصر غذایی آزولا باعث تغییر در ویژگی‌های ظاهری، محتوای آمینواسید و تغییر در غشاء سلولی آزولا می‌شود، به‌طوری‌که افزودن اوره به محیط کشت افزایش متابولیسم اسیدهای آمینه و پراکسیداسیون لیپید در غشاء سلولی *آزولا پیناتا* می‌شود (Chen et al., 2017).

نتایج اندازه‌گیری عملکرد در واحد سطح (وزن تازه) در سه نسل پیاپی در دوره‌های ده روزه نشان می‌دهد افزایش غلظت عناصر فسفر و گوگرد به میزان ۲۰ درصد در محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار وزن تازه *آزولا فیلیکلوئیدس* شده است (شکل ۳). به‌طوری‌که بیش‌ترین عملکرد در واحد سطح در نسل دوم *آزولا فیلیکلوئیدس* مربوط به تیمار محیط کشت IRRI2 به‌عنوان شاهد (۴۵۹/۸۲ گرم بر مترمربع) است. همچنین کم‌ترین عملکرد در واحد سطح مربوط به تیمار محیط کشت IRRI2+ ۲۰٪ فسفر + ۲۰٪ گوگرد است. بیش‌ترین عملکرد در واحد سطح این گونه آزولا در نسل سوم مربوط به تیمار محیط کشت IRRI2 + ۱۰٪ فسفر و کم‌ترین عملکرد در واحد سطح مربوط به تیمار محیط کشت IRRI2 + ۲۰٪ فسفر + ۱۰٪ گوگرد است. مقایسه میانگین داده‌های نسل اول، نسل دوم و نسل سوم نشان داد بیش‌ترین عملکرد مربوط به نسل اول با میانگین ۴۶۶/۳۴ گرم بر مترمربع، سپس نسل سوم با عملکرد

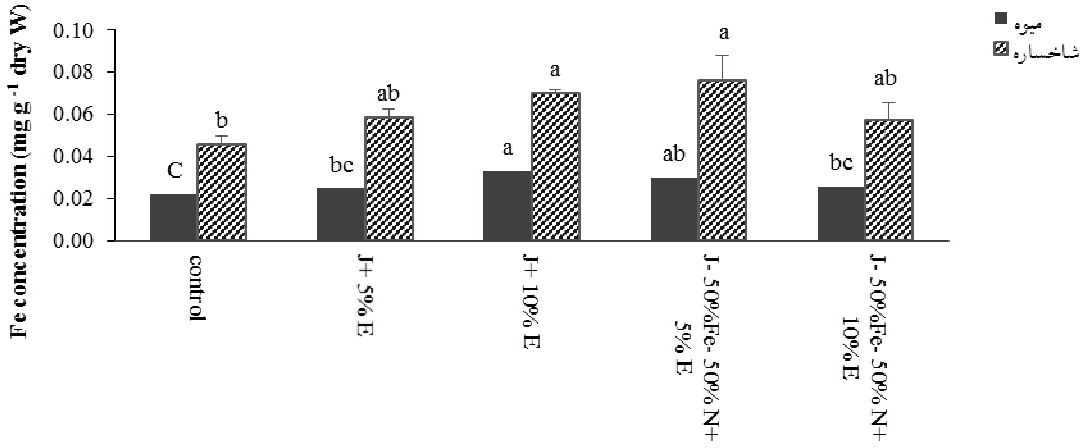


شکل ۳. عملکرد در واحد سطح (وزن تازه) *آزولا فیلیکلوئیدس* (الف) و *آزولا کارولینیانا* (ب) با محیط کشت IRRI2 (شاهد) و تیمارهای مختلف محیط کشت؛ وجود حروف یکسان در نمودارها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارها است (LSD, $p < 0.05$).

Fig. 3. Yield per unit area (fresh weight) *of Azolla filiculoides* (A) *and Azolla caroliniana* (B) with IRRI2 medium (control) and different treatments of the medium; The identical letters in the graphs indicate that there is no significant difference in the treatments (LSD, $p < 0.05$).

IRRI2 + 10% S: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد، IRRI2 + 20% S: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد، IRRI2 + 10% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 10% S + 20% P: محیط کشت آزولا + ۱۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، IRRI2 + 20% S +20% P: محیط کشت آزولا + ۲۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر، Control: شاهد

۴۲۷/۲۱ گرم بر مترمربع و کم‌ترین عملکرد مربوط به نسل دوم با مقدار ۳۹۱/۳۳ گرم بر مترمربع بوده است که این اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار بوده است (شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌های نسل اول *آزولا کارولینیانا* نشان می‌دهد بیش‌ترین عملکرد (۵۸۳/۴۷ گرم بر مترمربع) مربوط به تیمار IRRI2 + ۱۰٪ فسفر و کم‌ترین مقدار عملکرد (۳۲۷/۷۵ گرم بر مترمربع) مربوط به تیمار شاهد است. در نسل سوم *آزولا کارولینیانا* نیز بیش‌ترین عملکرد مربوط به تیمارهای IRRI2 + ۲۰٪ گوگرد (۴۸۰/۷۵ گرم بر مترمربع) و IRRI2 + ۱۰٪ فسفر ۷۸ (/۴۷۱ گرم بر مترمربع) بوده است. همچنین کم‌ترین عملکرد مربوط به تیمار IRRI2+ ۱۰٪ گوگرد + ۲۰٪ فسفر با مقدار ۲۵۶/۸۲ گرم بر مترمربع است که اختلاف معنی داری با شاهد نداشته



شکل ۴. تأثیر کاربرد عصاره آزولا بر غلظت آهن در شاخساره و میوه فلفل دلمه‌ای؛ ستون‌های دارای حروف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارها است .(LSD, $p < 0.05$)

Fig. 4. Effect of Azolla extract application on Fe concentration in shoot and fruit of bell pepper; The identical letters in the graphs indicate that there is no significant difference in the treatments (LSD, $p < 0.05$).

J + 5% E: محلول جانسون + ۵٪ عصاره، J + 10% E: محلول جانسون + ۱۰٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن+ ۵٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن + ۵٪ عصاره، Control: شاهد

است. در همین خصوص Cary and Weerts (1992) نشان داد در دمای ۲۵ °C افزایش فسفر باعث افزایش ۷ برابری زیست‌توده آزولا شده است. همچنین نرخ نسبی رشد، زمان دو برابر شدن و میزان سطح برگ آزولا پاسخ مثبتی به افزایش غلظت فسفر نشان داده است (Cary and Weerts, 1992). همچنین Cheng et al. (2010) نشان دادند افزودن فسفر به محیط کشت آزولا، وزن خشک را ۱۳۰۰ درصد نسبت به شاهد (بدون فسفر)، میزان جذب کربن را ۱۳۰۹ درصد، انباشت نیتروژن را ۱۴۹۱ درصد، درصد نیتروژن را ۱۵/۱ درصد و غلظت کربن را ۰/۴ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش داده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد فعالیت آنزیم نیتروژناز در آزولا به‌شدت تحت تأثیر ترکیب محیط کشت و غلظت عناصر غذایی موجود در محیط کشت بوده و ترکیب محیط کشت به‌طور مستقیم بر فتوسنتز و درنهایت بر عملکرد وزن تازه و وزن خشک آزولا تأثیرگذار است (Rai and Rai, 2003, Rai et al., 2006). پژوهش‌های Handajani (2012) نشان می‌دهد کاربرد نیتروژن و فسفر بر عملکرد وزن تازه و وزن خشک و زمان دو برابر شدن آزولا تأثیرگذار است که می‌تواند به دلیل نقش حیاتی نیتروژن در بیوسنتز سلول در حین فتوسنتز و نهایتاً تولید بافت گیاهی آزولا باشد.

تأثیر کاربرد عصاره آزولا در محیط کشت بر صفات فلفل دلمه‌ای

نتایج مقایسه میانگین وزن تازه و وزن خشک هر میوه فلفل دلمه‌ای نشان می‌دهد افزودن ۵ درصد (v/v) عصاره آزولا به محیط کشت باعث افزایش معنی‌دار وزن تازه هر میوه (۱۲۲/۱۸ گرم) و وزن خشک هر میوه (۹/۰۷ گرم) شده است (شکل ۴). کم‌ترین میانگین وزن هر میوه (۶۵/۵۵ گرم وزن تازه و ۴/۵۲ گرم وزن خشک) در تیمار محلول جانسون حاوی ۵۰٪ از غلظت نیتروژن و آهن + ۱۰ درصد عصاره آزولا مشاهده شده است (جدول ۲). نتایج به‌دست آمده نشان داد بیش‌ترین مقدار وزن تازه ریشه (۲۷/۵ گرم در بوته) در تیمار کاربرد ۱۰ درصد (v/v) عصاره آزولا در محلول جانسون حاوی ۵۰ درصد از غلظت نیتروژن و آهن به‌دست آمده است. همچنین نتایج نشان

جدول ۲. تأثیر کاربرد عصاره آزولا بر میانگین وزن تازه و وزن خشک شاخسار، هر میوه و ریشه فلفل دلمه‌ای.

Table 2. Effect of Azolla extract application on average of fresh weight and dry weight of bell pepper shoot, each fruit and root.

وزن خشک Dry weight			وزن تازه Fresh weight			Treatments تیمارها
Root (g)	Fruit (g)	Shoot (g)	Root (g)	Fruit (g)	Shoot (g)	
1.65[a]	9.07[a]	6.31[a]	19.65[bc]	122.18[a]	42.57[a]	J + 5% E (w/w)
1.81[a]	4.77[b]	5.95[a]	16.26[c]	73.92[b]	39.93[a]	J + 10% E (w/w)
2.20[a]	5.66[b]	8.27[a]	26.18[ab]	80.75[b]	51.89[a]	J - 50%Fe - 50% N + 5% E (w/w)
1.99[a]	4.52[b]	7.17[a]	27.50[a]	65.55[b]	54.29[a]	J- 50%Fe - 50% N+ 10% E (w/w)
1.36[a]	6.69[ab]	8.47[a]	20.59[a/c]	85.01[b]	54.47[a]	Control
0.876	3.311	3.92	7.23	28.49	18.98	LSD ($p < 0.05$)

* در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

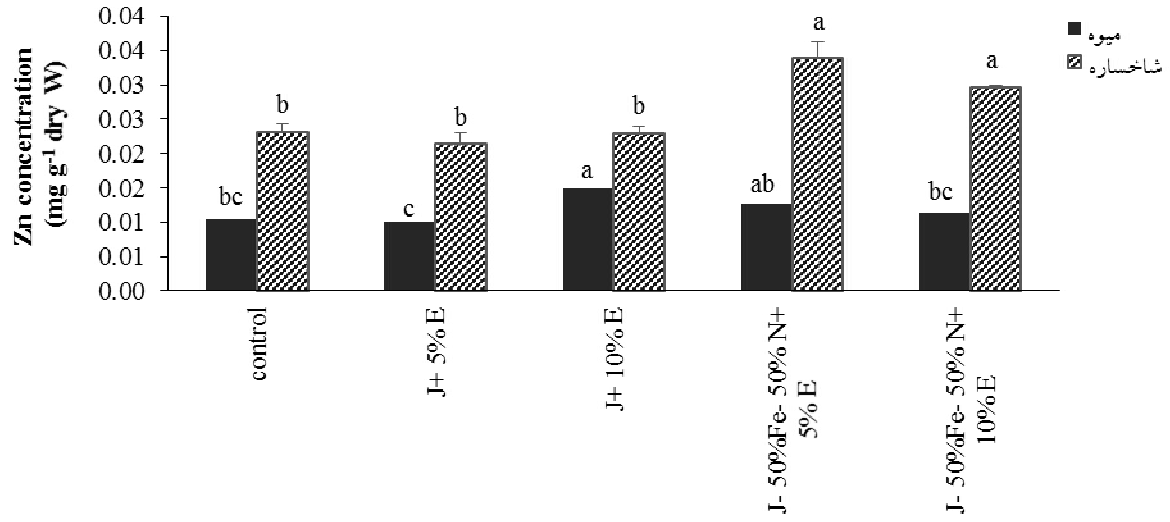
* In each column, numbers with similar letters are not significantly different (LSD, $p < 0.05$).

J + 5% E: محلول جانسون + ۵٪ عصاره، J + 10% E: محلول جانسون + ۱۰٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن + ۵٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن + ۵٪ عصاره، Control: شاهد

می‌دهد در تیمارهای کاهش ۵۰ درصدی غلظت آهن و نیتروژن همراه با کاربرد عصاره آزولا کاهش معنی‌داری در وزن شاخصاره و ریشه مشاهده نشد که می‌تواند به این دلیل باشد که عناصر غذایی و هورمون‌های موجود در عصاره آزولا تا حدی کمبود عناصر محیط کشت را جبران کرده‌اند (جدول ۲). Hanafy and El-Emary (2018) اظهار داشتند استفاده از عصاره ۲۰ درصد *آزولا پیناتا* در کشت گوجه‌فرنگی، درصد جوانه‌زنی، ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن خشک و وزن تازه گیاه افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان داده است. همچنین سایر پارامترهای رشد مانند تعداد شاخه، تعداد برگ، وزن و تعداد میوه با کاربرد عصاره *آزولا پیناتا* افزایش یافته و زمان رسیدن میوه‌ها کاهش یافته است. این پژوهشگران همچنین اظهار داشتند کاربرد عصاره ۲۰ درصد *آزولا پیناتا* باعث افزایش درصد پروتئین کل در گوجه‌فرنگی می‌شود. این پژوهشگران افزایش عملکرد شاخساره، ارتفاع بوته و درصد جوانه‌زنی بذر گوجه‌فرنگی در اثر کاربرد عصاره ۲۰ درصد آزولا را به علت وجود هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد مانند سیتوکینین‌ها، اکسین‌ها، ویتامین‌ها و اسیدآمینه موجود در عصاره آزولا دانسته‌اند (Hanafy and El-Emary, 2018).

نتایج غلظت آهن و روی در شاخساره و میوه فلفل دلمه‌ای در شکل‌های (۵) و (۶) ارائه شده است. این نتایج نشان می‌دهد افزودن ۵ درصد عصاره آزولا (v/v) به محلول جانسون باعث افزایش غلظت آهن در شاخساره و میوه فلفل دلمه‌ای شده است. به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت آهن در شاخساره در تیمار محلول جانسون حاوی۵۰ درصد از غلظت نیتروژن و آهن + ۵ درصد عصاره آزولا مشاهده شد و کم‌ترین غلظت آهن در شاخساره با مقدار ۰/۰۴۵ میلی‌گرم بر گرم مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۴).

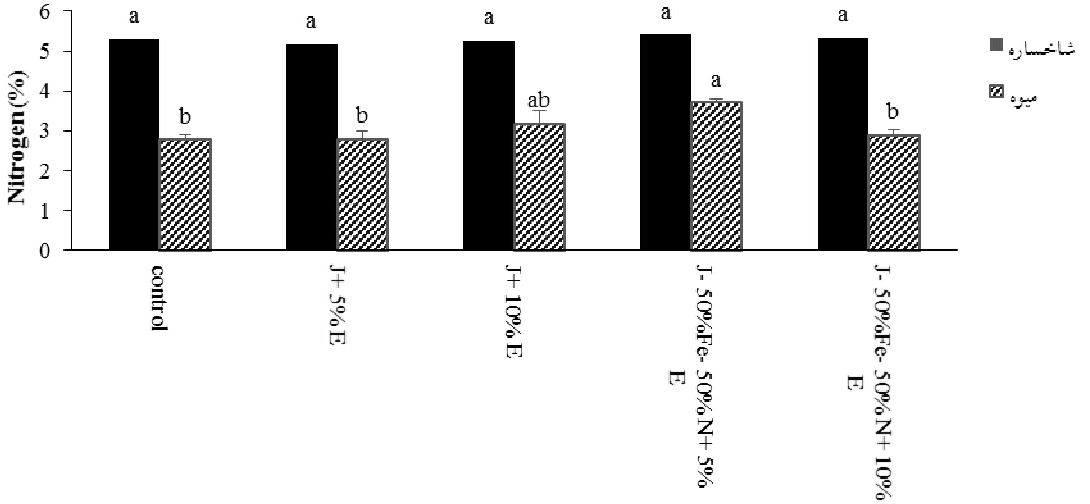
بیش‌ترین غلظت آهن در میوه (۰/۰۳۲ میلی‌گرم بر گرم) و روی در میوه (۰/۰۱۴ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار کاربرد ۱۰ درصد عصاره آزولا در محیط کشت جانسون و کم‌ترین غلظت روی در میوه و شاخساره در گیاه شاهد مشاهده گردید (شکل‌های ۴ و ۵). Sadegh Kasmaei et al. (2019) با بررسی تأثیر ریزوباکترهای محرک رشد گیاه، کمپوست آزولا و بیوچار آزولا بر برخی شاخص‌های کیفی خاک و رشد گیاه رزماری نشان دادند تمامی پارامترهای رشد و غلظت عناصر غذایی در



شکل ۵. تأثیر کاربرد عصاره آزولا **بر** غلظت روی در شاخساره و میوه فلفل دلمه‌ای؛ ستون‌هایی دارای حروف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارها است (LSD, $p < 0.05$).

Fig. 5. Effect of Azolla extract application on Zn concentration in shoot and fruit of bell pepper; The identical letters in the graphs indicate that there is no significant difference in the treatments (LSD, $p < 0.05$).

J + 5% E: محلول جانسون + ۵٪ عصاره، J + 10% E: محلول جانسون + ۱۰٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن+ ۵٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن + ۵٪ عصاره، Control: شاهد



شکل ۶. تأثیر کاربرد عصاره آزولا بر درصد نیتروژن در شاخساره و میوه فلفل دلمه‌ای؛ ستون‌هایی دارای حروف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار آماری تیمارها است (LSD, $p < 0.05$).

Fig. 6. Effect of Azolla extract application on nitrogen concentration in shoot and fruit of bell pepper; The identical letters in the graphs indicate that there is no significant difference in the treatments (LSD, $p < 0.05$).

J + 5% E: محلول جانسون + ۵٪ عصاره، J + 10% E: محلول جانسون + ۱۰٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن+ ۵٪ عصاره، J - 50%Fe - 50% N + 5% E: محلول جانسون حاوی ۵۰٪ غلظت آهن و نیتروژن + ۵٪ عصاره، Control: شاهد

گیاه رزماری با کاربرد کمپوست و بیوچار آزولا افزایش یافته است. Setiawati et al. (2018) نشان دادند استفاده از پودر تازه یا کمپوست آزولا مقادیر فسفر قابل‌جذب در خاک و فسفر گیاه را افزایش می‌دهد که می‌تواند به دلیل محتوای زیاد فسفر در آزولا بوده یا درنتیجه کاهش pH خاک باعث حلالیت بیش‌تر فسفر در خاک شده باشد. Richardson and Simpson (2011) دلیل افزایش جذب و غلظت فسفر در گیاه رزماری با کاربرد آزولا را به دلیل افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز بیان کردند که باعث حل‌شدن فسفات‌های نامحلول و تغییر فرم آن‌ها به فرم‌های محلول و قابل جذب برای گیاه می‌شود.

کاربرد ۵ درصد (v/v) عصاره آزولا در محیط کشت جانسون حاوی ۵۰ درصد نیتروژن و آهن موجب افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن میوه شده است. این درحالی است که کم‌ترین مقدار نیتروژن در تیمار شاهد با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشته است (شکل ۶). این نتایج نشان می‌دهد کاربرد عصاره آزولا در محیط کشت کمبود نیتروژن محیط کشت را جبران کرده است، اگر چه این احتمال وجود دارد که نوع کاربرد عصاره (به‌عنوان مثال محلول‌پاشی) تأثیر بیش‌تری بر محتوی عناصر غذایی میوه و شاخصاره داشته باشد (شکل ۶). Al-Marsoumi and Al-Hadethi (2020) با بررسی تأثیر اسید هیومیک و محلول‌پاشی عصاره جلبک دریایی بر درختان یک-ساله انبه اظهار داشتند عصاره جلبک دریایی اثر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن برگ نهال انبه داشته است. نتایج پژوهش Hanafy and El-Emary (2018) نشان می‌دهد عصاره ۲۰ درصد آزولا تأثیر قابل‌توجهی بر تمام ویژگی‌های بیوشیمیایی گوجه‌فرنگی داشته است. با توجه به نتایج این پژوهش، آزولا به دلیل توانایی در بهبود ویژگی‌های رویشی و محتوای ویتامین‌ها، بتاکاروتن، هورمون‌های رشد، مواد معدنی و بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌عنوان کود مناسب و ارزان‌قیمت در کشاورزی استفاده شود. همچنین پژوهش‌های Abeer et al. (2015) و Rathore et al. (2009) نیز گویای این مطلب است که عصاره جلبک دریایی و *آزولا فیلیکلوئیدس* حاوی هورمون‌های تقویت‌کننده رشد مانند ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوریک اسید (IBA) و عناصر کم‌مصرف مانند آهن، روی، مولیبدن، کبالت، مس و نیکل و همچنین ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد زمانی که هدف از کشت آزولا کاربرد آن به‌عنوان کود آلی است، تغییر ترکیب شیمیایی محیط کشت آزولا می‌تواند موجب افزایش عملکرد آزولا و غلظت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و همچنین تغییر کیفیت و کمیّت آمینواسیدها در دو گونه *آزولا فیلیکلوئیدس* و *کارولینیانا* شود که می‌تواند افزایش کیفیت عصاره استخراج‌شده از آزولا را به‌دنبال داشته باشد.

کاربرد عصاره آزولا استخراجی در محیط کشت فلفل دلمه-ای افزایش غلظت عناصر آهن و روی، درصد نیتروژن و عملکرد شاخساره و میوه در فلفل دلمه‌ای و بهبود کیفیت میوه در برخی تیمارها را به‌دنبال داشته است. همچنین به‌نظر می‌رسد کاربرد این عصاره در برخی تیمارهای محیط کشت نیم‌جانسون نیتروژن و آهن، کمبود این عناصر غذایی را تا حدی جبران کرده و کیفیت و کمّیت میوه و شاخساره گیاه با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشته است. این یافته نشان‌دهنده این امر است که می‌توان برخی از نیازهای غذایی گیاهان در محیط‌های کشت هیدروپونیک را با کودهای آلی تأمین کرد. علاوه بر این، کاربرد عصاره آزولا به‌عنوان کودهای آلی غنی از اسیدهای آمینه و عناصر پرمصرف و کم‌مصرف می‌تواند منجر به غنی‌سازی محصولات گلخانه‌ای گردد.

تشکر و سپاسگزاری

بخشی از هزینه‌های این پژوهش با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح شماره۹۸۰۱۴۷۸۶) تأمین گردید.

تضاد منافع

شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی با شـخص،

منابع مورد استفاده

1. Abeer, S., Shafeek, M., Ahmed, H.I., Abdel-Al, F., 2015. Improving growth, fruit set, total yield and fruit quality of sweet pepper plants (*Capsicum annum L.*) by using antioxidant and seaweed extracts. Middle East J. Agric. Res. 4, 154–161.
2. Al-Marsoumi, F., Al-Hadethi, M., 2020. Effect of humic acid and seaweed extract spray in leaf mineral content of mango seedlings. Plant Arch 20, 827–830.
3. Becerra, M., Preston, T.R., Ogle, B., 1995. Effect of replacing whole boiled soya beans with azolla in the diets of growing ducks. Livest. Res. Rural. Dev. 7, 1–10.
4. Bindhu, K., 2013. Effect of Azolla extract on growth performance of *Pisum sativum*. Biol. Sci. 2, 88–90.
5. Bleakley, S., Hayes, M., 2017. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. Foods 6(5), 33. https://doi.org/10.3390/foods6050033.
6. Boye, M.A.D., Groga, N., Kotchi, V., Doriane, A., 2018. Influence of biofertilizers (*Azolla filiculoides* and Compost) on the growth and productivity of two varieties of pepper (*Capsicum Annum*) in the locality of Daloa. IJISET. 5, 86–93.
7. Brouwer, P., 2017. Turning the aquatic weed Azolla into a sustainable crop. PhD Thesis, Utrecht University, The Netherlands.
8. Brouwer, P., Schluepmann, H., Nierop, K.G.J., Elderson, J., Bijl, P.K., van der Meer, I., de Visser, W., Reichart, G. J., Smeekens, S., van der Werf, A., 2018. Growing Azolla to produce sustainable protein feed: the effect of differing species and CO_2 concentrations on biomass productivity and chemical composition. J. Sci. Food Agric. 98, 4759–4768. https://doi.org/10.1002/jsfa.9016.
9. Bund, S. and Norre, J. 2011. Seaweed extract improve cherry fruit quality. Aphc. Aushs. Nziash. Joint. Con., Lorn, Australia. 18–22.
10. Buyel, J. F., Twyman, R.M., Fischer, R., 2015. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. Biotechnol. Adv. 33, 902–913. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.010.
11. Carrapiço, F. 2010. Azolla as a superorganism. Its implication in symbiotic studies. In: Seckbach, J., Grube, M. (Eds.), Symbioses and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, vol 17. Springer, Dordrecht. pp. 225–241. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0-11.
12. Cary, P.R., Weerts, P.G., 1992. Growth and nutrient composition of *Azolla pinnata* R. Brown and *Azolla filiculoides* Lamarck as affected by water temperature, nitrogen and phosphorus supply, light intensity and pH. Aquat. Bot. 43, 163–180.
13. Chen, J., Huang, M., Cao, F., Pardha-Saradhi, P., Zou, Y., 2017. Urea application promotes amino acid metabolism and membrane lipid peroxidation in Azolla. PlosOne. 12, 185–230.
14. Cheng, W., Sakai, H., Matsushima, M., Yagi, K., Hasegawa, T., 2010. Response of the floating aquatic fern *Azolla filiculoides* to elevated CO_2, temperature, and phosphorus levels. Hydrobiologia 656, 5–14.
15. Colavita, G.M., Spera, N., Blackhall, V., Sepulveda, G.M., 2011. Effect of seaweed extract on pear fruit quality and yield. Acta Horti. 909, 601–608. https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.909.72.
16. Datta, S. N., 2011. Culture of Azolla and its efficacy in diet of Labeo rohita. Aquaculture 310, 376–379. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.008.
17. Delnavaz, B., Azimi, A., 2009. Alien and exotic Azolla in northern Iran. AJB. 8, 187–190.
18. EL-Shimi, N., El-Badawy, E., Tolba, H., 2015 . Response of sweet pepper plants to some organic and bio-fertilizers and its effect on fruit yield and quality. Middle East J. Agric. Res. 4, 435–445.
19. Farahpour-Haghani, A., Hassanpour, M., Alinia, F., Nouri-Ganbalani, G., Razmjou, J., Agassiz, D., 2017. Water ferns Azolla spp. (*Azollaceae*) as new host plants for the small China-mark moth, Cataclysta lemnata (Linnaeus, 1758) (*Lepidoptera, Crambidae, Acentropinae*). Nota Lepidopterologica 40, 1–13. https://doi.org/10.3897/nl.40.10062.
20. Hanafy, A., El-Emary, G. A. E., 2018. Role of *Azolla pinnata* biofertilizer extract in producing healthy tomatoes. Asian J. Chem. 3, 1–8. https://doi.org/10.9734/ajrb/2018/v3i329832.
21. Handajani, H., 2012. Optimation of nitrogen and phosphorus in Azolla growth as biofertilizer. Makara J. Technol. 15, 142–146.
22. Hill, M.P., McConnachie, A.J., 2009. *Azolla filiculoides Lamarck* (*Azollaceae*). In: Muniappan, R., Reddy, G.V.P., Raman, A. (Eds.), Biological Control of Tropical Weeds Using Arthropods. Cambridge: Cambridge University Press,

pp. 74–87. https://doi.org/10.1017/CBO9780511576348.005
23. Hussner, A., Weyer, K., Gross, E., Hilt, S., 2010. Comments on increasing number and abundance of non-indigenous aquatic macrophyte species in Germany. Weed Res. 50, 519–526. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2010.00812.x.
24. Katole, S. B., Lende, S. R., Patil, S. S., 2017. A review on potential livestock feed. Int. J. Livest. Res. 05, 01–09.
25. Khoshravesh, R., Akhani, H., Eskandari, M., Greuter, W., 2009. Ferns and fern allies of Iran. Rostaniha, 10(Supplement 1), pp. 1–130.
26. Kitoh, S., Shiomi, N., Uheda, E., 1992. Free amino acids and ammonia in the *Azolla-Anabaena* association grown with N_2, NH_4^+, and NO_3^-. J. Soil Sci. Plant Nutr. 38, 289–296.
27. Kitoh, S., Shiomi, N., Uheda, E., 1992. Free amino acids and ammonia in the *Azolla-Anabaena* association grown with N_2, NH_4^+, and NO_3^-. J. Soil Sci. Plant Nutr. 38, 289–296.
28. Kouzuma, T., Uemastu, Y., Usami, T., Imamura, S., 2004. Study of glycated amino acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method. Clin. Chim. Acta. 346, 135–143.
29. Kushari, D., Watanabe, I., 1992. Differential responses of azolla to phosphorus deficiency: II. Screening method under concentration controlled conditions. Soil Sci. Plant Nutr. 38, 65–73.
30. Macartain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R., 2007. Special article nutritional value of edible seaweeds. Nutr. Rev. 65, 535–543. https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535.
31. Pereira, A.L., Carrapico, F., 2009. Culture of *Azolla filiculoides* in artificial conditions. Plant Biosyst. 143, 431–434. https://doi.org/10.1080/11263500903172110.
32. Peters, G.A., Meeks, J.C., 2003. The Azolla-Anabaena symbiosis: basic biology. Ann. Rev. Plant Biol. 40, 193–210. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001205.
33. Plessner, O.E., Chen, Y., Shenker, M., Tel-Or, E., 1998. Iron-enriched Azolla as a slow-release biofertilizer for cucumber plants grown in a hydroponic system. J. Plant Nutr. 21, 2357–2367. https://doi.org/10.1080/01904169809365569.
34. Rai, A.K., Rai, V., 2003. Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogenase activity of *Azolla pinnata–Anabaena azollae*. Plant Sci. 164, 61–69.
35. Rai, V., Sharma, N.K., Rai, A.K., 2006. Growth and cellular ion content of a salt-sensitive symbiotic system *Azolla pinnata–Anabaena* azollae under NaCl stress. J. Plant Physiol. 163, 937–944.
36. Raja, W., Rathaur, P., John, S. A., Ramteke, P. W., 2012. Azolla: an aquatic pteridophyte with great potential. Int. J. Res. Biol. Sci, 2(2), pp.68–72.
37. Rajaie, M., Tavakoly, A.R., 2018. Iron and/or acid foliar spray versus soil application of Fe-EDDHA for prevention of iron deficiency in Valencia orange grown on a calcareous soil. J. Plant Nutr. 41, 150–158.
38. Raoof, B., Kaushik, B.D., Prasanna, R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass Bioenergy 30, 537–542. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.09.006.
39. Rathore, S., Chaudhary, D., Boricha, G., Ghosh, A., Bhatt, B., Zodape, S., Patolia, J., 2009. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. S. Afr. J. Bot. 75, 351–355.
40. Richardson, A. E., Simpson, R. J., 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. Plant Physiol. 156, 989–996.
41. Richerson, P., Grigarick, A., 1967. The life history of *Stenopelmus rufinasus* (*Coleoptera: Curculionidae*). Ann. Entomol. Soc. Am. 60, 351–354. https://doi.org/10.1093/aesa/60.2.351.
42. Römheld, V., 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. J. Plant Nutr. 23, 1629–1643.
43. Sadegh Kasmaei, L., Yasrebi, J., Zarei, M., Ronaghi, A., Ghasemi, R., Saharkhiz, M.J., Ahmadabadi, Z., Schnug, E., 2019. Influence of plant growth promoting rhizobacteria, compost, and biochar of Azolla on rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growth and some soil quality indicators in a calcareous soil. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 50. 119–131.
44. Setiawati, M. R., Damayani, M., Herdiyantoro, D., Suryatmana, P., Anggraini, D. and Khumairah, F. H., 2018. The application dosage of *Azolla pinnata* in fresh and powder form as organic fertilizer on soil chemical properties, growth and yield of rice plant. AIP Conf Proc. https://doi.org/10.1063/1.5021210.
45. Silva, P., Silva, H., 2007. Effect of mineral nutrients on cell growth and self-flocculation of *Tolypothrix tenuis* for the production of a biofertilizer. Bioresour. Technol. 98, 607–611.
46. Singh, P.K., 1977. Azolla plants as fertilizer and feed. Indian farming.
47. Taha, N., El-Shahat, R., 2017. Influence of Azolla, some blue green algae strains and humic acid on soil, growth, productivity, fruit quality and storability of Canino apricot cultivar grown under clay loamy soil. Int. J. Plant Prod. 8, 1–11.
48. Tejaswini, G.S., Mahadevakumar, S., Janardhana, G.R., 2015. Effect of *Azolla pinnata* on seed germination, vigour index, biomass and yield of french bean (*Phaseolus vulgaris*). Curr. Agric. Res. 3, 137–141. http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.3.2.07.
49. Temmink, R.J., Harpenslager, S.F., Smolders, A.J., van Dijk, G., Peters, R.C., Lamers, L.P., van Kempen, M.M., 2018. Azolla along a phosphorus gradient: biphasic growth response linked to diazotroph traits and phosphorus-induced iron chlorosis. Sci. Rep. 8, 1–8.

50. Wagner, G.M., 1997. Azolla: a review of its biology and utilization. Bot. Rev. 63, 1–26.
51. Witt, A., Luke, Q., 2017. Guide to the naturalized and invasive plants of Eastern Africa. CABI. https://doi.org/10.1079/9781786392145.0000.
52. Wright, R.J., Stuczynski, T., 1996. Atomic absorption and flame emission spectrometry. In: Helmke, P.A., Johnston, C.T., Loeppert, R.H., Page, A.L., Soltanpour, P.N., Sparks, D.L., Sumner, M.E., Tabatabai, M.A (Eds.), Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods. SSSA/ASA, Madison, WI, USA, pp. 65–90.