

اثرات کلات آهن و نانوذرات اکسید آهن بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

مهری عسکری^{۱*}، فریبا امینی^۱، سید مهدی طالبی^۱، معصومه شفیعی گواری^۲

۱. استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک.

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۲۶

چکیده

آهن یک عنصر کم‌مصرف مغذی و ضروری برای رشد گیاهان است که در متابولیسم گیاهان نقش مهمی را ایفا می‌کند. به منظور بررسی اثرات کمبود آهن و سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ میکرومولار) در مقایسه با کلات آهن بر رشد برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه یونجه رقم همدانی، آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشگاه اراک سال ۱۳۹۴ انجام شد. تیمار آهن بر پارامترهای رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی اثر مثبت داشت. بیشترین و کمترین مقدار رشد برگ و رنگیزه‌های فتوسنتزی به ترتیب در سطح ۲۵ و صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن به دست آمد. تیمار نانو کود آهن در غلظت‌های مختلف، حتی غلظت ۵ میکرومولار، سبب افزایش معنی‌دار رشد برگ و مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی در مقایسه با کلات آهن شد. بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها و پرولین در غلظت صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن اندازه‌گیری شد؛ بنابراین غلظت صفر آهن برای گیاه یونجه تنش محسوب می‌شود. هیچ اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن و کلات آهن بر اساس مقادیر پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها وجود نداشت؛ بنابراین نوع مناسب کود آهن برای گیاه یونجه نانو کود آهن است و غلظت ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن مقدار مطلوب و بهینه است.

واژه‌های کلیدی: پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، کمبود آهن، نانو کود.

مقدمه

بیش از حد متراکم شود می‌تواند باعث آسیب سلولی گردد. از طرفی به مقدار خیلی کم در آب محلول است، به‌ویژه در محیط‌هایی که خوب هوادهی شوند. در این محیط‌ها تولید هیدروکسیدهای آهن و دیگر نمک‌های آهن‌دار را می‌دهد که حلالیت آهن را کمتر می‌کند؛ بنابراین باوجودی که بیشتر خاک‌ها آهن دارند ولی آهن در دسترس گیاه قرار نمی‌گیرد و کمبود آهن در گیاهان ایجاد می‌شود. از طرفی تجمع و انباشت زیاد آهن نیز ایجاد تنش اکسیداتیو می‌کند؛ بنابراین سیستم‌های جذب آهن بایستی طوری تنظیم شوند تا هموستازی آهن برقرار باشد. هموستازی آهن یعنی امکان تنظیم سیستم‌های ورود آهن به درون گیاهان، زمانی که

یونجه (*Medicago sativa*) از مهم‌ترین محصولات علوفه‌ای تیره لگوم است که دارای محصول بالا، توانایی تثبیت نیتروژن و حجم بالای پروتئین است. به دلیل سیستم ریشه‌ای عمیق و گسترده، فرسایش خاک را کاهش و نفوذ آب در زمین‌های کشاورزی را بهبود می‌دهد (Delic et al., 2013).

گیاهان در بین همه‌ی ریزمغذی‌ها، بیشترین نیاز را به آهن دارند. کلروپلاست‌ها مهم‌ترین حفره‌های جذب آهن هستند. آن‌ها برای انجام فرآیندهای سوخت‌وساز مانند فتوسنتز، انتقال الکترون، سنتز زیستی کلروفیل و سنتز ترکیبات آهن-گوگردار به آهن نیاز دارند. آهن دارای دو ویژگی شیمیایی متمایز است: بسیار واکنش‌پذیر است و اگر

آزمایش بررسی تأثیر دو نوع مختلف تیمار آهن (کلات آهن و سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن) بر رشد، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه یونجه به‌منظور تعیین نوع مؤثرتر کود آهن و همچنین تعیین غلظت مطلوب و بهینه نانو کود آهن برای گیاه یونجه است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه اراک بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. بذر گیاه یونجه اکوتیپ همدانی (*Medicago sativa* cv. Hamedani) از مرکز تحقیقات سازمان جهاد کشاورزی شهر اراک تهیه شد. به‌منظور کشت این بذرها ابتدا ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند (Wang and Oyaizu, 2009). نانوذرات اکسید آهن Fe_2O_3 از شرکت پیشگامان نانو مواد مشهد تهیه شد. برای آماده نمودن نانوذرات اکسید آهن هر بار ۰/۱۶ گرم از این ماده را با آب مقطر دو بار تقطیر در بالن ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت در دستگاه اولتراسونیک با توان ۱۰۰w و فرکانس ۴۰kHz قرار داده شد (اولتراسونیک نانو مواد را پخش می‌کند). سپس به‌منظور حل کردن نانوذرات داخل آن مگنت قرار داده و به مدت ۴ ساعت روی شیکر گذاشته تا نانو مواد دوباره به هم نچسبند. در استفاده از نانوذرات بایستی توجه شود که در همه مراحل مخلوط به شکل سوسپانسیون باشد (Prasad et al., 2012). بذرها یونجه بر روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش‌های جداگانه به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. سپس گیاهک‌های یک‌روزه به گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴×۱۲ سانتی‌متر حاوی پرلیت منتقل شدند. در هر گلدان ۱۵ گیاهک قرار گرفت. گلدان‌ها در اتاق رشد با شرایط کنترل‌شده دوره نوری فتوپریود ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۲۵ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد به هنگام روز و شب قرار گرفتند. آبیاری هر هفته با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند کامل (حاوی کلات آهن) (Hoagland and Arnon, 1950) و محیط هوگلند فاقد کلات آهن و محتوی سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار) به مدت ۴۵ روز انجام شد (Dokhe et al., 2013). شاهد (صفر نانو) هیچ آهنی در کل دوره دریافت نکرد.

سیستم‌های خروج آهن و مکانیسم‌های مربوطه آسیب‌دیده است. فراوانی آهن در بافت‌های گیاهی با بالا رفتن واکنش‌های فنتون که منجر به تولید مقادیر بالایی از رادیکال آزاد سمی هیدروکسیل و دیگر اشکال اکسیژن آزاد می‌شود، همراه است (Vigani, 2012). علائم مشخص سمیت آهن با فرآیندهای تولید رادیکال‌های آزاد، اکسید شدن کلروفیل و به‌خصوص تجمع پلی‌فنول‌های اکسیدشده مرتبط است. برای کاهش سمیت فلز در گیاهان، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی به‌عنوان مکانیسم تحمل بررسی می‌شوند (Apel and Hirt, 2004).

یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری نانو، استفاده از نانو کودها جهت تغذیه گیاهان است. نانو کودها با رهاسازی تدریجی و آرام عناصر غذایی بهترین جایگزین برای کودهای مرسوم هستند. با بهره‌گیری از نانو کودها، عناصر غذایی به‌آرامی و با سرعتی مناسب در تمام فصل رشد گیاه آزاد می‌شود و به دلیل کاهش آبخش، گیاهان قادر به جذب بیشتر عناصر خواهند بود و آلودگی‌های زیست‌محیطی کاهش می‌یابد (Chinnamuthu and Boopathi, 2009). از طرفی در نانو کود آهن نسبت آهن Fe^{2+} به آهن Fe^{3+} افزایش یافته که از نتایج آن می‌توان به افزایش سنتز کلروفیل اشاره کرد (Roosta et al., 2015). همچنین نانوذرات اکسید آهن در محدوده $pH < 3$ در آب محلول هستند. مقدار مناسب نانو کودها که بایستی به خاک افزوده گردد به گونه گیاهی، بافت خاک، مقدار مواد آلی خاک و آهکی بودن خاک بستگی دارد (Mazaherinia et al., 2010). تأثیر مثبت مواد غذایی نانو بر رشد بادام‌زمینی (Prasad et al., 2012) و ریحان (Peyvandi et al., 2011) گزارش شده است. نتایج حاصل از مطالعه انجام‌شده روی گیاه *Ocimum basilicum* که در معرض غلظت‌های مختلفی از کود کلات آهن (۱/۵، ۴/۵ و $7/5 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) و نانو کود کلات آهن (۱، ۳ و $5 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) قرار گرفت نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز و پراکسیداز در گیاهانی که تحت تیمار نانو کود آهن قرار گرفتند در مقایسه با شاهد و گیاهان تحت تیمار غلظت‌های مختلف کود آهن کاهش معنی‌داری را نشان داد (Peyvandi et al., 2011). در آزمایشی گلخانه‌ای، کاربرد پودر نانو اکسید آهن نسبت به اکسید آهن معمولی افزایش معنی‌دار غلظت آهن گیاه، طول سنبله، ارتفاع گیاه، وزن دانه در سنبله، وزن خشک کل، وزن هزار دانه و وزن دانه گندم داشته است (Mazaherinia et al., 2010). هدف از این

مطابق جدول ۳ کمترین و بیشترین وزن تر و خشک برگ به ترتیب در گیاهان شاهد (صفر آهن) و گیاهان تحت تیمار ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن مشاهده می‌شود. کلات آهن و سطوح مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن سبب افزایش ۱/۵۹، ۲/۱۷، ۲/۴۷، ۳/۰۶ و ۳/۳۵ برابری وزن تر برگ نسبت به شاهد شد. افزایش وزن خشک برگ در تیمارهای فوق به ترتیب ۱/۶۳، ۲/۳۱، ۲/۵، ۳/۱۳ و ۳/۴۴ برابر وزن خشک شاهد اندازه‌گیری شد. افزایش شاخص‌های وزنی فوق نسبت به شاهد حتی در حضور ۵ میکرومولار نانوذرات آهن بیش از کلات آهن است. مشابه این نتایج در گیاه خیار (Pii et al., 2015) گزارش شده است. آهن یک عنصر ضروری برای رشد گیاهان است. آهن برای عملکرد مناسب اغلب فرایندهای متابولیک و آنزیماتیک مربوط به انتقال الکترون، تثبیت نیتروژن، سنتز DNA، سنتز هورمون و دیگر فرایندها ضروری است؛ بنابراین نقش مهمی را در متابولیسم گیاهی بازی می‌کند (Mohamadipoor et al., 2013). از جمله این نقش‌ها می‌توان به انتقال انرژی، شرکت در تنفس نوری، سنتز کلروپلاست (Mazlomi-Mamyandi et al., 2012)، تثبیت نیتروژن و سنتز پروتئین (Gohari and Niyaki, 2010) اشاره کرد. کمبود این عنصر ضروری، رشد و تولیدات گیاهان را محدود می‌کند (Vigani, 2012). کمبود آهن در خاک‌های آهکی که شامل یک سوم کشتزارها است به کاهش معنی‌دار رشد و محصول گیاهان زراعی منجر می‌شود. کاهش ۲۰٪ محصول بادام‌زمینی رشد یافته در خاک‌های آهکی گزارش شده است. این کاهش در برخی گیاهان زراعی مثل گندمیان، لگوم‌ها، سبزی‌ها و درختان میوه می‌تواند از ۲۵٪ هم تجاوز کند (Briat et al., 2015).

با به‌کارگیری نانوکودها به‌عنوان جایگزین کودهای مرسوم، عناصر غذایی کود به‌تدریج و به‌صورت کنترل‌شده در خاک آزاد می‌شود. استفاده از نانو کودها منجر به افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی، کاهش سمیت خاک، به حداقل رسیدن اثرات منفی ناشی از مصرف بیش‌ازحد کود و کاهش تعداد دفعات کاربرد کود می‌شود (Naderi and Abedi, 2012). در مطالعه ذرت مشخص شد که کود عناصر کم‌مصرف از جمله آهن بیشتر در فعالیتهای متابولیکی تأثیرگذار بوده و به‌طور غیرمستقیم با افزایش سرعت رشد گیاه، سطح جذب، دوام برگ و فتوسنتز باعث افزایش وزن خشک گیاه می‌شود (Sajedi and Ardakani, 2008).

در روز برداشت (روز ۴۵م) وزن تر برگ سه گیاه از هر تیمار اندازه‌گیری شد. وزن خشک برگ همان گیاهان با قرار گرفتن به مدت ۲۴ ساعت در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری شد. کلروفیل‌ها به روش آرنون (Arnon, 1994) و کارتنوئیدها به روش لیچنتهالر و ولبورن (Lichtenthaler and Wellburn, 1983) اندازه‌گیری شدند. میزان کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید. جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده گردید.

مقدار کمی آنتی‌اکسیدان‌های کل یعنی I% با آزمون درصد بازدارندگی رادیکال آزاد ۱-آدی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. در این روش از ترکیب رادیکالی پایدار DPPH به‌عنوان معرف استفاده شد. الکترون تک در رادیکال آزاد DPPH یک ماکزیمم جذب قوی در ۵۱۷ nm دارد و رنگ آن بنفش است. زمانی که الکترون تک رادیکال DPPH با یک هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و فرم احیای DPPH-H را تشکیل می‌دهد، رنگ بنفش به رنگ زرد تبدیل می‌شود. از بی‌رنگ شدن رنگ بنفش جهت سنجش مقدار کل آنتی‌اکسیدان‌های یک عصاره استفاده می‌شود (Abe et al., 1998). به‌منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی ابتدا عصاره آنزیمی توسط روش ژیانوپولیتیس و رایس (Giannopolitis and Ries, 1977) تهیه شد و از این عصاره آنزیمی جهت تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD); (CAT; Giannopolitis and Ries, 1977)، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز (Cakmak and Marschner, 1992) و GPOX; Polle et al., 1994) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16، مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و رسم نمودارها با Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس اثر معنی‌دار تیمار آهن بر وزن تر و خشک برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پرولین (سطح ۰/۰۱) و کمیت آنتی‌اکسیدان‌های کل I% (درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH) و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های SOD، CAT و GPOX (سطح ۰/۰۵) را نشان می‌دهد (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱. نتایج آنالیز واریانس تیمار آهن بر وزن تر و خشک برگ و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه یونجه.

Table 1. ANOVA results of iron treatment on leaf fresh and dry weight and photosynthesis pigments in alfalfa.

Source of variation	منابع تغییر	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares					
			وزن برگ Leaf weight		کلروفیل Chlorophyll		Carotenoid کارتنوئید	
			Fresh تر	Dry خشک	a	b		Total
Iron treatment	تیمار آهن	5	0.066**	0.001**	7.77**	4.69**	24.45**	4.101**
Error	خطا	12	0.4×10^{-3}	1.5×10^{-5}	0.018	0.018	0.045	0.026
CV%	ضریب تغییرات		5.16	10.24	2.53	5.53	2.74	7.42

ns, * and ** non-significant, significant at probability levels of 5% and 1%, respectively. * and ** به ترتیب عدم معنی‌دار، و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس تیمار آهن بر میزان پرولین، کمیت آنٹی‌اکسیدان‌های کل ۱% و فعالیت آنٹی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز گیاه یونجه.

Table 2. ANOVA results of iron treatment on proline, superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOX), catalase (CAT) and percent of inhibition of DPPH radical (1%) in alfalfa.

Source of variation	منابع تغییر	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares				
			پرولین Prolin	سوپراکسید دیسموتاز SOD	گایاکول پراکسیداز GPOX	کاتالاز CAT	I%
			Iron treatment	تیمار آهن	5	0.001**	7.00*
Error	خطا	12	8.2×10^{-6}	1.75	1.25	0.504	3.34
CV%	ضریب تغییرات		23.11	4.4	12.62	42	15

ns, * and ** non-significant, significant at probability levels of 5% and 1%, respectively. * and ** به ترتیب عدم معنی‌دار، و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف آهن (کلات آهن Fe-EDTA، ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن) بر وزن تر برگ و وزن خشک برگ (گرم) گیاه ۴۵ روزه یونجه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. هر داده میانگین سه تکرار \pm SE است.

Table 3. Mean comparison of effects of iron treatment (Fe-EDTA, 0, 5, 10, 20 and 25 μ M Fe₂O₃ nanoparticles) on leaf fresh weight (LFW) and leaf dry weight (LDW) of alfalfa (45 days). Similar letters mean non-significant based on Duncans test. Each data are the means of 3 replicate \pm SE.

شاخص Index	تیمار آهن Fe-treatment					
	Fe-EDTA	Fe ₂ O ₃ nanoparticles				
		0 μ m	5 μ m	10 μ m	20 μ m	25 μ m
وزن تر برگ LFW (g)	0.27 ^e \pm 0.01	0.17 ^f \pm 0.06	0.37 ^d \pm 0.01	0.42 ^c \pm 0.01	0.52 ^b \pm 0.05	0.57 ^a \pm 0.01
وزن خشک برگ LDW (g)	0.026 ^d \pm 0.002	0.016 ^e \pm 0.005	0.037 ^c \pm 0.001	0.043 ^b \pm 0.001	0.05 ^a \pm 0.003	0.055 ^a \pm 0.002

دهد. کمترین و بیشترین شاخص‌های فوق به ترتیب در شاهد و غلظت ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. کلروفیل a در سطوح کلات آهن، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار

مطابق شکل (۱) با افزایش سطح آهن میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدهای گیاهان یونجه نسبت به شاهد (صفر آهن) افزایش معنی‌داری را نشان می

است که جایگزینی کود آهن تهیه‌شده با فناوری نانو در مقایسه با کودهای آهن رایج در غلظت مناسب یا حتی کمتر می‌تواند سبب افزایش رشد گیاه ریحان شود (Bakhtiari et al., 2015). از نظر محققین استفاده از نانوذرات اکسید آهن در گیاهان کارآمدتر از کودهای معمولی است. احتمالاً خصوصیات ذرات نانو، حلالیت بیشتر ذرات نانو و سطح تماس بیشتر ذرات نانو با ریشه گیاهان علت این امر است (Ranjbar and Shams, 2009). در مطالعه بر روی گندم مشاهده شد تیمار آهن باعث افزایش معنی‌دار حجم کلروفیل کل، نشاسته و پروتئین شده است (Armin et al., 2014).

بیشترین مقدار پرولین در گیاهان تحت غلظت صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن (گیاهان شاهد) مشاهده شد. با کاربرد آهن مقدار پرولین نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد به طوری که در حضور کلات آهن، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن مقدار پرولین نسبت به شاهد کاهش ۸۵/۳۶٪، ۸۲/۶۸٪، ۸۴/۶۳٪، ۸۴/۱۴٪ و ۸۲/۴۳٪ را نشان می‌دهد. بین سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن و کلات آهن در خصوص مقدار پرولین تغییر معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (شکل ۱).

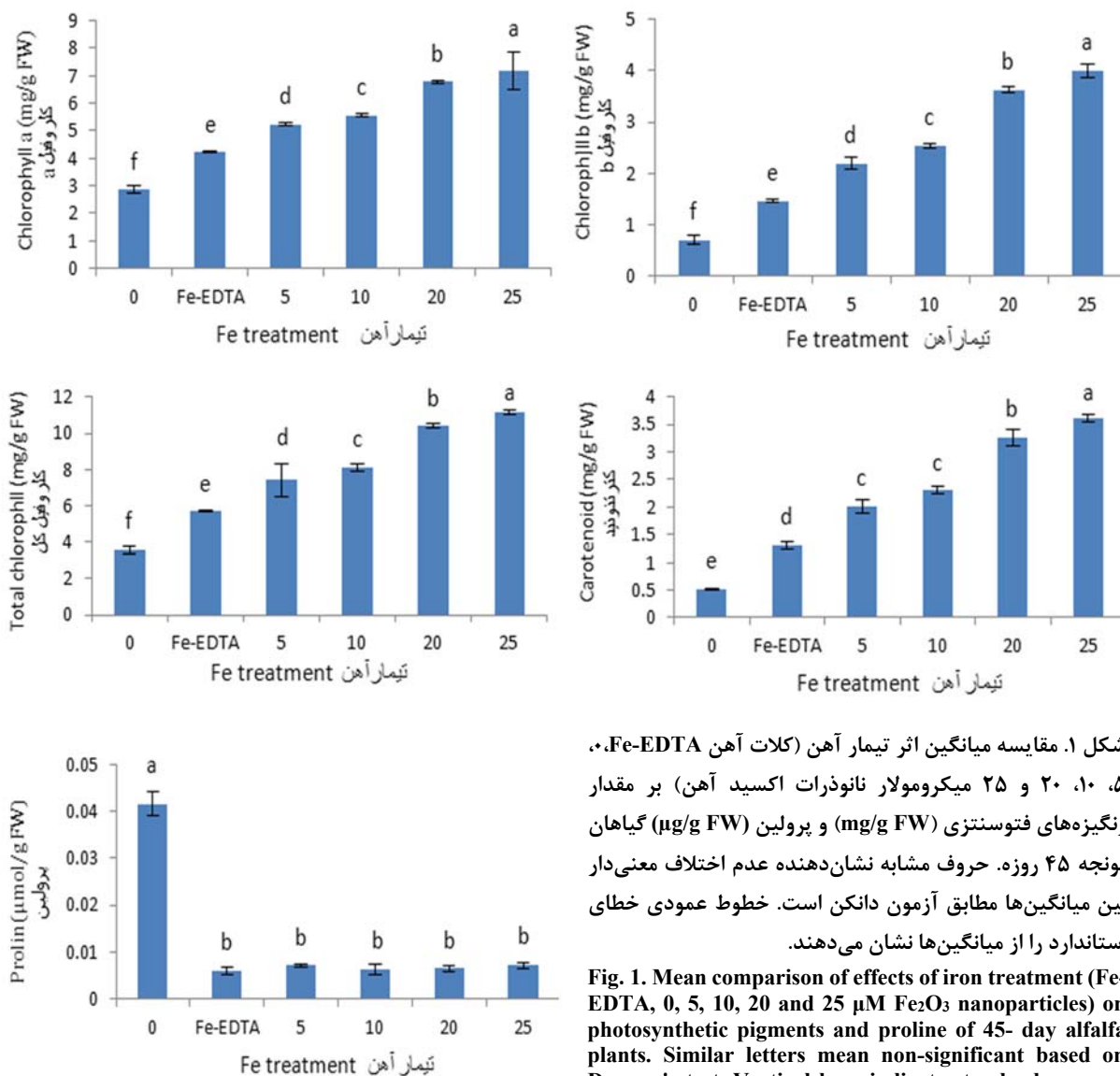
نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین به هنگام تنش ارائه شده است. پرولین نقش کلیدی در تنظیم اسمزی و حفاظت غشای سلولی و آنزیم‌های سیتوپلاسمی دارد. پرولین از طریق جذب رادیکال‌های آزاد نقش خود را ایفا می‌کند (Bybordi, 2012). بدین ترتیب می‌تواند سبب مقاومت گیاه به تنش‌ها شود (Vendruscolo et al., 2007). پرولین در آب حلالیت بالایی دارد و در غلظت‌های بالا، اختلالی در فعل‌وانفعالات مربوط به ماکرومولکول‌های محلول ایجاد نمی‌کند (Ashraf and Foolad, 2007). پرولین از دو ماده گلوتامات و اورنیتین تولید می‌شود. افزایش تولید پرولین نوعی راهبرد تنظیم اسمزی است که می‌تواند منجر به کاهش رشد گیاه شود (Mirza Masoumzadeh et al., 2012). در گیاهان تحت غلظت صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن افزایش معنی‌دار میزان پرولین نسبت به گیاهان تحت غلظت‌های مختلف آهن (کلات آهن یا نانوذرات) مشاهده شد. از آنجاکه در اکثر گیاهان میزان پرولین طی تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد (Tan et al., 2008)، پس فقدان آهن برای گیاه یک تنش محسوب می‌شود و هیچ‌یک از غلظت‌های نانوذرات اکسید آهن بکار رفته در این تحقیق برای گیاه یونجه تنش نبوده است. در مطالعه ۵۱ واریته برنج

نانوذرات اکسید آهن به ترتیب افزایش ۱/۴۷، ۱/۸۳، ۱/۹۵، ۲/۳۷ و ۲/۵۱ برابری نسبت به شاهد نشان داد. کلروفیل *b* در همان تیمارها به ترتیب افزایش ۲/۰۷، ۳/۰۹، ۳/۵۸، ۵/۰۹ و ۵/۶۳ برابری نسبت به کلروفیل *b* شاهد داشتند. افزایش کلروفیل کل نسبت به شاهد در تیمارهای فوق به ترتیب ۱/۵۹، ۲/۰۸، ۲/۲۸، ۲/۹۲ و ۳/۱۳ برابر شد. همچنین در مورد کارتنوئیدها هم در سطوح کلات آهن، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات آهن افزایش ۲/۵، ۳/۸۸، ۴/۴۲، ۶/۲۷ و ۶/۹۶ برابری نسبت به شاهد مشاهده شد. این افزایش رنگیزه‌ها حتی در حضور ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن بیش از کلات آهن است. همچنین افزایش کارتنوئیدها در تمامی تیمارها بیش از کلروفیل‌ها است.

کمبود یا فعالیت کم آهن در گیاه باعث می‌شود که کلروفیل در مقادیر کافی تولید نشود و برگ‌ها رنگ‌پریده شوند (Mohamadipoor et al., 2013). کاهش کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود. بدون کلروفیل کافی، برگ‌ها قادر به تولید ترکیبات فتوسنتزی موردنیاز برای رشد و نمو نیستند. این امر موجب کاهش رشد می‌شود. در بعضی موارد کاهش فتوسنتز ناشی از کاهش کلروفیل سبب بازدارندگی کامل از تشکیل برگ‌های جدید و در نتیجه کاهش محصول گیاه می‌شود (Mohamadipoor et al., 2013). آهن در فرآیندهای اکسیداسیون و احیا نقش دارد و با تغییر ظرفیت سبب انتقال الکترون می‌شود که این نقش در متابولیسم گیاهی بسیار مهم است. وجود آهن در سنتز پروتئین لازم است و از آنجایی که نقش عمده آهن در سنتز پروتئین‌های همراه کلروفیل است کمبود آن ساختار کلروپلاست و میزان فتوسنتز را کاهش می‌دهد (Briat et al., 2015) که به همین علت رنگ زرد ناشی از کمبود آهن (کلروز) رخ می‌دهد. راندمان فتوسنتز و ساختار و عملکرد دستگاه فتوسنتزی به شدت به آهن وابسته است. اگر آهن به مقدار کافی و قابل جذب، در دسترس گیاه نباشد تولید کلروفیل در برگ کاهش می‌یابد. آهن در ساختمان سیتوکروم به‌عنوان ناقل الکترون در سیستم‌های فتوسنتزی برای تنفس و عملیات اکسیداسیون و احیا و ساخت کلروفیل دخالت دارد. کلروپلاست‌ها حاوی ترکیبات متعدد حاوی آهن هستند، پروتئین‌هایی شامل ترکیبات همی مانند سیتوکروم‌ها، P450، پروتئین‌های حاوی آهن (2Fe-2S) این ترکیبات در چرخه انتقال الکترون دستگاه فتوسنتزی و واکنش‌های ردوکس شرکت دارند (Briat et al., 2015). آزمایش‌ها نشان داده

مقدار کل پرولین و فنول در کمبود آهن افزایش معنی‌داری را نشان داد (Rout et al., 2014).

تحت غلظت‌های مختلف آهن، اثر سمیت آهن بررسی شد و ارقام مقاوم و حساس مشخص شدند. نتایج نشان داد که ۲۴ رقم برنج موردبررسی حساس بودند و در این ارقام حساس



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر تیمار آهن (کلات آهن Fe-EDTA، ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن) بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی (mg/g FW) و پرولین (μg/g FW) گیاهان یونجه ۴۵ روزه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. خطوط عمودی خطای استاندارد را از میانگین‌ها نشان می‌دهند.

Fig. 1. Mean comparison of effects of iron treatment (Fe-EDTA, 0, 5, 10, 20 and 25 μM Fe₂O₃ nanoparticles) on photosynthetic pigments and proline of 45-day alfalfa plants. Similar letters mean non-significant based on Duncan's test. Vertical bars indicate standard error of the means (SE).

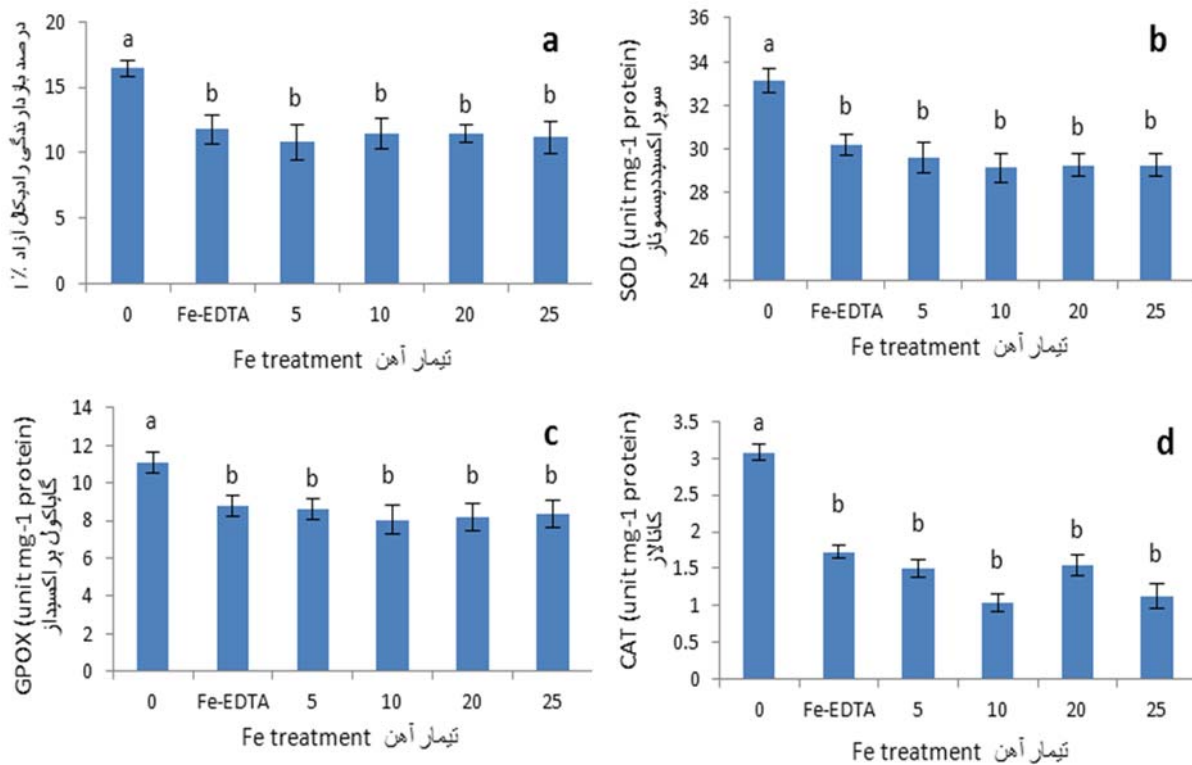
سطوح مختلف آهن اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (شکل ۲).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD (۳۳/۱۲ unit mg⁻¹ protein)، گایاکول پراکسیداز CAT (۳/۰۸ unit mg⁻¹ protein) و کاتالاز (۱۱/۱۲ unit mg⁻¹ protein) در گیاهان شاهد (صفر آهن) مشاهده شد

بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH یعنی I% در گیاهان شاهد (صفر آهن) مشاهده شد. در حضور آهن (فرم کلات آهن یا نانوذرات اکسید آهن) توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرد. بیشترین کاهش I%، در تیمار ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن با ۳۴/۴۲ درصد کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد. بین

و ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن به ترتیب ۴۴/۱۵٪ و ۵۱/۲۹٪ کاهش را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. در گیاهان تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن و کلات آهن تغییر معنی‌داری در فعالیت SOD، GPOX و CAT نسبت به گیاهان شاهد (صفر آهن) مشاهده نمی‌شود.

(شکل ۲). با کاربرد تنها ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن فعالیت آنزیم SOD در گیاه یونجه نسبت به شاهد کاهش ۱۰/۵۳ درصدی را نشان می‌دهد. کلات آهن و غلظت ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن میزان فعالیت آنزیم GPOX را به ترتیب ۲۰/۹۷٪ و ۲۲/۵۰٪ نسبت به شاهد کاهش دادند. میزان فعالیت آنزیم CAT با کاربرد کلات آهن



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر تیمار آهن (کلات آهن Fe-EDTA، صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن) بر (a) درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH (I/I)، فعالیت آنزیمی (b) سوپراکسید دیسموتاز SOD، (c) گایاکول پراکسیداز GPOX و (d) کاتالاز CAT گیاهان یونجه ۴۵ روزه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. خطوط عمودی خطای استاندارد SE را از میانگین‌ها نشان می‌دهد

Fig. 2. Mean comparison of effects of iron treatment (Fe-EDTA, 0, 5, 10, 20 and 25 μ M Fe₂O₃ nanoparticles) on I/I (a), SOD (b), GPOX (c) and CAT (d) of 45-day alfalfa plants. Similar letters mean non-significant based on Duncan's test. Vertical bars indicate standard error of the means (SE).

ابزاری جهت مقابله با تنش، تحمل تنش و سازش به شرایط تنشی محیط و بنابراین بقاء گیاه در برابر تنش است (Vasconsuelo and Boland, 2007). متابولیت‌های ثانویه نقش اصلی را در سازش گیاهان به تغییرات محیطی و تنش‌ها فراهم می‌کنند. سیستم دفاعی گیاهان در برابر ROSها، تولید انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها است (Kosovaa et al., 2011).

تحت شرایط نامساعد محیطی و تنش‌های مختلف، میزان تولید گونه‌های فعال و واکنش‌گر اکسیژن ROS افزایش می‌یابد. ROSها با تخریب نوکلئیک اسیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها، روی بسیاری از جنبه‌های عملکردی سلول‌ها اثر می‌گذارند (Foyer and Noctor, 2005). گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی سازوکارهای متعدد دفاعی دارند. تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه

های مختلف کود آهن کاهش معنی‌داری را نشان داد (Peyvandi et al., 2011).

نتیجه‌گیری

فقدان عنصر ضروری آهن (صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن) به‌عنوان یک تنش غیر زیستی بر کل فرآیندهای رشدی گیاه یونجه اثر منفی گذاشته است. کمترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش فتوسنتز و رشد در غلظت صفر میکرومولار نانوذرات اکسید آهن مشاهده شد. غلظت ۲۵ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن با بیشترین درصد افزایش شاخص‌های رشدی نسبت به شاهد، غلظت مطلوب و بهینه نانوذرات اکسید آهن برای یونجه در نظر گرفته می‌شود. از آنجاکه تحت شرایط نامساعد محیطی و تنش‌های مختلف غیر زیستی میزان تولید گونه‌های فعال و واکنش‌گر اکسیژن ROS افزایش می‌یابد، تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و پرولین از سازوکارهای دفاعی گیاه یونجه در برابر تنش کمبود ریزمغذی آهن است.

قدردانی

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

در این مطالعه گیاهانی که هیچ نوع آهنی دریافت نکرده اند (شاهد) بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز را نشان دادند. در حضور آهن توانایی مهار رادیکال آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرد. در گیاهان تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن تغییر معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدان نسبت به گیاهانی که کلات آهن دریافت کردند مشاهده نمی‌شود. غلظت فلزات نقش مهمی در تعادل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. غلظت بالای فلزات باعث تجمع رادیکال‌های آزاد می‌شود که باعث آسیب به غشا می‌شود (Yadav, 2010). آنتی‌اکسیدان‌ها متابولیت‌های ثانویه هستند که در شرایط نامساعد مانند محدودیت عناصر مغذی تولید می‌شوند (Rose et al., 2015). ترکیبات نانو آهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا به سرعت توسط گیاه جذب می‌شوند و کمبودهای مواد غذایی گیاهان را برطرف می‌کنند؛ بنابراین با کاربرد این مواد شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد می‌شود و از ایجاد هرگونه تنش در گیاه جلوگیری می‌شود (Mohamadipoor et al., 2013). نتایج مطالعه کود کلات آهن و نانو کود کلات آهن بر گیاه *Ocimum basilicum* نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز در گیاهانی که تحت تیمار نانو کود آهن قرار گرفتند در مقایسه با شاهد و گیاهان تحت غلظت

منابع

- Abe, N., Murata, T., Hirota A., 1998. Novel 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62, 661-662.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Plant Biology*. 55, 373-379.
- Armin, M., Akbari, S., Mashhadi, S., 2014. Effect of time and concentration of nano-Fe foliar application on yield components of wheat. *International Journal of Biosciences*. 4(9), 69-75.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24, 1-15.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59, 206-216.
- Bakhtiari, M., Moaveni, P., Sani, B., 2015. The effect of iron nanoparticles spraying time and concentration on wheat. *Biological Forum-An International Journal*. 7(1), 679-683.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 29, 205-207.
- Briat, J. F., Dubos, C., Gaynard, F., 2015. Iron nutrition, biomass production, and plant

- product quality. Trends in Plant Science. 20(1), 33-40.
- Bybordi, A., 2012. Study effect of salinity on some physiologic and morphologic properties of two grape cultivars. Life Science Journal. 9(4), 1092-1101.
- Cakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology. 98, 1222-1227.
- Chinnamuthu, C.R., Boopathi, M.P., 2009. Nanotechnology and agroecosystem. Plant Nutrition and Soil Science. 168, 558-573.
- Delic, D., Stajkovic-Srbincovic, O., Radovic, J., Kuzmanovic, D., Rasulic, N., Simic, A., Knezevic-Vukcevic, N., 2013. Difference in symbiotic N₂ fixation alfalfa, *Medicago sativa* L. cultivars and *Sinorhizobium* spp. strains in field conditions. Romanian Biotechnological Letters. 18(6), 8743-8750.
- Dokhe, S. A., Mahajan. P., Kamble, R., Khanna, A., 2013. Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. Nanotechnology Development. 3(1), 1-5.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostats and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell. 17, 1866-1875.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular. 347, 1-32.
- Gohari, A., Niyaki, A.N., 2010. Effect of iron and nitrogen fertilizers on yield and yield components of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Astaneh Ashrafiyeh, Iran. American-Eurasian Journal Agriculture and Environmental Science. 9(3), 256-262.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1997. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. Plant Physiology. 59, 309-314.
- Kosova'a, K., Vita'mv'sa, P., Pra'sila, I.T., Renautb, J., 2011. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. Proteomics. 74(8), 1301-1322.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extract in different solvents. Biochemical Society Transactions. 11, 591-592.
- Mazaherinia, M.A., Astaraei, R., Fotovat, A., Monshi, A., 2010. Effect of Nano iron oxide particles and on Fe, Mn, Zn, Cu concentrations in wheat plants. World Applied Science. 7(1), 156-162.
- Mazlomi-Mamyandi, M. Pirzad, A. Zardoshti, M.R., 2012. Effect of Nano-iron spraying at varying growth stage of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) on the size of different plant parts. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4 (12), 740-745.
- Mirza Masoumzadeh, B., Imani, A.A., Khayamaim, S., 2012. Salinity stress effect on proline and chlorophyll rate in four beet cultivars. Scholars Research Library. 3(12), 5453-5456.
- Mohamadipoor, R., Sedaghatoor, S., Mahboub-Khomami, A., 2013. Effect of application of iron fertilizer in two methods foliar and soil application on growth characteristics of *Spathyphyllum illusion*. European Journal of Experimental Biology. 3(1), 232-240.
- Naderi, M.R., Abedi, A., 2012. Application of nanotechnology in agriculture and refinement of environmental pollutants. Journal of Nanotechnology. 11(1), 18-26.
- Peyvandi, M., Parande, H., Mirza, M., 2011. Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Ocimum basilicum*. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 4, 89-99. [In Persian with English Summary].
- Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T., Cesco, S., 2015. Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. Plant Physiology and Biochemistry. 87, 45-52.
- Polle, A., Otter, T., Seifert, F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Physiology. 106, 53-56.
- Prasad, T.N.V., Sreeprasad, T.S., Sajanlal, P.R., Pradeep, T., 2012. Effect of nanoscales zinc oxide on the germination, growth and yield of peanut. Journal of Plant Nutrition. 35, 905-927.

- Ranjbar, M. Shams, G.A., 2009. Study of nanotechnology applications. *Sabz Zist*. 3, 28-34. [In Persian].
- Roosta, H. R., Jalali, M., Vakili Shahrabaki, M. A., 2015. Effect of nano-chelate, Fe-Eddha and FeSO₄ on vegetative growth, physiological parameters and some nutrient elements concentration of four varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L) in NFT system. *Journal of Plant Nutrition*. 38(14), 2176-2184.
- Rose, H., Benzon, L., Rosnah, M., Rubenecia, U., Ultra, V., Lee, S.C., 2015. Nano-fertilizer affects the growth, development and chemical properties of rice. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 7(1), 105-117.
- Rout, G.R., Das, A.B., Sahoo, S., 2014. Screening of iron toxicity in rice genotypes on the basis of morphological, physiological and biochemical analysis. *Journal of Experimental Biology Agricultural Science*. 2, 567-582.
- Sajedi, N., Ardakani, M.R., 2008. Effect of different levels of nitrogen, iron and zinc on physiological indices and forage yield of maize (*Zea mays* L.) in Markazi province. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 6(1), 99-110. [In Persian with English Summary].
- Tan, J., Zhao, H., Hoang, J., Han, Y., Li, H., Zhao, W., 2008. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *Agricultural Sciences*. 4, 307-313.
- Wang, Y.X., Oyaizu, H., 2009. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 760-764.
- Vasconsuelo, A., Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172, 861-875.
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pilegg, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Vieira, L.G.E., 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*. 164(10), 1367-1376.
- Vigani, G., 2012. Does a similar metabolic reprogramming occur in Fe-deficient plant cell and animal tumor cells? *Frontiers in Plant Science*. 3, 47-51.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South Africa Journal Botany*. 76, 169-179.