دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال هفتم، شماره بیست و سوم، ۱۳۹۴

تاثیر نانو ذرات اکسید آهن بر جلوگیری از کلروزآهن در پایه نارنج (*Citrus aurantium*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای

سعاد سعیدی[۱]، موسی موسوی[۲]، محمد هادی غفاریان مقرب[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۹

چکیده

کمبود آهن که بیشتر به صورت کلروز در برگ‌های جوان بروز می‌نماید، به عنوان یکی از نارسایی‌های مهم تغذیه‌ای در درختان مرکبات مطرح است و به شدت عملکرد و کیفیت محصول آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. گزینش ترکیبات آهن‌دار مناسب یکی از راهکارهای مهم برای جلوگیری از این مسئله تغذیه‌ای به شمار می‌رود. به همین منظور آزمایشی برای بررسی تاثیر نوع ترکیب آهن شامل FeEDTA، FeEDDHA و دو نوع نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش و با پوشش پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) بدون آهن برای جلوگیری از کم‌سبزینگی پایه نارنج (*Citrus aurantium*) در قالب طرح کاملا تصادفی در۵ تکرار اجرا گردید. بذر پایه نارنج روی محیط کشت MS حاوی ترکیب آهن مختلف کشت گردید. در پایان آزمایش (۲ ماه) صفات رویشی (طول شاخساره و ریشه، تعداد و سطح برگ)، وزن تر و خشک (گیاهچه، ریشه و شاخساره)، میزان کلروفیل، میزان آهن در برگ و درصد کلروز برگ ملاک تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که محیط کشت MS حاوی نانو ذرات بدون پوشش دارای بیشترین اثر معنی دار در سطح آماری یک درصد بر افزایش میزان جذب آهن و کاهش میزان کلروز گیاهچه‌های نارنج رشد یافته در آن بودند. همچنین محیط کشت MS با نانو ذرات آهن دارای بیشترین اثر معنی دار بر افزایش میزان صفات رویشی، وزن تر و خشک و میزان کلروفیل نسبت به شاهد (MS بدون کلات آهن) داشت.

واژه‌های کلیدی: کلات آهن، کمبود آهن، مرکبات، کشت بافت

سعیدی، س.، م. موسوی، و م.ه. غفاریان مقرب. ۱۳۹٤. بررسی تاثیر نانو ذرات اکسید آهن بر جلوگیری از کلروزآهن درپایه نارنج (*Citrus aurantium*) در شرایط درون شیشه ای . مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۲۳: ۲۳۳-۲۲۵.

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران- مسئول مکاتبات. پست الکترونیک: mousa_mousawi@yahoo.com

۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، زنجان، ایران

مقدمه

آهن یک عنصر ضروری برای فرآیندهای متابولیک گیاه است و برای سنتزDNA، فتوسنتز و تنفس ضروری بوده و نقش کلیدی در واکنش‌های سوخت و سازی دارد. (باربرون و همکاران، ۲۰۱۱). آهن به طور مستقیم در بیوسنتز کلروفیل شرکت داشته و برای سنتز پروتوپورفرین که پیش ماده سنتز کلروفیل است ضروری می‌باشد. حدود ٦۰ درصد محتوی آهن برگ، در کلروپلاست می‌باشد از این رو کمبود در مقدار آهن به طور مستقیم بر میزان کلروفیل تاثیر دارد که نهایتا منجر به کلروز می‌شود (بلاکریشان، ۲۰۰۱). کلروز برگ ناشی از کمبود آهن یک نابسامانی تغذیه‌ای گسترده در گیاهان است که می‌تواند نتایج خطیر و جدی برای محصولات کشاورزی به سبب کاهش در عملکرد محصول و خسارت به کمیت و کیفیت میوه داشته باشد (لامباردی و همکاران، ۲۰۰۳). یکی از علائم قابل مشاهده کمبود آهن غلظت کم کلروفیل (کلروز) در برگهای جوان است (فرنادز و همکاران، ۲۰۰۳). در مرکبات مشکلات تغذیه‌ای در ارتباط با pH خاک به عناصر غذایی کم مصرف برمی‌گردد که در میان آنها علائم کمبود آهن چشمگیرتر است. اصلاح کلروز ناشی از کمبود آهن در درختان میوه از جمله مرکبات معمولا بوسیله‌ی کاربرد کلات های آهن ۳ از قبیل FeEDDHA به خاک انجام می‌شود که این عمل هر ساله نیاز به تکرار دارد زیرا آهن در خاک به سرعت غیرمتحرک می‌شود (امیری و شهسوار، ۲۰۰۹). کاربرد کلات‌های آهن راه مناسبی را برای جلوگیری یا بهبود کلروز ناشی از کمبود آهن ارائه نکرده و استفاده از آنها با هزینه بالا و خطرات محیطی در ارتباط است (تاگلیوانی و رمبولا، ۲۰۰۱). تغییراتی که در تکنولوژی کشاورزی به وجود می‌آید عامل اصلی در شکل‌گیری کشاورزی مدرن است. در این میان فناوری نانو نقش مهم و برجسته‌ای را در متحول ساختن کشاورزی و تولید مواد غذایی داشته است. نانوتکنولوژی عبارت از دستکاری دقیق و کنترل شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانومتر به منظور تهیه ریزذراتی با خصوصیات نوظهور و کاربردهای خاص می‌باشد (مینگ یو و همکاران، ۲۰۰۸). بدلیل اندازه‌ی کوچک، نانو ذرات سطح ویژه بسیار وسیعی دارند که باعث افزایش فعالیت شیمیایی آنها می‌گردد. نانوذرات اکسید آهن دارای کاربردهای متنوع در پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشند. به منظور افزایش خواص زیست سازگاری و امکان کاربرد زیستی این نانوذرات پوشش‌های مناسب عامل‌دار شده (ترکیبات آلی و غیر آلی) بر آنها اعمال می‌شوند (محمودی و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجایی که کلروز ناشی از کمبود آهن در درختان میوه از جمله مرکبات باعث کاهش سنتز کلروفیل، سطح برگ، وزن تر و خشک برگ‌ها، رشد ریشه، شاخه‌های جدید و گل آغازی می‌شود (نیجر، ۱۹۹۰) و با توجه به اینکه جلوگیری از کلروز ناشی از کمبود آهن در مرکبات می‌تواند باعث بهبود در کمیت و کیفیت محصول شود و نیز با توجه به مشکلات گفته شده در جذب و تحرک موثر عنصر آهن توسط گیاهان و خصوصیات مواد نانو ساختار، هدف از این تحقیق، بررسی ترکیب‌های موثر درجلوگیری از کلروز ناشی از کمبود آهن از جمله بکار بردن نانوذرات اکسید آهن پوشش دار، بدون پوشش و مقایسه آنها با کلات‌های آهن (FeEDTA[1]) و (FeEDDHA[2]) در محیط کشت درون شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشکده علوم باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. برای انجام این آزمایش بذر میوه‌های پایه نارنج (*Citrus aurantinum*) انتخاب گردید. میوه‌های بالغ و رسیده از پایه های استقرار یافته در مرکز تحقیقات کشاورزی صفی آباد شهرستان دزفول تهیه گردید. میوه‌ها پس از انتقال از باغ به آزمایشگاه در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان بذر گیری و کاشت نگه‌داری شدند.

ضدعفونی میوه‌ها و بذرها: میوه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد برای مدت زمان ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند پس از ضدعفونی سطحی، میوه‌ها به صورت عرضی برش داده شدند و بذرهای درون آنها خارج گردید. برای ضدعفونی سطحی بذرها از هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و پس از آن ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو گردیدند و سپس پوشش‌های خارجی و داخلی بذرها برداشته شد.

استقرار ریزنمونه‌ها روی محیط کشت: ریزنمونه‌ها روی سطح پنج نوع محیط کشت زیر کشت گردیدند.

۱)MS[3]بدون کلات آهن (کشت شاهد)، ۲) MS کامل(با ترکیب آهن Fe_2SO_4 + EDTA[4])، ۳) MS با FeEDDHA[5]به عنوان جایگزین (Fe_2SO_4 + EDTA) (محیط VS[6])، ٤) MS بدون کلات آهن همراه با نانو ذرات

1- Iron ethylene diamine tetra acetate
2- Iron ethylene diaminedio-hydroxyphenyl acetate
1-.Murashige and Skooge 1962
2- Iron ethylene diamine tetra acetate
3-Iron ethylene diaminedio-hydroxyphenyl acetate
4-Vander Salm 1994

اکسید آهن (Fe_3O_4) با پوشش پلی اتیلن گلیکول، ۵) MS بدون کلات آهن همراه با نانو ذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) از نوع بدون پوشش .

میزان خالص آهن در تیمارهای مختلف یکسان بود و براساس میزان آهن خالص موجود در محیط MS کامل (۵/٦ میلی گرم) محاسبه گردید.

به هر کدام از محیط های فوق ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷/۵گرم بر لیتر آگار اضافه شد. pH محیطها قبل از اضافه نمودن آگار به حدود ۵/۷ تنظیم شد.

نگه‌داری کشت‌ها: بذرهای کشت شده روی محیط کشت MS درون شیشه‌ها، در فیتوترون با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا پایان دوره آزمایش (۲ ماه) قرار گرفتند.

شاخص‌هایی اندازه‌گیری شده

صفات رویشی (طول شاخساره، طول ریشه، تعداد برگ و سطح برگ):طول شاخساره و طول ریشه بر حسب سانتی‌متر و با استفاده از خط کش سانتی‌متری، سطح برگ بر حسب سانتی-متر مربع و با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Leaf area meter) اندازه‌گیری شد.

وزن تر و خشک: در تمامی واحدهای آزمایشی وزن تر گیاهچه، شاخساره و ریشه اندازه‌گیری شد. وزن خشک آنها نیز با قرار دادن نمونه ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پس از مدت زمان ٤۸ ساعت اندازه‌گیری شد.

میزان کلروفیل a، b و کل برگ: میزان کلروفیل برگها با استفاده از استون ۸۰٪(روش آرنون ۱۹۷٦) محاسبه گردید.

آهن برگ: برای هضم نمونه گیاهی،به ۰/۱ گرم از نمونه‌های خشک آسیاب شده به ترتیب ٤ میلی لیتر اسید پرکلریک غلیظ، ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ٤ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه شد محلول فوق، در فضای زیر هود و بر روی هیتر با احتیاط جوشانده شد پس از آن حجم محلول را به وسیله آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسانده و برای اندازه‌گیری آهن از دستگاه جذب (Perkin Elmer 2340) استفاده شد. میزان آهن بر حسب میکروگرم بر گرم وزن خشک ماده گیاهی محاسبه شد.

درصد کلروز برگ: درصد کلروز برگها از تقسیم تعداد برگ کلروز نشان داده بر تعداد کل برگهای گیاهچه ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1.1در قالب طرح کاملا تصادفی در۵ تکرار تجزیه و تحلیل و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ و ۵٪ استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثرات نوع ترکیب آهن محیط کشت MS روی صفات رویشی

نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که بین گیاهچه های حاصل از رشد ریز نمونه‌ها درمحیط های MS با انواع منبع آهن بکار رفته در آنها از نظر صفات رویشی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار دارد. مقایسه میانگین نتایج نشان داد که طویل-ترین و کوتاهترین طول شاخساره به ترتیب مربوط به محیط کشت MS حاوی نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش و MS کلات بدون آهن بود. البته اختلاف میانگین بین محیط MS همراه با نانو ذرات آهن پوشش دار و محیط VS معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده از گیاهچه‌ها درمحیط‌های MS حاوی ترکیبات مختلف آهن نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد برگ به ترتیب مربوط به محیط MS همراه با نانو ذرات بدون پوشش و محیط MS بدون کلات آهن بود ولی میانگین تعداد برگ بین MS همراه با نانو ذرات پوشش‌دار و محیط VS اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. مقایسه میانگین سطح برگ در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری بین ترکیبات مختلف آهن و شاهد نشان داد و بیشترین و کمترین سطح برگ به ترتیب مربوط به MS همراه با نانو ذرات آهن بدون پوشش و MS بدون کلات آهن بود (جدول ۱). در رابطه با طول ریشه در سطح احتمال ۱٪ اختلاف میانگین آن در همه محیط ها در مقایسه با شاهد (MS بدون کلات آهن) معنی‌دار شد. طویل‌ترین و کوتاهترین ریشه به ترتیب مربوط به MS همراه با نانو ذرات آهن بدون پوشش و MS بدون کلات آهن بود (جدول۱).

تاثیر نوع ترکیب آهن محیط کشت MS روی وزن تر و خشک

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بین گیاهچه‌های حاصل از رشد ریز نمونه‌ها درمحیط های MS با انواع منبع آهن بکار رفته در آنها از نظر وزن تر و خشک (گیاهچه، شاخساره و ریشه) در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود

داشت. مقایسه میانگین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین وزن تر گیاهچه به ترتیب به محیط MS همراه با نانو ذرات بدون پوشش و محیط MS بدون کلات آهن (کشت شاهد) تعلق دارد (جدول ۲). البته اختلاف میانگین وزن تر گیاهچه در محیط MS همراه با نانو ذرات اکسید آهن پوشش دار و محیط کشت VS معنی دار نشد. بیشترین وزن تر شاخساره به محیط MS همراه با نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش وکمترین آن به محیط های MS کامل و بدون کلات آهن (کشت شاهد) تعلق گرفت. البته وزن تر شاخساره در محیط های حاوی نانو ذرات پوشش دار با محیط VS همچنین محیط MS کامل با محیط بدون آهن (شاهد) اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. بیشترین وزن تر ریشه نیز در محیط همراه با نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش و بدنبال آن محیط با نانو ذرات پوشش‌دار و VS مشاهده شد که اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ولی وزن تر ریشه در محیط همراه با نانو ذرات بدون پوشش کمی بیشتر از دو محیط دیگر بود. بیشترین وزن خشک گیاهچه در MS همراه با نانو ذرات بدون پوشش و کمترین در محیط بدون کلات آهن (کشت شاهد) مشاهده شد ولی اختلاف میانگین بین دو محیط نانو ذرات پوشش دار و محیط VS معنی‌دار نبود. بیشترین وزن خشک شاخساره در محیط های MS همراه با نانو ذرات بدون پوشش، پوشش دار و محیط کشت VS وکمترین آن درمحیط های MS کامل و بدون کلات آهن (کشت شاهد) دیده شد. بیشترین وزن خشک ریشه در محیط MS همراه با نانو ذرات بدون پوشش وکمترین آن درمحیط بدون کلات آهن (کشت شاهد) بود ولی وزن خشک ریشه در محیط های همراه با نانو ذرات پوشش دار و VS اختلاف معنی دار نداشتند.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات نوع منبع عنصر آهن در محیط MS روی صفات رویشی (طول شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ و طول ریشه) پایه نارنج *(C.aurantium)* در شرایط کشت درون شیشه‌ای

متغیرها	MS بدون آهن	MS کامل	MS+ FeEDDHA	MS+نانو ذرات اکسید آهن پوشش دار	MS+نانوذرات اکسید بدون پوشش
طول شاخساره (cm)	٤/١^{c}	٥/٢^{b}	٥/٥^{ab}	٥/٨^{ab}	٦/١^{a}
تعداد برگ	٤/٤^{c}	٥/٢^{b}	٥/٨^{ab}	٦^{ab}	٦/٤^{a}
سطح برگ (cm^2)	١٠٩/٥٨^{d}	١٥٥/٢٢^{c}	١٦٤/١٢^{bc}	١٧١/٥٨^{ab}	١٨٣/٠٧^{a}
طول ریشه (cm)	٨^{cd}	١٢^{c}	١٣^{bc}	١٤/٢^{b}	١٧/٣^{a}

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

جدول ۲ – مقایسه میانگین تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی وزن تر و خشک (گیاهچه، شاخساره و ریشه) پایه‌ی نارنج *(C.aurantium)* در شرایط کشت درون شیشه‌ای

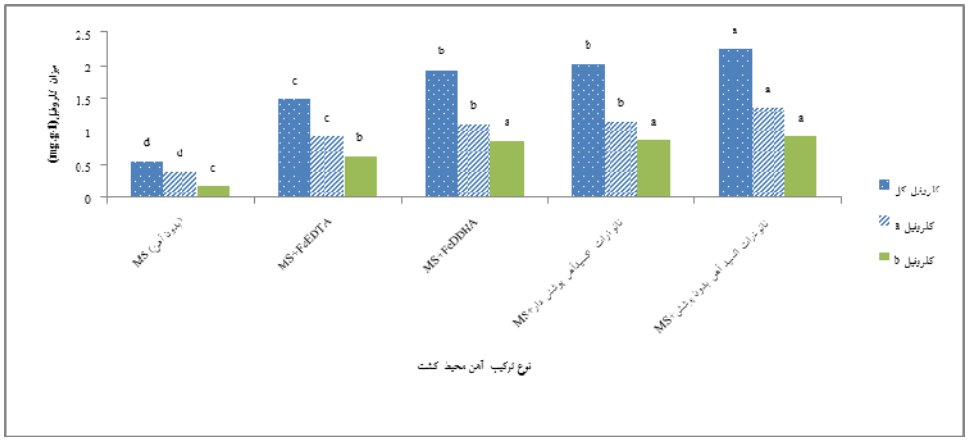
	وزن تر (g)			وزن خشک (g)		
	گیاهچه	شاخساره	ریشه	گیاهچه	شاخساره	ریشه
MS بدون کلات آهن	٠/٥٢^{d}	٠/٣٤^{c}	٠/١٧^{b}	٠/١٣^{d}	٠/٠٨^{b}	٠/٠٤^{d}
MSکامل	٠/٥^{c}	٠/٣٨^{c}	٠/٢^{b}	٠/١٦^{c}	٠/١^{b}	٠/٠٦^{c}
MS+FeEDDHA	٠/٧^{b}	٠/٤٥^{b}	٠/٢٤^{a}	٠/٢٢^{ab}	٠/١٣^{a}	٠/٠٨^{b}
MS + نانوذرات پوشش دار	٠/٧^{b}	٠/٤٥^{b}	٠/٢٥^{a}	٠/٢٢^{ab}	٠/١٤^{a}	٠/٠٩^{b}
MS+ نانو ذرت بدون پوشش	٠/٨^{a}	٠/٥٣^{a}	٠/٢٧^{a}	٠/٢٦^{a}	٠/١٥^{a}	٠/١^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ١٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می باشند

تاثیر نوع ترکیب آهن محیط کشت MS روی میزان کلروفیل کل، a و b

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین گیاهچه‌های رشد یافته درمحیط‌های MS با انواع منبع آهن بکار رفته در آنها از نظر میزان کلروفیل کل، a و b در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. مقایسه میانگین نتایج نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل به ترتیب درمحیط MS حاوی نانو ذرات بدون پوشش و کمترین آن درمحیط MS بدون کلات

آهن مشاهده شد (نمودار ۱). البته محیط MS همراه با نانو ذرات پوشش دار و محیط کشت VS اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. بیشترین میزان کلروفیل a در محیط MS حاوی نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش سپس محیط MS همراه با نانو ذرات اکسید آهن پوشش دار و محیط VS و بعد از آن محیط کشت MS کامل و کمترین میزان کلروفیل a در محیط MS بدون کلات آهن مشاهده شد(نمودار ۱). براساس نمودار یک بیشترین میزان کلروفیل b درمحیط MS همراه با نانوذرات آهن بدون پوشش و بدنبال آن محیط‌های پوشش دار و محیط کشت VS و کمترین میزان در محیط MS بدون کلات آهن (کشت شاهد) مشاهده شد. البته محیط‌های MS همراه با نانوذرات آهن بدون پوشش، پوشش دار و محیط VS اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۱).



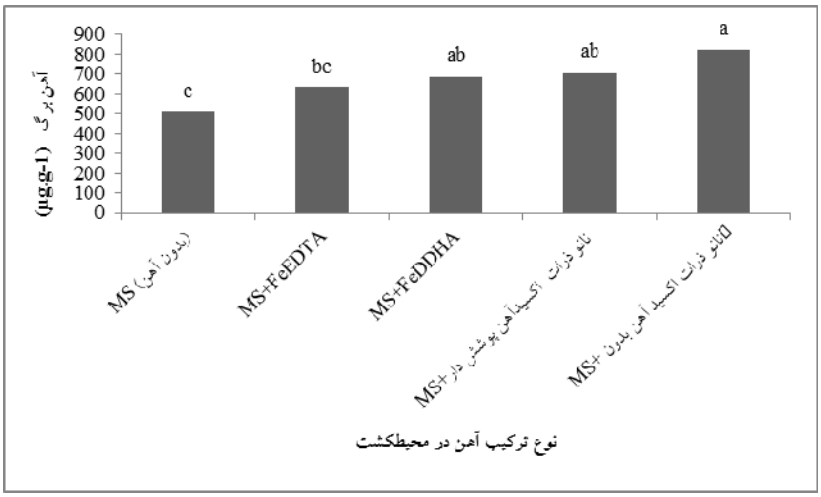
نمودار ۱–مقایسه میانگین تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی میزان کلروفیل (کل, b,a) برگ پایه ی نارنج *(C.aurantium)* در شرایط درون شیشه‌ای (g=وزن تر گیاه) (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون آزمون چند دامنه‌ای دانکن می باشند)

تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی میزان جذب آهن در برگ

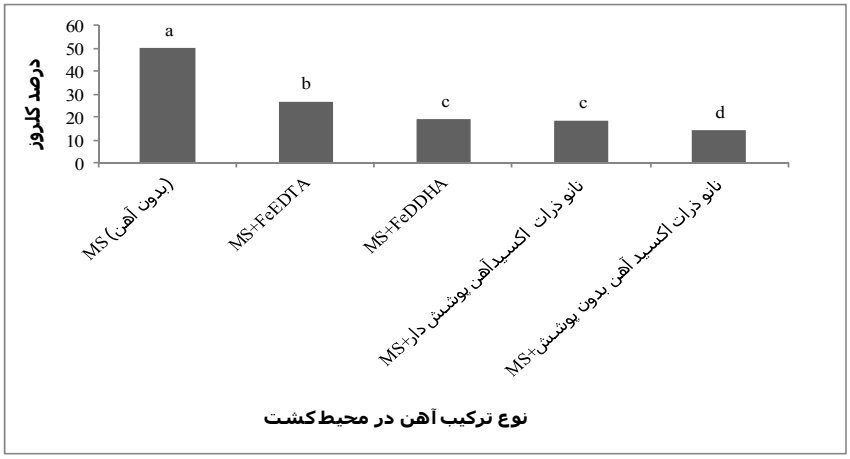
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین گیاهچه های رشد یافته درمحیط های MS با انواع ترکیبات آهن از نظر میزان جذب آهن در برگ در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار وجود داشت . مقایسه میانگین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان جذب آهن بترتیب در برگ گیاهچه‌های رشد یافته در محیط MS حاوی نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش و محیط MS بدون کلات آهن (کشت شاهد) مشاهده شد (نمودار ۲).

تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی درصد کلروز برگ

نتایج تجزیه واریانس این آزمایش به لحاظ درصد کلروز برگ حاصل از تاثیر نوع آهن محیط کشت MS در سطح احتمال آماری ۱٪ معنی دار شد. بیشترین و کمترین درصد کلروز بترتیب در برگ گیاهچه‌های رشد یافته در محیط MS بدون کلات آهن (کشت شاهد) و محیط MS حاوی نانو ذرات اکسید آهن بدون پوشش مشاهده شد (نمودار ۳)



نمودار ۲-مقایسه میانگین تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی میزان آهن برگ پایه ی نارنج (*C. aurantium*) در شرایط درون شیشه‌ای (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون آزمون چند دامنه‌ای دانکن می باشند)



نمودار۳- مقایسه میانگین تاثیر نوع آهن محیط کشت MS روی درصد کلروز برگ پایه ی نارنج *(C. aurantium)* در شرایط درون شیشه‌ای (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون آزمون چند دامنه‌ای دانکن می باشند)

در توضیح نتایج فوق می‌توان بیان داشت که تاثیر کاربرد کلات آهن FeEDDHA در محیط کشت MS بر کاهش درصد کلروز کمبود آهن پایه‌ی نارنج نسبت به کلات آهن FeEDTA بیشتر و کارآمد بوده است. بطوریکه باعث افزایش در شاخص‌های اندازه‌گیری شده در این آزمایش در محیط کشت MS همراه با این کلات شده بود. دلایل زیادی برای موثرتر واقع شدن کلات آهن FeEDDHA نسبت به کلات آهن FeEDTA در محیط کشت MS بر جلوگیری از کلروز ناشی از کمبود آهن و بهبود شاخص‌های رویشی رشد وبه دنبال آن رشد بهتر گیاه وجود دارد. بسیاری از فرمول‌های استاندارد محیط کشت بافت حاوی FeEDTA به عنوان منبع آهن هستند و حساسیت این نوع کلات آهن به نور، و جایگزین کردن این نوع کلات آهن با منابع آهن دیگر، در بسیاری از گیاهان کلروز آهن را کاهش داده است. لوسینا (۲۰۰۳) و لوسینا و همکاران (۱۹۹۲) در تاثیر بیشتر کلات آهن FeEDDHA در مقابل کلات آهن FeEDTA گزارش کردند که آهن موجود در کلات آهن FeEDTA می‌تواند به دلیل جاگزینی با Cu^{+2}، Zn^{+2} و Ca^{+2} تثبیت آن کمتر صورت بگیرد و آهن موجود در آن دچار رسوب شود. در مقابل آهن همراه با کلات FeEDDHA تاثیر آن در ارتباط با ثبات و استحکام کلات است که از رسوب آهن حتی زمانی که pH بالای ۹ باشد جلوگیری می‌کند و از این طریق مقدار زیادی از آهن را در محلول خاک حفظ می‌کند بدون اینکه توسط

بارهای منفی سطح ذرات خاک نگه داشته شوند. اوراتیز و همکاران (۲۰۰۷) دلیل تاثیر بیشتر کلات آهن FeEDDHA در کنترل کلروز ناشی از کمبود آهن را بنیان کلاته EDDHA دانسته که جذب آهن توسط ریشه و حرکت به سمت برگها را تسهیل می‌کند. بنابراین با توجه به موارد فوق و نتایج بدست آمده کلات آهن FeEDDHA می‌تواند به میزان بیشتری آهن در اختیار گیاه قرار داده و مسلما فراهم شدن بیشتر آهن، بهبودشاخص‌های رویشی رشد (طول شاخساره، تعداد و سطح برگ و طول ریشه) را به دنبال خواهد داشت زیرا آهن در فرایند فتوسنتز در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا به واسطه‌ی حضور پروتئین‌های حاوی آن از قبیل سیتوکروم‌ها و فرودوکسین‌ها نقش دارد. در اثرتامین آهن گیاه توسط کلات آهن FeEDDHA، انتقال الکترون فتوسنتزی افزایش یافته که این امر موجب افزایش تثبیت دی اکسید کربن و افزایش غلظت نشاسته و کربوهیدرات-های محلول در گیاهان در طی دوره رشد رویشی شده و از این طریق موجب زیاد شدن تولید ماده خشک گیاهی یا افزایش رشد سبزینه‌ای گیاه می‌شود (مارچنر، ۱۹۹۵). رومهلد و مارچنر (۱۹۸۱) و شیکور و اسمیت (۲۰۰۱) نیز گزارش کردند که تشکیل و طویل شدن ریشه به غلظت موضعی آهن در محیط ریشه وابسته دانستند که نتایج بدست آمده از این تحقیق با آن مطابقت دارد (جدول ۱). کلات آهن FeEDDHA نسبت به کلات آهن FeEDTA در محیط MS باعث افزایش معنی داری (سطح یک درصد) در میزان کلروفیل کل و میزان جذب آهن گیاهچه‌های نارنج به ترتیب به میزان ۱/۹٤ میلی گرم بر گرم و ٦٨٧/٦ میکروگرم بر گرم FeEDTA شده بود که بدنبال آن میزان کلروزبه میزان ۱۹/۱٦ درصد در محیط MS با کلات آهن FeEDDHA مشاهده شد (نمودارهای ۱ ،۲ و ۳) که این با نتایج گزارش شده از (سونگ چن و همکاران، ۲۰۰٤) در انگور، (اردال و همکاران، ۲۰۰۸) در سیب و (فرازری و همکاران، ۲۰۰۷) در مرکبات مطابقت دارد. بنابراین با توجه به دلایل ارائه شده در بالا به نظر می‌رسد که کلات آهن FeEDDHA توانسته با افزایش میزان حلالیت آهن در محیط رشد گیاه و افزایش جریان انتشار آهن به ریشه در شرایط درون شیشه‌ای و به دنبال آن افزایش در فراهم آوردن آهن مورد نیاز در ساختمان کلروفیل باعث شود که گیاه فتوسنتز بهتری انجام دهد و همین امر باعث بهبود رشد گیاه شده است. با تکیه بر نتایج بدست آمده مشخص شد که تاثیر کاربرد نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) در محیط کشت MS بر کاهش درصد کلروز ناشی از کمبود آهن پایه‌ی نارنج نسبت به نانوذرات اکسید آهن پوشش-دار شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول و کلات‌های آهن یاد شده در قسمت قبلی بیشتر و کارآمد بوده است. بطوریکه باعث افزایش در شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای کشت شده در محیط کشت MS همراه با این نانوذرات شده بود. این نتایج می‌تواند به علت خصوصیت بارز نانوذرات یعنی واکنش‌پذیری و تحرک بالای این ذرات باشد. پاندر و همکاران (۲۰۰۰) در این زمینه گزارش کردند که، زمانی که اندازه ذرات آهن به مقیاس نانو کاهش می‌یابد تعداد اتم‌هایی که می‌توانند در واکنش درگیر شوند، افزایش و در نتیجه سرعت واکنش‌پذیری بیشتر می‌شود. این امر موجب می‌شود که نانوذرات قدرت انتخاب‌پذیری بیشتری داشته باشند. معمولا آهن به صورت Fe(II) جذب گیاهان می‌شود، میزان جذب آهن توسط گیاه به فیزیولوژی گیاه کشت شده و شرایط بیوشیمیایی محیط بستگی دارد. فراهمی و کارایی جذب آهن به میزان یونش ترکیبات آهن وابسته است و شرایط بیوشیمیایی محیط میزان یونش ترکیبات آهن را کنترل می‌کند. غفاریان مقرب (۱۳۹۱) گزارش کرد که در محیط کشت ترکیبات متعدد فراهم کننده الکترون و شرایط احیایی غالب است از آنجاکه ثابت حلالیت مگنتیت در این شرایط بیش از ۱۰۰ برابر می‌شود، شرایط احیایی و جامد بودن محیط کشت موجب پایداری Fe(II) رهاسازی شده از سطح نانوذرات مگنتیت می‌شود. همچنین نانوذرات کوچکتر از ۵۰ نانومتر می توانند به صورت فیزیکی از دیواره سلولی و غشا سلولی عبور کرده و وارد سیتوپلاسم سلولی شوند. این موضوع می‌تواند موجب افزایش فراهمی آهن در گیاه بدون نیاز به یونش آهن و افزایش میزان کلروفیل گردد. انتشار یون آهن Fe(II) از سطح نانوذرات وابسته به اندازه ذرات و سطح ویژه نانوذره، ترکیب سطح نانو ذره، شیب گرادیان غلظت آهن از سطح تا محیط و شرایط محیط می‌باشد. پوشش نانوذرات با تغییر در اندازه و ترکیب سطح نانو ذره ضمن جلوگیری از هماوری نانوذرات باعث تغییر در انتشار یون آهن از سطح نانوذرات می-شود.

نتیجه گیری

در مجموع در این آزمایش به نظر می‌رسد دلیل رجحان نانوذرات بدون پوشش در تامین آهن همین افزایش اندازه ذرات و کاهش جذب نانو ذرات با پوشش و کاهش شرایط رهایش یون آهن Fe(II) از سطح نانو ذرات باشد. با توجه به حساسیت و تجزیه کلات‌های آهن در برابر نور، استفاده از آنها برای جلوگیری از کلروز ناشی از کمبود آهن موثر واقع نخواهد بود

بنابرین از نتایج تحقیق حاضر مشخص شد که موثرترین راه در رابطه با جلوگیری از کلروز ناشی از کمبود آهن در کشت درون شیشه‌ای پایه نارنج، به نظر می‌رسد که محیط کشت MS بدون کلات آهن همراه با نانو ذرات اکسید آهن (Fe_3o_4) به ویژه از نوع بدون پوشش آن راه حلی مناسب برای جلوگیری از کلروز کمبود آهن می‌باشد و جایگزین مناسبی برای کلات‌ها در محیط کشت MS برای جلوگیری از کلروز کمبود آهن در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

منابع

غفاریان مقرب، م. ه. ۱۳۹۱. روش‌های بهینه‌سازی مشخصات نانوذرات آهن جهت کاهش کلروزآهن در سویا. رساله دکتری دانشگاه تربیت مدرس.

Amiri, E. and A. R. Shahsavar. 2009. Comparative efficacy of citric acid and Fe sulfate in the prevention of chlorosis in orange trees. J. Biol. Environ. Sci.3:61-65.

Balakrishan, K. 2001.Chlorosis in rose. Ind. J. Plant Physiol. 5:389-391.

Barberon, M., E. Zelazny, S. Robert, G. Conjero, C. Curic, J. Friml and G. Ver. 2011. Monoubiquitin dependent endocytosis of the iron regulated transporter1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. Panas. 108: 450-458.

Erdal, I., M. AtillaAskin, Z. Kucukyumuk, F. Yildirim and A. Yildirim. 2008. Rootstock has an important role on iron nutrition of apple trees. World J. Agric. Sci. 4: 173-177.

Fernadez, A. A., P. Paniagua, J. Abadi and A. Abadi. 2003. Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in peach (*Prunus persica* L.Batsch). J. Agric. Food Chem. 51:5738-5744.

Ferrarezi, R.S., O. C. Bataglia,P. R. Furlani and E. A. Schammass. 2007. Iron sources for citrus rootstock development grown on pine bark/vermiculite mixed substrate. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). 64: 520-531.

Jimenez, S., J. Pinochet, A. Abadia, M. A. Moreno and Y. Gogorcena. 2008. Tolerance response to iron chlorosis of *Prunus* selections as rootstooks. Hort Science. 43: 304-309.

Lombardi, L., L. Sebastiani and C. Vitagliano. 2003. Physiological, biochemical, and molecular effects of in vitro induced iron deficiency in peach rootstook Mr.S 2/5. J. Plant Nutr. 26:.2149-2163.

Lucena, J. J., M. Manzanares, and A. Garate. 1992. A test to evaluate the efficacy of commercial Fe-chelates. J. Plant Nutr. 15:1553–1566.

Lucena, J. J. 2003. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. J. Plant Nutr. 26:1969–1984.

Mahmoudi, M., M. Shokrgozar, A. Simchi, A. Imani, S. Milan, P. Stroeve, H. Vali, O. Hafeli and S. H. Bonakdar. 2009. Multi physics flow modeling and *in vitro* toxicity of iron oxide Nano particles coated with poly (vinyl alcohol). J. Phys. Chem. 113: 2322-2331.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed., Academic Press, New York, USA. 388p.

Mingu, M., C. Liu, C. Chunxiang, L. Zheng, L. Chen, H. Huang, L. Xiaoqing, W. Xiao and H. Fashui. 2008. Nano anatase relieves the inhibition of electron transport caused by linolenic acid chloroplast of spinach. Biol. Trace. Elem. Res. 122:73-81.

Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473–479.

Nijjar, G.S. 1990. Nutrition of fruit trees. Kalyani Pub. New Delhi, India. 300 p.

Ortiz, P.R., B. Meza, F. Requena, G. Flores and E. Barra. 2007. Evaluation of different iron compounds in chlorotic Italian lemon trees (*Citrus lemon*). Plant Physiol. Biochem. 45:330-335.

Pander, S. M., J. Darab and T. E.GandMallouk. 2000. Remediation of Cr (VI) and Pb (II) aqueous solutions using supported nanoscal zero valent iron. J. Environ. Sci. Technol. 34:2564-2569.

Römheld, V and H. Marschner. 1981. Rhythmic iron stress reactions in sunflower at suboptimal iron supply. Physiol. Plant.53:347-353.

Schikora, A and W. Schmidt. 2001. Iron stress- induced changes in root cell regulated independenttly from physiological responses to low iron availability. Plant Physiol. 125:1679-1687.

Song Chen, L., B. Smith, and L. Cheng. 2008. Co_2 assimilation, photosynthetic enzymes, and carbohydrates of con cord grape leaves in response to iron supply. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129(5):738-744.

Tagliavini, M and A. Rmbola. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. Europ. J. Agron. 15: 71-92.

Investigation on the effect of Fe oxide nano particles to prevention Fe chlorosis of sour orange rootstock *(citrus aurantium)* in *in vitro* conditions

S. Saeedi[1], M. Mousavi[2], M. H. Ghafariyan Moghareb[2]

Received: 2014-9-25 Accepted: 2015-6-30

Abstract

Iron deficiencies mostly appears as chlorosis in young leaves as one of the most important nutritional disorders is citrus trees and severely affect yield and quality of their crop. Suitable selection of iron composition is one of important solution ways for prevent of this nutritional question. For this purpose experiment to investigate the effect of iron composition type including of FeEDTA, FeEDDHA and two type of iron oxide nanoparticles uncoated and coated with polyethylene glycol for prevention iron chlorosis in sour orange (*Citrus aurantium)* rootstock on Murashige and Skoog (MS) medium without iron in completely randomized design with five replicates was followed. The sour orange seeds were cultivated on MS medium with different iron composition .At the end of experimental period (2 months) vegetative characteristics (root, shoot and seedling length, number and leave area), seedling, root and shoot dry and fresh weights, the amount of chlorophyll a, b and total, Leaf iron concentration and chlorosis percentage, were measured. The results indicated that MS culture medium with uncoated nanoparticles of iron oxide had highest significant effect at <1% probability on increase of iron uptake and the lowest degree of chlorosis of seedlings were grown on culture medium. It was also observed that MS medium with iron nanoparticles have highest significant effects on increase of vegetative characteristics, fresh and dry weights and the chlorophyll content than control (MS without iron chelated).

Keywords: Iron chelate, Iron deficiency, Citrus, Tissue culture

1- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Agricultural and Natural Resource Research Center of Zanjan, Iran