Archive of SID

ارزیابی روش فنان ترولین در تعیین غلظت Fe^{2+} در برگ مرکبات

محمود محمدی[۱] و عبدالامیر معزی[۲]

چکیده

آهن یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاه محسوب می گردد. از تجزیه برگی برای تعیین غلظت آهن کل و تشخیص کلروز ناشی از کمبود آهن به کرات استفاده می گردد. اما غلظت آهن کل موجود در گیاه ارتباط خوبی با ظهور کلروز ندارد، به گونه ای که برگ های کلروزه معمولاً دارای میزان آهن برابر یا بیشتری نسبت به برگهای سبز می باشند. هدف از این تحقیق ارائه روش مناسب جهت اندازه گیری Fe^{2+} (فرم فعال آهن مؤثر در پروسه کلروفیل سازی) و تعیین همبستگی بین کلروفیل و Fe^{2+} در برگ مرکبات می باشد. انتخاب ارتو فنان ترولین بر مبنای ضریب ثابت پایداری بالای این معرف با Fe^{2+} در مقایسه با Fe^{3+} می باشد. دراین تحقیق پس از نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها جهت برازش غلظت، pH و نسبت نمونه گیاهی به محلول فنان ترولین چهار غلظت (۱، ۱/۵ ، ۲ و ۲/۵ درصد) محلول فنان ترولین در چهار pH (۲، ۳، ٤ و٥) همراه با نسبت های ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۱۵ و۱:۲۰ نمونه برگ به محلول فنان ترولین در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی (با سه تکرار) مورد آزمایش قرار گرفتند. از نتایج بدست آمده محلول دو درصد ارتو فنان ترولین با۳= pH و نسبت نمونه گیاهی به محلول عصاره گیر۱۰: ۱، مدت زمان عصاره گیری ۱۲ ساعت و طول موج ۵۱۰ نانومتر برای اندازه گیری Fe^{2+} پیشنهاد گردید. در ضمن بین میزان Fe^{2+} با کلروفیل موجود در برگ های سبز و کلروزه همبستگی مستقیم و معنی داری وجود داشت.

کلید واژه ها: آهن، آهن دو ظرفیتی، کلروز، ارتوفنان ترولین، مرکبات، پ- هاش، زمان عصاره گیری

مقدمه

آهن یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاهان محسوب می‌گردد. مهم ترین وظیفه این عنصر در گیاه شرکت در ساختمان آنزیم ها و مولکولهای ناقل در مکانیسم تقسیم مولکولی است که نمونه های مشخص آن کاتالاز پراکسیداز، فرودوکسین و سیتوکرومها است (۲و۳). کلروزآهن برای اولین بار توسط گریس در سال۱۸۴۳در درخت مو تشخیص داده شد (۷). به عقیدهٔ محققین (۲، ۳، ۴، ۱۰،۱۷، ۱۹و۲۳) کلروزآهن یک اختلال پیچیدهٔ فیزیولوژیکی است که عوامل زیادی در آن نقش دارد و از جمله گسترده ترین کمبود های عناصر غذائی گیاه در خاکهای آهکی و قلیائی می باشد. تحت چنین شرایطی، غلظت بالای بی کربنات در بافتهای گیاهی منجر به افزایش pH آپوپلاست برگ و نهایتاً غیر فعال شدن آهن و جلوگیری از حضور آن در سیتوپلاسم و ساخته شدن کلروفیل می گردد (۲، ۳، ۸، ۱۵و۱۷). کلروز از کلمهٔ یونانی کلروز[۳] به معنی زرد متمایل به سبز گرفته شده است (۲۵). گیاهانی که دچار کمبود آهن می‌باشند به علت عدم تولید کلروفیل کافی عمل فتوسنتز را به طور کامل انجام نداده در نتیجه رشد و عملکرد کاهش می‌یابد (۱۲،۳،۲و۱۶).

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری (Mahmod7516@Yahoo.com)

۲- استادیار گروه خاشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

3- Chlorosis

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۵/۸/۱

www.SID.ir

Archive of SID

لیندسی و شواب[1] (۱۳) نشان دادندکه کمبود آهن تمامی خاک های با pH بیشتر از ۵ به وقوع می‌پیوندد مگر آنکه عوامل تغییر دهنده، حلالیت آهن موجود در خاک را به بالای حد بحرانی (10^{-8} مولار) برسانند (۶ و۱۳). حداقل قابلیت استفاده آهن در محدودهٔ pH ۸/۵– ۷/۴ می باشد (۲۳). کلروز آهن یک مشکل تغذیه ای در اکثر باغ های مرکبات بخصوص در باغ های با خاک های آهکی می باشد (۷و۱۴). تجزیهٔ گیاه یکی از روش های معمول و قابل قبول جهت تشخیص کمبود عناصر غذایی به حساب می آید. معمولاً غلظت عنصر غذایی در بافت سالم بیشتر از غلظت این عنصر در بافت گیاهان کمبود دار می باشد. معذالک این قاعده کلی در مورد آهن صدق نمی‌کند. بدین صورت که در خاک های آهکی اغلب غلظت آهن در برگ گیاهان کمبود دار برابر یا بیشتر از غلظت آهن در برگ های سبز است (۵،۱۰،۱۸،۱۹ و۲۲). بررسی های انجام شده نشان می دهد، تمامی آهن جذب شده توسط گیاهان مورد استفاده قرار نگرفته و بخشی از آهن جذب شده به فرم ترکیبات نا محلول در می‌آید. لذا در بعضی موارد آهن کل گیاه معیار مناسبی از حالت تغذیه‌ای آن در گیاه نمی‌باشد. معمولاً آهن سه ظرفیتی در داخل گیاهان در حال رشد، غیر متحرک[2] است و فرم فعال آهن در گیاه، آهن دو ظرفیتی می‌باشد (۱۰، ۱۵، ۱۹،۲۰و۲۲). دکوک و همکاران[3] (۶) در تحقیقات خود گزارش نمودند که ارتباط ضعیفی بین آهن کل و کلروفیل وجود دارد و همبستگی محاسبه شده بین آهن فعال و کلروفیل زیاد می باشد. بررسی های بعمل آمده توسط محققین مختلف از قبیل کاتیل و شارما[4] بر روی گیاه برنج و پنبه، محمد و همکاران[5] (۱۷) و لیندر و هارلی[6] (۱۲) در درخت لیمو ترش، منگل و همکاران[7](۱۵) در آفتابگردان، کوزگلو و آسیکگوز[8](۱۱) در هلو و رشید و همکاران[9](۲۰) در بادام زمینی نشان می‌دهدکه مقدار آهن کل موجود در برگهای کلروزه برابر یا بیشتر از مقدار آهن موجود در برگ های سبز می‌باشد. همچنین در برگ های سبز، غلظت آهن فعال (دو ظرفیتی) بیشتر از برگ های کلروزه می باشد و میزان کلروفیل با آهن دو ظرفیتی برگ در مقایسه با آهن کل دارای همبستگی بیشتری است (۳، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۵و۲۰). برگ های مرکبات موجود در خوزستان نیز از این قاعده تبعیت می‌کنند. در حقیقت این نقیصه ناشی از روش آماده سازی نمونه (هضم مرطوب یا خاکستر خشک) جهت اندازه گیری آهن می‌باشد که توانایی تفکیک آهن دو ظرفیتی را از آهن کل ندارد. لازم به ذکر است قبلاً به جای DTPA[10] از فنان ترولین برای استخراج آهن قابل استفاده در خاک استفاده می‌شد لیکن حد بحرانی مشخصی برای آهن با این روش در دسترس نیست (۶). دلایل انتخاب ارتو فنان ترولین ($C_{12}H_8N_2$) در مقایسه با دیگر کلاتهای آهن به شرح ذیل می‌باشد:

۱– آهن دو ظرفیتی با فنان ترولین تشکیل کمپلکس فروئین[11] $[Fe(C_{12}H_8N_2)_3]^{2+}$ را می‌دهد که یک کمپلکس بسیار پایدار می‌باشد زیرا پایداری فنان ترولین با Fe^{2+} در مقایسه با دیگر کلاتهای آهن بیشتر است (۲۱ و ۲۴).

۲– فنان ترولین در مقایسه با دیگر کلاتهای آهن قدرت استخراج Fe^{2+} بیشتری را از بافت گیاهی دارد (۲۱و۲۴).

1- Lindsay & Schwab
2- Immobile
3- Dekock *et al*.
4- Katyl & Sharma
5- Mohammad *et al*.
6- Linder & Harley
7- Mengel *et al*.
8- Koseglu & Acigoz
9- Rashid *et al*.
10- Dietylene triamine penta acetic acid
11- Ferroin

www.SID.ir

Archive of SID

۳- رنگ نارنجی حاصل از کمپلکس Fe^{2+} با فنان ترولین از قانون بیر تبعیت می‌کند که این رنگ فقط در اثر ترکیب این دو ماده ایجاد می‌گردد (۲۱و۲۴) (جدول شمارهٔ ۱).

جدول۱- ثابت های پایداری تعدادی از کمپلکسهای Fe^{2+}وFe^{3+} (۲۱ و۲٤)

فرم آهن	DTPA	EDDHA[1]	EDTA[2]	O-Phen[3]
Fe^{2+}	۱۶٫۵	۱۴٫۳	۱۴٫۳	۲۱٫۳
Fe^{3+}	۲۸٫۶	۳۳٫۹	۲۵/۱	۱۴٫۱

کتیال و شارما (۹) ازاین روش در گیاه برنج استفاده نمودند و محلول فنان ترولین یک و نیم درصد (pH= ۳) نسبت نمونه گیاهی به محلول فنان ترولین ۱:۱۰ و مدت زمان۱۲ ساعت را برای استخراج Fe^{2+} در این گیاه گزارش نمودند. محمد و همکاران (۱۷) محلول یک و نیم درصد فنان ترولین (pH= ۳) و مدت زمان ۲۰ ساعت را به عنوان بهترین روش برای اندازه گیری Fe^{2+} در برگ درختان لیمو ترش انتخاب و گزارش نمودند بین نسبتهای ۱:۵، ۱:۱۰و۱:۲۰نمونه گیاهی به محلول فنان ترولین هیچ گونه تفاوت معنی داری وجود ندارد. از این رو با توجه به مطالب فوق این آزمایش با هدف ارزیابی روش فنان ترولین برای اندازه‌گیری غلظت Fe^{2+} در برگ مرکبات و جایگزینی این روش با روش هضم‌تر و نیز تعیین همبستگی کلروفیل با Fe^{2+} طراحی و انجام گردید.

مواد و روش ها

این آزمایش بر روی درختان مرکبات واقع در باغ دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید. نمونه مرکب خاک از عمق ۳۰-۰ و۷۰- ۳۰ سانتیمتری تهیه و جهت اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیائی به آزمایشگاه ارسال گردید. در این آزمایش از چهار غلظت محلول فنان ترولین (۱، ۲،۱/۵ و۲/۵ درصد) و چهار pH (۲، ۳ ،۴ و۵) استفاده شد. لازم به ذکر است که در pH=۵ به دلیل تشکیل رسوب، فقط محلول فنان ترولین یک در صد تهیه گردید.

نمونه‌های برگی (سبز و کلروزه) جداگانه و بطور تصادفی از درختان مرکبات هم سن و دارای رشد رویشی یکسان و فاقد هر گونه آفت یا بیماری از برگهای موجود در مرکز شاخه های رشد کرده در اواسط فصل رشد تهیه و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. بعد از انتقال، نمونه‌ها را جداگانه و به ترتیب توسط آب شهر، اسید کلریدریک یکدهم نرمال و آب مقطر شستشو داده و در نهایت پهنهٔ برگ (فاقد رگبرگ) هر گروه از نمونه ها توسط آسیاب با تیغه استیل بمدت یک دقیقه آسیاب گردید. جهت بدست آوردن بهترین طول موج دستگاه رنگ سنجی[4] نمودار پیک فنان ترولین با Fe^{2+} (در محلول حاوی فنان ترولین، آهن دو ظرفیتی، استات سدیم یک مولار و هیدروکسید آمین هیدروکلرید ده درصد) ترسیم گردید. روش قرائت نمونه‌های برگی پس از افزودن محلول فنان ترولین با غلظتهای مختلف به نمونه های برگی درون لوله های آزمایش

1- Etylene di Amine di- ortho- Hydroxyphenil acetic acid
2- Etylene di Amine tetra acetic acid
3- O- Phenanthroline
4- Spectrophotometer

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد که از مرحله تولید رنگ حاصل از تشکیل کمپلکس فروئین شروع و تا زمان تثبیت رنگ زیر نظر گرفته شد. بعد از صاف کردن محتویات لوله آزمایش به وسیله کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ و کالیبره کردن دستگاه رنگ سنجی، غلظت Fe^{2+} موجود در محلول صاف شده در طول موج ۵۱۰ نانومتر تعیین گردید. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی[1] با چهار تیمار و سه تکرار می باشد که با استفاده از نرم افزار آماری Minitab مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در استاندارد کردن مراحل فوق، علاوه بر نتایج طرح آماری و آزمون چند دامنه ای دانکن از دو فرض زیر بطور مؤثر استفاده گردید:

۱- تیمارهایی که بیشترین تفاوت غلظت Fe^{2+} را در برگ های سبز و کلروزه داشته باشند به عنوان تیمارهای برتر انتخاب می‌گردند.

۲- در صورتی که در یک غلظت و pH، غلظت Fe^{2+} استخراجی از نمو نه های برگی در تیمارهای مختلف محسوس نباشد انتخاب تیمار برتر به حداکثر تفاوت بین غلظت Fe^{2+} حاصل از نسبت های قبل و حد اقل تفاوت بین غلظت Fe^{2+} حاصل از نسبت های بعد منوط می گردد.

در ضمن در این تحقیق همبستگی کلروفیل با Fe^{2+} اندازه گیری شده در برگهای سبز و کلروزه مشخص گردید. اندازه گیری کلروفیل به روش آرنون (۱۹۵۶) انجام گرفت تمامی تجزیه های برگی و خاکی توسط روشهای استاندارد مرسوم در آزمایشگاه و کتب مرجع می‌باشد (۱و۲۶).

نتایج و بحث

نتایج آزمایش خاک و گیاه (در جدول های ۲و۳) آمده است. بررسی اطلاعات این دو جدول نشان می دهد خاک محل مورد آزمایش از رده اینسپتی سول با درصد آهک بالا (۴۴ درصد) و بافت خاک لومی که از نظر در صد مواد آلی و نیتروژن فقیر و از نظر فسفر و آهن در حد کفایت می‌باشد. همچنین غلظت آهن کل موجود در برگهای سبز و کلروزه بیش از حد بحرانی (۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک برگ) بوده، لیکن میزان کلروفیل در برگهای سبز در مقایسه با برگهای کلروزه بیشتر است.

انتخاب بهترین نسبت نمونه گیاهی به محلول عصاره گیر (فنان ترولین):

بررسی نتایج تجزیه واریانس و جدول شماره ۴ نشان می دهد بین تاثیر نسبتهای مختلف نمونه برگ (سبز و کلروزه) به محلول یک درصد فنان ترولین (pH=۲) بر غلظت Fe^{2+} استخراجی از نمونه‌های برگ در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار وجود دارد. نتایج آزمون دانکن نیز نشان می‌دهد که بین Fe^{2+} استخراجی از نسبتهای ۱:۵و ۱:۱۰ همچنین بین نسبتهای ۱:۱۵و۱:۲۰ تفاوت معنی داری وجود ندارد. اما غلظت Fe^{2+} در نسبتهای ۱:۱۵ و ۱:۲۰ در مقایسه با نسبت‌های۱:۱۵ و۱:۱۰ از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد. با توجه به نتایج آزمون تجزیه واریانس، آزمون دانکن و پیش فرض حداکثر تفاوت Fe^{2+} استخراجی در برگ های سبز و کلروزه در این گروه از تیمارها، نسبت ۱:۱۵ به عنوان تیمار بهتر در برگهای سبز و کلروزه انتخاب می‌گردد. لازم به ذکر است انتخاب نسبتهای برتر در pH های ۳ و ۴ و ۵ نیز به شیوه فوق می با شد.

انتخاب بهترین غلظت محلول عصاره گیر:

مقدار فلزی که کیلت[2] می‌گردد به توانایی تشکیل کمپلکس (لیگاند) و نیز به غلظت عامل کیلت کننده بستگی دارد. مطالعات انجام شده نشان می دهد از نظر تئوری برای کمپلکس هر مول Fe^{2+}، ۳ مول ارتوفنان ترولین مورد نیاز است

1- Completely randomized design

2- Chelate

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- برخی خصوصیات فیزیکی وشیمیائی خاک منطقه مورد آزمایش

عمق (cm)	pH	CEC (Cmole/kg)	کربنات کلسیم معادل	گچ	درصد اشباع	ماده آلی٪	نیتروژن	رس	سیلت	شن	بافت	آهن	پتاسیم mg/kg	فسفر
۰ – ۳۰	۷٫۴	۱۲٫۳	۴۳٫۵	۶٫۱	۵۰	۰٫۶۵	۰٫۰۳	۳۱٫۳	۳۸	۳۰٫۷	لومی	۵	۲۴۰	۱۸٫۴
۳۰ – ۷۰	۷٫۳	۱۰٫۱	۴۴٫۳	۸	۴۵٫۷	۰٫۴۱	۰٫۰۱۹	۲۵٫۷	۳۷٫۷	۳۶٫۶	لومی	۴٫۹	۲۲۵	۱۶٫۶

جدول ۳- خصوصیات شیمیائی و غلظت کلروفیل در برگهای سبز وکلرزه

نوع برگ	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	سدیم	آهن کل	آهن دوظرفیتی	کلروفیل
				٪				mg/kg	mg/g
سبز	۲٫۳	۰٫۲۵	۰٫۸	۲٫۹	۲٫۳	۰٫۰۸	۲۵۰	۶۳٫۸	۱٫۱۳
کلروزه	۳٫۲	۰٫۳۴	۱٫۱	۱٫۶	۱٫۴	۰٫۰۶	۲۴۴	۳۰	۰٫۴۵۲

جدول٤ - تأثیر نسبتهای مختلف نمونه برگ به محلول یک درصد فنان ترولین در۲ =PH بر میزان Fe^{2+} (میلی گرم در کیلوگرم) استخراجی از برگهای سبز و کلروزه

کلروزه		سبز		
دانکن (۵ درصد)	Fe^{2+}	دانکن (۵ درصد)	Fe^{2+}	نسبت
af	۲۷/۳	af	۳۶/۲	۱:۵
bf	۳۲/۲۳	bf	۴۱/۵	۱:۱۰
ce	۳۹/۵	ce	۵۲/۵	۱:۱۵*
de	۴۴/۳	de	۵۸/۲	۱:۲۰

* تیمار برتر انتخابی * حروف مشابه جلوی میانگینها در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح۵ درصد می باشد

(۱۰ و۲۱). از این رو در غلظت‌های بالاتر، پتانسیل بیشتری برای استخراج عنصر فلزی برای عامل کیلت کننده وجود دارد (۱۰). برای انتخاب غلظت مناسب محلول فنان ترولین جهت استخراج Fe^{2+}، غلظت از ۱ تا ۲٫۵ درصد استفاده شد. بررسی جدول ۵ نشان می‌دهد که اختلاف بین Fe^{2+} استخراجی از برگ توسط محلول یک در صد فنان ترولین در نسبت ۱۵: ۱ (تیمار برتر انتخابی از جدول شماره ۴) برابر با ۱۳ و در محلول یک و نیم در صد فنان ترولین در نسبت ۱۵: ۱ (تیمار نسبت برتر) برابر با ۱۴٫۶ و در محلول فنان ترولین دو درصد نسبت ۱:۱۰ (نسبت برتر) برابر با ۱۲٫۷ و در فنان ترولین دو و نیم درصد نسبت ۱:۱۰(نسبت برتر) برابر با ۱۵٫۹ میلی گرم در کیلوگرم می‌باشد. با در نظر گرفتن آزمون تجزیه واریانس و پیش فرض حداکثر تفاوت بین Fe^{2+} استخراجی در برگهای سبزو کلروزه، بیشترین اختلاف در میزان Fe^{2+} استخراجی در۲ =pH در محلول فنان ترولین با غلظت ۲٫۵ در صد می باشد. لذا در این گروه، غلظت ۲٫۵ درصد محلول فنان ترولین به عنوان تیمار برتر انتخاب می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

لازم به ذکر است که در pH ۳و۴و۵ به ترتیب غلظت ۲، ۲/۵ و۱ درصد بعنوان تیمارهای برتر انتخاب گردیدند. شیوه انتخاب آنها نیز همانند تیمار برتر در۲ =pH می باشد.

جدول ۵- تأثیر غلظت و نسبتهای مختلف نمونه به محلول فنان ترولین در۲=pH از مراحل قبل بر تفاوت Fe^{2+} استخراجی از برگهای سبز وکلروزه

کلروزه ـ سبز	کلروزه	سبز	نسبتهای برتر انتخابی	غلظت (درصد)
	Fe^{2+} mg/kg			
۱۳	۳۹/۵	۵۲/۵	۱:۱۵	۱
۱۴/۶	۵۱/۳	۶۵/۹	۱:۱۵	۱/۵
۱۲/۷	۵۲	۶۴/۷	۱:۱۰	۲
۱۵/۹۴	۴۹/۹۶	۶۵/۹	۱:۱۰	۲/۵*

*تیمار برتر انتخابی

انتخاب برترین تیمار جهت اندازه‌گیری Fe^{2+} در برگ‌های سبز و کلروزه :

بررسی داده های جدول ۶ بیانگر این مطلب است که با کاهش pH میزان Fe^{2+} استخراجی از بافت گیاهی افزایش پیدا می‌کند که این موضوع با نتایج کاتیل و شارما، چانی[1]، لیندر و هارلی رشید و همکاران، محمد و همکاران، منگل و همکارن مطابقت دارد (۵، ۹ ،۱۲،۱۷و۲۰). افزایش در آهن استخراجی با کاهش pH ناشی از سست شدن کمپلکسهای فلزی با ترکیبات آلی می‌باشد. در pH پائین یون‌های H^{+} با یونهای فلزی برای ترکیب شدن و ایجاد کمپلکس(لیگاند شدن) رقابت می نمایند. همچنین پتانسیل کاهش بیشتری برای تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} ایجاد می گردد (۹ و۱۰). نتایج جدول ۶ بیانگر تفاوت غلظت Fe^{2+} استحصالی از برگهای سبز و کلروزه توسط تیمارهای برتر می‌باشد. تفاوت غلظت Fe^{2+} اندازه گیری شده در نمونه‌های برگی توسط تیمارهای برتر از۲۳/۰۵، ۲۱/۹۲ ،۱۷/۹و۱۵ /۹۴ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک برگ است. با توجه به پیش فرض انتخاب تیمار یا تیمارهای که بیشترین تفاوت غلظت Fe^{2+} را داشته باشند تیمار نسبت نمونه گیاهی به محلول فنان ترولین ۱:۱۰ با غلظت دو درصد و pH= ۳ در میان تیمارهای برتر به عنوان برترین تیمار جهت اندازه گیری میزان Fe^{2+} در برگ مرکبات انتخاب می شود.

انتخاب مناسبترین مدت زمان عصاره گیری:

زمان بین نمونه برداری گیاه و انجام تجزیه های شیمیائی بر میزان آهن استخراجی تاثیر می گذارد. هر چقدر این زمان طولانی‌تر باشد میزان بیشتری از آهن فرو(Fe^{2+}) به آهن فریک(Fe^{3+}) اکسیده می گردد. برای جلوگیری از این خطا نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال یافتند. تاثیر زمان عصاره گیری در زمانهای مختلف در دو آزمایش جداگانه (آزمایش دوم بعد از عدم نتیجه گیری از آزمایش اول) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج جدول ۷ نشان می‌دهد در آزمایش اول با گذشت ۱۴ ساعت بعد از اختلاط محلول فنان ترولین و نمونه های برگی، تغییرات غلظت Fe^{2+} محسوس است اما بعد از این زمان روند افزایش شدیداً کاهش می یابد. با توجه به طولانی بودن زمان ۱۴ – ۱۰ ساعت این زمان در آزمایش

1- Chaney

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦ - تفاوت غلظت Fe^{2+} استحصالی از برگهای سبز و کلروزه توسط تیمارهای برتر

کلروزه ـ سبز	کلروزه	سبز	نسبت	غلظت	pH
	$Fe^{2+}_{mg/kg}$				
۱۵٫۹۴	۴۹٫۹۶	۶۵٫۹	۱:۱۰	۲/۵	۲
۲۳/۵۰	۳۵٫۵۵	۵۸٫۹	۱:۱۰	۲	۳*
۲۱٫۹۳	۳۰٫۹	۵۲٫۸۳	۱:۱۰	۲/۵	۴
۱۷٫۹	۲۴٫۹۶	۴۲٫۸۶	۱:۲۰	۱	۵

* برترین تیمار انتخابی. (نسبت، غلظت و pH های برتر انتخاب شده از مراحل قبل می باشند.)

دوم محدود تر گردید. نتایج آزمایش دوم نشان می دهد که با گذشت ۱۲ ساعت پس از اختلاط نمونه و محلول فنان ترولین غلظت Fe^{2+} استخراجی افزایش نسبتاً چشم گیری داشته اما بعد از ۱۲ ساعت، افزایش Fe^{2+} استخراجی توسط محلول فنان ترولین قابل اغماض است. بنابراین زمان ۱۲ ساعت بعد از اختلاط نمونه‌های برگی با محلول دو درصد فنان ترولین (pH= ۳) به عنوان مناسب ترین زمان برای استخراج Fe^{2+} پیشنهاد می شود.

جدول ۷- تأثیر زمان عصاره گیری بر Fe^{2+} قابل استخراج از برگهای سبزو کلروزه توسط محلول دودرصد فنان ترولین (pH= ۳)

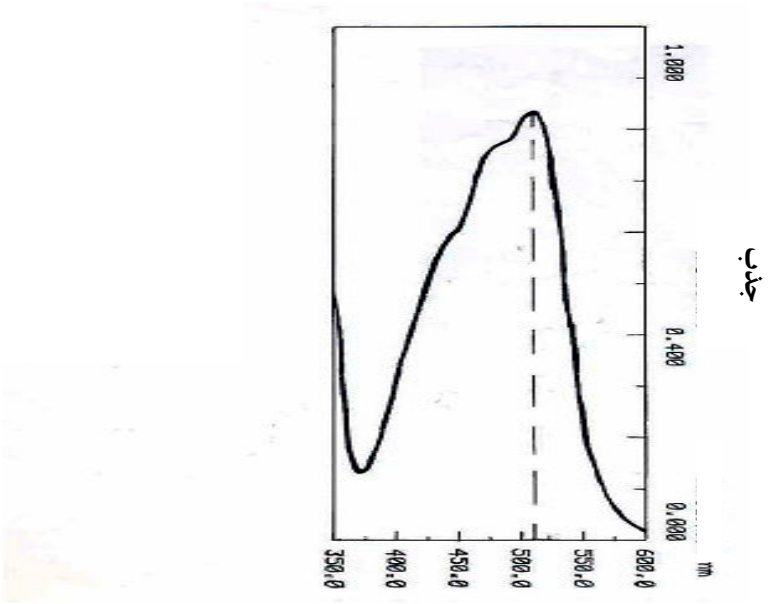
آزمایش اول									
زمان (ساعت)		۲	۴	۶	۱۰	۱۴	۱۸	۲۶	۳۰
Fe^{2+} (mg/kg)	سبز	۱۸/۵	۳۱/۹	۴۴/۲	۵۸/۱	۶۲	۶۲/۹	۶۳/۷	۴۲/۲
	کلروزه	۱۰/۵	۱۸/۲	۲۴/۷	۲۹/۸	۳۲/۴	۳۲/۹	۳۲/۳	۳۲/۴
آزمایش دوم									
زمان (ساعت)		۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۲۴	۳۰
Fe^{2+} (mg/kg)	سبز	۱۹/۲	۳۲/۷	۴۵/۷	۵۲/۲	۵۹/۷	۶۲/۴	۶۵/۴	۶۵/۸
	کلروزه	۱۱/۳	۱۹/۷	۱۴/۴	۲۷/۸	۳۰/۵	۳۲/۱	۳۲/۷۶	۳۲/۸۲

انتخاب مناسب ترین طول موج دستگاه رنگ سنجی جهت اندازه گیری Fe^{2+}:

نمودار شمارهٔ ۱ به بررسی جذب آهن دو ظرفیتی از محلول حاوی فنان ترولین، آهن دو ظرفیتی، استات سدیم یک مولار و هیدروکسید آمین هیدرو کلرید ده درصد در طول موجهای مختلف می پردازد. همانگونه که نمودار نشان می د هد حد اکثر جذب آهن دو ظرفیتی در طول موج ۵۱۰ نانومتر حاصل می گردد. محلول فنان ترولین تشکیل یک کمپلکس زرد رنگ با Fe^{3+} را می دهد که میزان جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر ناچیز است. با کاهش Fe^{3+} به Fe^{2+} رنگ زرد به رنگ قرمز نارنجی تبدیل می گردد که ماکزیمم جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر می باشد این موضوع با نتایج کاتیل و شارما (۹) در برنج هماهنگی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



طول موج

نمودار ۱- تأثیر طول موج بر میزان جذب Fe^{2+} از محلول فنان ترولین

تعیین همبستگی بین کلروفیل و Fe^{2+}:

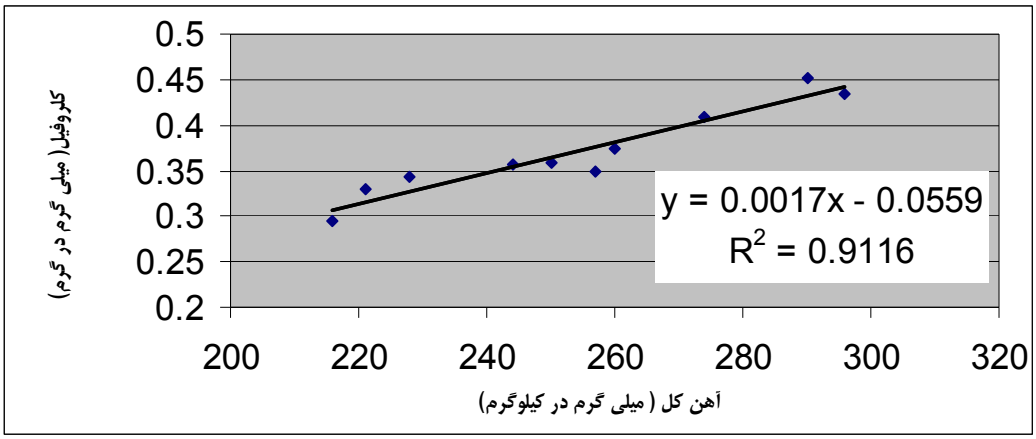
بررسی نمودار ۲و۳ نشان می‌دهد که همبستگی مثبت و معنی داری بین غلظت آهن کل استحصالی از روش هضم تر (R^2=0.91) و Fe^{2+} استخراجی توسط روش فنان ترولین (R^2=0.90) با میزان کلروفیل موجود در برگهای کلروزه وجود دارد. مقایسه این دو نمودار نشان می‌دهد که میزان کلروفیل در هر دو یکسان می‌باشد اما در غلظتهای آهن اندازه گیری شده توسط دو روش هضم تر و فنان ترولین تفاوت فاحشی دیده می شود. برای مثال میزان کلروفیل در برگهای کلروزه زمانی که این برگها دارای ۲۴ میلی گرم آهن فعال در کیلوگرم می باشد برابر با۰/۴ میلی گرم در گرم است اما در همین برگها، زمانی که دارای ۲۷۰ میلی گرم در کیلوگرم آهن کل باشد میزان کلروفیل برابر با ۰/۴ میلی گرم در گرم می‌باشد. همچنین در عصارهٔ بدست آمده از روش فنان ترولین، میزان آهن کل نیز بوسیله دستگاه جذب اتمی قرائت گردید. قرائتهای بدست آمده (جدول ۸) نشان می دهد تفاوت محسوسی بین آهن اندازه گیری شده در عصاره بدست آمده از روش فنان ترولین بوسیلهٔ دستگاه رنگ سنجی و دستگاه جذب اتمی موجود نیست و نتیجه می گردد که فنان ترولین تنها با Fe^{2+} کمپلکس ثابت و پایداری را تشکیل می دهد و فقط این بخش از آهن داخل گیاه رابطور مؤثر و قوی استخراج می کند و با فرم Fe^{3+} ترکیب نگردیده و ایجاد کمپلکس نمی کند (جدول ۸).

نتیجه گیری

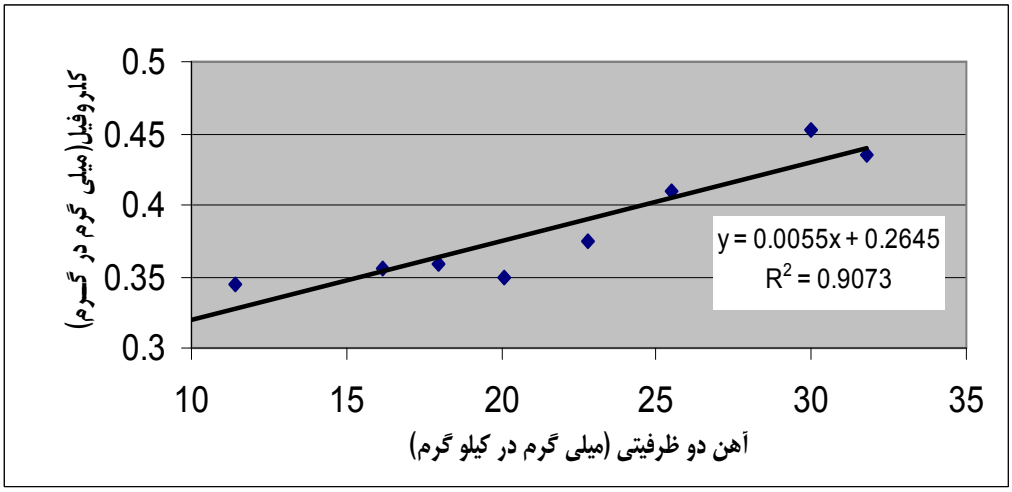
از آزمایش فوق نتیجه می گردد که قسمت اعظم آهن اندازه گیری شده توسط روش هضم تر در نمونه های برگی غیر فعال بوده و فقط بخش کوچکی از آن که شامل Fe^{2+} می‌باشد در فرآیند کلروفیل سازی شرکت می‌کند. این حالت در برگهای سبز نیز مشهود است که با نتایج کتیال و شارما، محمد و همکاران، منگل و همکاران، لیندر و هارلی، رشید و همکاران، مطابقت می‌کند (۹،۱۲،۱۵،۱۷و۲۰). از این رو می‌توان گفت که آهن اندازه گیری شده توسط روش هضم تر بوسیله دستگاه جذب اتمی نمی‌تواند شاخص قابل اعتمادی

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲- همبستگی بین آهن کل و میزان کلروفیل موجود در برگهای کلروزه



نمودار ۳- همبستگی بین آهن دو ظرفیتی و میزان کلروفیل موجود در برگهای کلروزه

جدول ۸- اندازه گیری میزان Fe^{2+} (میلی گرم در کیلوگرم) بوسیله دستگاه جذب اتمی و رنگ سنجی در عصارهٔ استحصال شده توسط محلول فنان ترولین

	کلروزه			سبز				
رنگ سنجی	۳۱/۸	۳۰	۲۲/۸	۱۸	۶۵/۸	۶۳/۵	۵۸/۸	۵۴/۳
جذب اتمی	۳۱	۳۰/۴	۲۲/۱	۱۸/۵	۶۵/۱	۶۴/۱	۵۹/۳	۵۵/۲

www.SID.ir

Archive of SID

برای تعیین حد کفایت و یا کمبود غلظت آهن فعال در برگ گیاهان باشد. پیشنهاد می‌گردد که این روش برای محصولات دیگر مورد آزمایش قرار گیرد و حد بحرانی Fe^{2+} با این روش در مرکبات و دیگر گیاهان تعیین گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت، مدیر و شورای محترم دانشگاه شهید چمران اهواز که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. امامی، ع. ۱۳۷۵. روشهای تجزیه گیاه. نشریه فنی شماره۹۸۲. چاپ اول، مؤسسهٔ تحقیقات خاک و آب. ۲۷ ص.

۲. سالاردینی، ع. ا. ۱۳۷۱. حاصلخیزی خاک، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران،۴۴۱ ص.

۳. ملکوتی، م. ج و تهرانی، م. م. ۱۳۷۸. نقش ریز مغذیها در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی (عناصر خرد با تاثیر کلان) دانشگاه تربیت مدرس، دفتر نشر آثار علمی ۲۹۹ ص.

4. Abadia, J., Florlopez, A., Rombola, A., and Abadi, A. 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. Plant and Soil Journal, 241: 75 - 86

5. Chaney, R. L. 1984. Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants.Journal of Plant Nutrition, 7:47-67.

6. Dekock, P. C., Hali, A., and Inkoson, R. H. E. 1980. Active iron in plant leaves. Annual, Botony, 43:734-740.

7. Gonzalez-Vallejo, E. B., Morales, F., Istue, L., Abadia, A., and Abadia, J. 2000. Iron deficiency decrease the Fe^{3+} chelate reducing activity of leaf protoplasts. Plant Physiology Journal, 122: 337 – 344.

8. Kalbasi, M., Filsoof, F., and Rezai-Nejad, Y. 1988. Effect of sulphur treatments on yield and uptake of Fe, Zn, and Mn by corn, sorghum, and soybean. Journal of Plant Nutrition, (6-11): 1353-1360.

9. Katyal, J. C, and Sharma, B. D. 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis. Journal of Plant and Soil, 55: 105-119.

10. Kosegarten, H. U., Hoffman, B. H., and Mengel, K. 1999. Apoplastic pH and Fe^{3+} reduction in intact sunflower leaves. Plant Physiology Journal, 121: 1069 – 1079.

11. Koseoglu, A. T., and Acikgoz, V. 1995. Determination of iron chlorosis with extractable iron analysis in peach leaves. Journal of Plant Nutrition, 18 (1):135-161.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Linder, R. C., and Harley, C. P. 1994. Nutrient interrelation in lime induced chlorosis. Plant Physiology Journal,19:420-439.

13. Lindsay, W. L., and Schwab, A. P. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plant. Journal of Plant Nutrition. 5:821-840.

14. Longnecher, N. 1988. Iron nutrition of plants. Journal of Plant Science, 1:143-150.

15. Mengel, K., Planker, R., and Hofman, B. 1994. Relationship between leaf appoplastic pH and iron chlorosis of sunflower (*Heliamthus annuus L.*). Journal of Plant Nutrition. 17:1053-1065.

16. Miller, G. W., Pushink, J. C., and Welki, G. W. 1984. Iron chlorosis, a worldwide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. Journal of Plant Nutrition, 7: 1-22.

17. Mohammad, M. J., Najim, H., and Khresat, S. 1998. Nitric acid and o-phenanthroline extractable iron for diagnosis for iron chlorosis in citrus lemon trees. Journal of Plant Nutrition, 29(788): 1035-1043.

18. Morales, F., Grasa, R., and Abadia, J. 1998. Iron chlorosis paradex in fruit tree. Journal of Plant Nutrition, 21(4):815-825.

19. Nikolic, M., and Romheld, V. 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: Is Fe inactivation in leaf a course of Fe deficiency chlorosis? Plant and Soil Journal, 215: 229 – 237.

20. Rashid, A., Rafique, J., Din, J., Malik, S. N, and Arain, M. Y. 1997. Micronutrient deficiencies in rainfed calcareous soils of Pakistan.1. Iron chlorosis in peanut plant. J. Plant Nutrition, 28(182):135-148.

21. Ruzicka, J., and Hansen, E. H. 1992. Flow injection analysis. Principles, application and trends. Analytica Chimica Acta, 114: 19-44.

22. Sanz, M., Perez, J., Pascual, J., and machin, J. 1998. Prognesis of Iron chlorosis in apple trees by floral analysis. Journal of Plant Nutrition, 21 (8):1697-1703.

23. Shi, Y., Byine, D. D., and Red, D. W. 1993. Influence of bicarbonate level on iron chlorosis development and nutrient uptake of the peach rootstook. Journal of Plant Nutrition, 16(9): 1675-1689.

24. Sillen, L .G., and Mortell, H. E. 1971. Stability constants of metal iron complexes. Special publication, No.25. the Chemical Society. Barlington House. London, pp: 125-185.

25. Terry, N., and Abadia, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. Journal of plant Nutrition, 9: 609-649.

26. Westermann, R. L. 1990. Soil testing and plant analysais. Third edition. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA, pp: 200-256.

www.SID.ir