

## اثر کلات‌های آهن و روش کاربرد آن‌ها بر وضعیت تغذیه‌ای آهن گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) در یک خاک آهنکی

آتنا میربلوک<sup>۱</sup>، میرحسن رسولی صدقیانی<sup>۲\*</sup>، ابراهیم سپهر<sup>۳</sup>، امیر لکزیان<sup>۴</sup>، محمد حکیمی<sup>۵</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۶)

### چکیده

شناسایی و ساخت کلات‌های آلی نوین آهن با کارایی بیشتر نسبت به کلات‌های سنتزی رایج، برای بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن در خاک‌های آهنکی ایران، ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، ابتدا کلات‌های اسیدآمینه تیروزین-آهن (Fe-Tyr) و کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی-آهن (Fe-Chi) با روش‌های آزمایشگاهی ساخته و سپس برخی از ویژگی‌های آنها شناسایی شد. آزمایشی گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی، با سه تکرار طراحی شد. فاکتورهای آن شامل سه نوع کلات آهن، Fe-Tyr، Fe-Chi و Fe-EDDHA (شاهد) و سه روش مصرف خاکی، کود آبیاری و محلول‌پاشی بر روی گیاه لوبیا بودند. گیاهان تا تولید دانه رشد کردند و برخی پارامترهای رشدی گیاه و مقدار آهن کل در شاخسار و ریشه تعیین و فعالیت آنزیم‌های Ferric Chelate Reductase (FCR) ریشه و برگ اندازه‌گیری شدند. نتایج داده‌های آزمایشگاهی و نظری نشان دادند که بین اسید آمینه تیروزین و کیتوسان به عنوان لیگاند و فلز آهن، کمپلکس تشکیل شده است. نتایج نشان دادند که بیشترین وزن خشک شاخسار گیاه در روش مصرف خاکی Fe-Chi و کود آبیاری Fe-Tyr مشاهده شد. همچنین، مصرف کود آبیاری Fe-Chi، وزن خشک ریشه را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد. بیشترین مقدار آهن کل (۱۰/۳ میلی گرم در گلدان) با کاربرد Fe-Chi به صورت مصرف خاکی در شاخسار گیاه لوبیا مشاهده شد که نسبت به Fe-EDDHA، ۳۶ درصد جذب آهن بیشتری را نشان داد. رابطه متقابل مثبت و معنی‌داری بین وزن خشک شاخسار و مقدار آهن و نیتروژن در شاخسار گیاه لوبیا مشاهده شد. کاربرد خاکی Fe-Chi و کود آبیاری Fe-Tyr، بیشترین میاتگین فعالیت FCR ریشه را نشان دادند. در روش‌های محلول‌پاشی و کود آبیاری Fe-Tyr، فعالیت FCR برگ تا روز ۴۰ام از شروع آزمایش روند صعودی داشت. مصرف خاکی کلات Fe-Chi و محلول‌پاشی Fe-Tyr در طول دوره رشد گیاه، وضعیت تغذیه‌ای آهن را در گیاه لوبیا را بهبود بخشید.

**واژه‌های کلیدی:** اسیدآمین، کلات، کودآبیاری، کیتوسان، محلول‌پاشی، مصرف خاکی

میربلوک آ، رسولی صدقیانی م، سپهر ا، لکزیان ا، حکیمی م. ۱۳۹۹. اثر کلات‌های آهن و روش کاربرد آن‌ها بر وضعیت تغذیه‌ای آهن گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) در یک خاک آهنکی. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۸، شماره ۳. صفحه: ۱۰۹-۱۲۸.

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه (مکاتبه کننده)

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

۴- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵- استاد گروه شیمی معدنی، دانشگاه پیام نور مشهد

\* پست الکترونیک: [m.rsadaghiani@urmia.ac.ir](mailto:m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)

## مقدمه

می یابد. بنابراین، احیای دوباره آهن از کمپلکس های سیترات- $Fe^{3+}$ ، در سلول های مزوفیل برگ و به کمک آنزیم FCR برگ انجام می شود ( de la Guardia & Alcázar, 1993; Brüggenmann *et al.*, 1996). مطالعات نشان داده است که فعالیت آنزیم FCR برگ نیز اغلب در گیاهان دارای تنش آهن، کمتر از گیاهانی است که آهن را به حد کافی دریافت کرده اند ( de la Guardia & Alcázar, 1996). بنابراین، گیاهانی که مقدار کافی آهن دریافت کنند، فعالیت FCR در ریشه و برگ آنها به میزان کافی اتفاق می افتد و این آنزیم می تواند به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی، وضعیت تغذیه ای آهن را در گیاه نشان دهد.

برای جبران کمبود آهن در گیاهان، از انواع ترکیبات کلات کننده سنتزی آهن مثل EDTA، DTPA و EDDHA استفاده می شود (Vadas *et al.*, 2007). این کلات ها قابلیت دسترسی و زیست فراهمی آهن را در ناحیه ریزو سفر گیاه افزایش می دهند، اما مضراتی دارند که استفاده از آنها را محدود می کند. در کاربرد محلول پاشی، کلات های سنتزی می توانند یون های کلسیم موجود در دیواره سلولی گیاه را به دام ببندازند و منجر به تخریب بافت برگ گیاه شوند (Metsärinne *et al.*, 2004). از دیگر مشکلات کلات های سنتزی، تجزیه نوری سریع آنها است (Svenson *et al.*, 1989). هانگارت و استاسینوپولوس (Hangarter & Stasinopoulos, 1991) مشاهده کردند که Fe-EDTA و Fe-DTPA در مقابل نور سفید به ترتیب در طول مدت ۸ و ۱۱ دقیقه به ترکیبات گلیو زایلک اسید و شکل دهید تجزیه می شوند و این دو ترکیب ممانعت کننده از رشد گیاه می باشند. مضرات کلات کننده های سنتزی و اهمیت سلامت محیط زیست، تحقیقات را به سوی استفاده از کلات کننده های آلی و دو ستار محیط زیست پیش برده است. از اسیدهای آمینه و ترکیبات جدیدی نظیر کیتوسان، ابتدا در مطالعات پژوهشی به منظور حمل دارو در بدن انسان استفاده شد (Bernkop-Schnürch *et al.*, 2012). بعد از آن، کاربرد اسیدهای آمینه در ساخت کود های جدید برای گیاهان مورد توجه قرار گرفت (Zhou *et al.*, 2007). زیرا این ترکیبات دارای گروه های واکنش پذیر آمین و کربوکسیل در ساختارشان هستند

در مناطقی از دنیا مثل ایران که اکثر خاک ها آهنی می باشند، گیاهان به دلیل کمبود ماده آلی، pH های حدود ۷/۵ تا ۸/۵ و غلظت بالای بیکربنات در خاکها، با مشکل عدم جذب عناصر کم مصرف مثل آهن مواجه هستند و افزایش فراهمی آهن قابل جذب برای این گیاهان، ضروری می باشد. با توجه به اهمیت تغذیه آهن و نقش مهم آن در واکنش های سلولی گیاه مثل ساخت کلروفیل، تولید کلروپلاست و فرآیندهای آنتی اکسیدانی سلول (Marschner & Römhild, 1994)، گیاهان به مکانیسم های ویژه ای برای بدست آوردن آهن از شکل های غیر محلول آن در خاک، مخصوصاً خاک های قلیایی و خنثی نیاز دارند (Lucena, 2000). گیاهان از دو استراتژی مختلف برای جبران کمبود آهن استفاده می کنند که شامل استراتژی I و استراتژی II می باشند (Marschner, 1995). گیاهان دارای استراتژی II، ترکیباتی را بیوسنتز می کنند که می توانند به عنوان کلات کننده برای  $Fe^{3+}$  عمل کرده و آهن را به وسیله ناقلین مخصوص موجود در سطح غشاء ریشه، وارد گیاه کنند. گیاهانی مثل لگومها، از این شیوه برای کمک به تامین آهن استفاده می کنند. در گیاهان دارای استراتژی I، یکی از معمول ترین پاسخ های فیزیولوژیکی، تحریک شدن در شرایط کمبود آهن است که در این حالت، فعالیت آنزیم تحریک پذیر  $Fe^{3+}$  کلات رداکتاز (FCR) در غشاء پلاسمایی سلول های ریشه افزایش می یابد. تحریک آنزیم FCR در پاسخ به شرایط کمبود آهن، در تعداد زیادی از گیاهان شامل درختان میوه مثل هلو (Romera *et al.*, 1991)، مرکبات (Manthey *et al.*, 1994)، آووکادو (Manthey *et al.*, 1994)، آفتابگردان (Kosegarten *et al.*, 1999) و انگور (Smith & Cheng, 2007) مطالعه شده است. از طرفی، برخی از مطالعات نشان دادند که فعالیت FCR ریشه اغلب در گیاهان دارای تنش آهن نسبت به گیاهانی که آهن را به حد کافی دریافت کرده اند، کمتر است (Rombolà *et al.*, 1991; Romera *et al.*, 2000a). همچنین، بعد از جذب آهن توسط سلول های ریشه، آهن دوباره اکسید می شود و به صورت کمپلکس های سیترات- $Fe^{3+}$  در گیاه انتقال

کاربرد آنها به صورت کلات می‌تواند علاوه بر تامین عنصر مورد نیاز گیاه، شرایط را برای بهبود رشد و عملکرد گیاه نیز مناسب سازد. تحقیقات نشان داده‌اند که همبستگی مثبت و معنای داری بین میزان نیتروژن و آهن در گیاه وجود دارد (Çakmak *et al.*, 2004) و حتی بررسی‌های مولکولی، تحرک دوباره آهن را از بافت‌های سبز گیاه و انتقال آنها را به دانه با افزایش میزان نیتروژن در گیاه تایید کرده‌اند (Waters *et al.*, 2009). بنابراین، استفاده از ترکیبات نیتروژنی به عنوان کلات‌کننده آهن، می‌تواند به بهبود شرایط تغذیه‌ای آهن در گیاه مخصوصاً در خاک‌های آهنکی کمک کند.

این مطالعه در شرایط گلخانه‌ای برای ارزیابی کاربرد خاکی، محلول‌پاشی و کود آبیاری کلاتهای آلی کیتوسان به شکل هیدرولیز شده (Hydrolyzed Chitosan) و اسید آمینه تیروزین (Tyrosine) به عنوان کلات‌کننده‌های آهن در مقایسه با کلات سنتزی Fe-EDDHA بعنوان شاهد، به منظور بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن در گیاه لوبیا انجام شد. به منظور ارزیابی کارایی کلات‌های آلی ساخته شده در گیاه، روند تغییرات فعالیت آنزیم FCR برگ و ریشه در طول دوره رشد گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### آماده سازی کلات کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی - آهن (Fe-Chi)

برای تهیه کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی، پودر کیتوسان (Medium Molecular Weight-Aldrich) در ۱ M HCl مولار حل شد و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سیلسیوس حرارت داده شد. کیتوسان هیدرولیز شده با اتانول در نسبت ۱ : ۳ (V/V) ر سوب داده شد. سپس با فرآیند مکش، در حضور هیدروکسید سدیم خشک شد (Kulikov *et al.*, 2012). به منظور آماده‌سازی کلات کیتوسان هیدرولیز شده با فلز آهن، ۰/۳ گرم کیتوسان هیدرولیز شده با  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  در نسبت مولاری ۴ به ۱ در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک (۵٪) حل شده، سپس با اضافه کردن  $NH_3 \cdot H_2O$ ، pH محلول به ۷ افزایش داده شد. مخلوط در دمای ۸۰ درجه

که می‌توانند فلزات را به صورت کلات نگهداری کنند و همچنین سمیت کم، حساسیت کم به تجزیه نوری و تاثیر مثبت آن‌ها روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاکها و شاخص‌های رشد گیاه، این ترکیبات را به منظور کاربردهای کشاورزی دارای اهمیت کرد (Jones & Hodge, 1999). تحقیقات نشان داده است که تجزیه پذیری کمپلکس‌های اسیدهای آمینه با فلزات، بسیار کمتر از اسیدهای آمینه آزاد است و این کمپلکس‌ها می‌توانند نیمه عمر بیشتری در خاک داشته باشند (Renella *et al.*, 2004). قاسمی و همکاران (Ghasemi *et al.*, 2012) کلات‌های اسیدهای آمینه-آهن را در محیط کشت محلول استفاده و گزارش دادند که کاربرد این کلات‌های آلی، منجر به افزایش رشد و عملکرد گیاه گوجه فرنگی و همچنین افزایش مقدار آهن در شاخسار و ریشه گیاه شد. کیتوسان جزو خانواده پلی ساکاریدهای مشتق شده از کیتین می‌باشد که همچون اسیدهای آمینه دارای گروه‌های عامل فعال برای ایجاد پیوند با فلزات است. کیتوسان تا به امروز بیشتر در افزایش قابلیت دسترسی داروها در بدن انسان (Prabaharan & Mano, 2004) و کاهش آلودگی‌های آب‌های طبیعی از فلزات سنگین به عنوان جاذب (Kang *et al.*, 2003)، مورد استفاده بوده است. در بخش کشاورزی، تحقیقات نشان داده است که کاربرد کیتوسان منجر به افزایش شاخص‌های رشد گیاه (Lowe *et al.*, 2012) و افزایش مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها و عوامل میکروبی شده است (Kulikov *et al.*, 2012). ولی تاکنون از کیتوسان به عنوان عامل کلات‌کننده فلزات کم مصرف همچون آهن در بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه استفاده نشده است. برخی ویژگی‌های کیتوسان مثل وزن مولکولی بالا و حلالیت کم آن در آب، استفاده از آن را به عنوان عامل کلات‌کننده فلزات و کاربری کشاورزی محدود می‌کند. ولی کیتوسان می‌تواند طی فرآیند هیدرولیز به زنجیره‌های کوتاه و با حلالیت بالاتر دپلمریزه شود (Hudson *et al.*, 2002). مطالعات نشان داده است که هیدرولیز اسیدی کیتوسان یک راهکار موثر در افزایش گروه‌های فعال و کاهش وزن مولکولی کیتوسان است (Il'Ina *et al.*, 2004). همچنین، اسیدهای آمینه و کیتوسان دارای ساختار نیتروژنی هستند که

به دست آمده حاصل می شود. برای تعیین غلظت آهن در گیاه، یک گرم ماده خشک گیاه در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس خاکستر شد، سپس ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن افزوده شد. سپس نمونه حل شده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شد و حجم محلول صاف شده با آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. غلظت آهن با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer 3030, USA تعیین شد. عملکرد واکنش یعنی مقدار محصول بدست آمده در یک واکنش شیمیایی که بر حسب گرم یا به صورت مول بیان می شود. در صد عملکرد در واقع کارایی فرآیند سنتز را نشان می دهد و از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$\text{Percent yield} = \frac{\text{actual yield}}{\text{theoretical yield}} \times 100 \quad (1)$$

که عملکرد نظری با استفاده از محاسبات استیکیومتری بر اساس تعداد مول های شرکت کننده در واکنش محاسبه می شود (Tietze, 1996). اندازه کلاتها با استفاده از نرم افزار Hyperchem تعیین شد.

عناصر به شکل محلول و کمپلکس شده با فلز آهن به روش ویلن و همکاران (Villen et al., 2007) و فرکشن کمپلکس شده بر اساس رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{Complexed fraction} = \frac{\text{complexed}}{\text{soluble}} \times 100 \quad (2)$$

pH محلول و pH شروع رسوب در ترکیبات با استفاده از pH متر مدل Metrohm 691, Switzerland و استفاده از محلول های هیدروکسید سدیم و هیدروکلریک اسید تعیین شدند. نتایج حاصل از بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کمپلکسها در جدول ۱ نشان داده شده است.

سلسیوس به مدت ۳ ساعت حرارت داده شد و بعد از سرد شدن در دمای اتاق، با ۲۰۰ میلی لیتر استون خالص خشک شد و پودر سفید رنگ کلات کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی با آهن (Fe-Chi) بدست آمد (Wang et al, 2004).

#### آماده سازی کلات تیروزین-آهن (Fe-Tyr)

اسید آمینه تیروزین (Tyr) به عنوان لیگاند با نمک  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  با نسبت مولاری ۲ به ۱ مخلوط شدند. مخلوط در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت روی هیتر قرار گرفت. کلات تیروزین-آهن با استفاده از اتانول ۹۵ درصد و هواخشک شدن، تهیه شد (Nomiya & Yokoyama, 2002).

#### تعیین ویژگی های کلات های آلی - آهن

اسپکترو سکوپي IR با استفاده از دستگاه FT-IR مدل Shimadzu 8400 در دامنه  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ با صفحه KBr انجام شد. مقدار کربن، نیتروژن و اکسیژن ترکیبات با استفاده از دستگاه elemental analyzer Thermo Finnigan Flas 1112EA اندازه گیری شدند. در این روش، نمونه مورد نظر در دستگاه قرار داده می شود و بر اثر فرآیند احتراق گازی، کربن به کربن دی اکسید، هیدروژن به آب، نیتروژن به گاز نیتروژن یا اکسید نیتروژن تبدیل می شود. محصولات احتراق توسط گاز حامل خنثی مانند هلیوم، به محفظه احتراق فرستاده شده و نهایتاً از مس با خلوص بالا عبور می کنند. عملکرد مس زدودن اکسیژن مصرف نشده در احتراق و تبدیل اکسید نیتروژن به گاز نیتروژن است. سپس گاز از تله های جذب کننده عبور کرده، به طوری که فقط کربن دی اکسید، آب و نیتروژن از آن عبور کنند. در نهایت اندازه گیری کمی بر اساس انتگرال گیری از سیگنال

جدول ۱- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی کمپلکس های آهن استفاده شده در آزمایش

Table 1. Some physical and chemical characteristic of iron complexes used in the experiment

Compound	Color	Solution pH <sup>a</sup>	precipitation pH	Soluble element (g kg <sup>-1</sup> )	Complexed element (g kg <sup>-1</sup> )	Complexed fraction (%)
Fe-chitosan	Dark Brown	3.5	5.5	44.31	43.42	98
Fe-tyrosine	Light green	3.6	6.5	14.21	7.10	50

فاکتور دوم سه روش کاربرد کودها شامل مصرف خاکی، محلول پاشی و کودآبیاری با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. گیاهان لوبیا (*Phaseolus Vulgaris*) در شرایط گلخانه ای تحت

#### طراحی آزمایش

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول سه تیمار Fe-, Fe-Tyr و Chi و Fe-EDDHA به عنوان منابع کودی عنصر آهن و

محلول ۰/۲۵ درصد (w/v) از کودهای آهن تهیه گردید و طی سه مرحله در زمان ۴ برگی شدن، در شروع گلدهی و در شروع تشکیل غلافها روی برگهای گیاه اسپری شد. جهت جلوگیری از آسیب دیدگی برگها، عمل اسپری کردن در اواخر بعد از ظهر انجام شد. بعد از رسیدگی کامل گیاه و تولید دانه، گیاهان لوبیا از هر گلدان به طور جداگانه برداشت شدند. ابتدا وزن خشک شاخسار و ریشه گیاه اندازه گیری شدند. به منظور تعیین غلظت عنصر آهن، شاخسار و ریشه گیاه به طور جداگانه جداسازی و بعد از شستشو با آب مقطر، در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. نمونههای خشک شده پودر شدند و در کوره الکتریکی و دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس خاکستر شدند. برای تعیین غلظت آهن کل در بخشهای مختلف گیاه لوبیا، خاکستر آن در اسید کلریدریک ۲ مولار و با کمک حرارت هضم شد و پس از رساندن به حجم مشخص، مقادیر آهن در نمونهها با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer 3030, USA تعیین شدند (Pratt 1961 & Chapman).

## جدول ۲- ویژگیهای خاک مورد مطالعه

Table 2. Characteristic of studied soil

Property	Unit
EC <sub>e</sub> <sup>a</sup> (dS m <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.7
pH (H <sub>2</sub> O)	7.8
SAR <sup>b</sup>	3.2
Sand (%)	76
Clay (%)	12
CaCO <sub>3</sub> (%)	14
Organic C (g kg <sup>-1</sup> )	2.1
Total N (mg kg <sup>-1</sup> )	0.06
DTPA-extractable Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	2.1

Electrical conductivity

<sup>b</sup> Sodium adsorption ratio

## اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز برگ

برای سنجش آنزیم کاتالاز، از برگ تازه گیاه استفاده شد. مقدار ۰/۲۵ گرم نمونه گیاهی در نیتروژن مایع آسیاب و ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH=7.8) حاوی تراپتون (۱٪ w/v) به آن اضافه شد. نمونهها به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردیدند. محلول صاف رویی استخراج و برای اندازه گیری

سیستم سرمایشی و نور روزانه طبیعی رشد کردند. برای آماده سازی محیط رشد، ابتدا خاک آهکی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متری از نقطه ای با مختصات جغرافیایی 36°18'36.2"N 59°31'48.1"E در مشهد با pH= 7.8 انتخاب شد. قبل از کاشت، نمونه ای از خاک برداشت شد و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی متری، برای آنالیزهای اصلی خاک ذخیره شد. ویژگیهای خاک در جدول ۲ نشان داده شده است. در نمونههای خاک، بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1936)، pH در نسبت ۱ به ۵ خاک به آب با pH متر مدل Metrohm 691, Switzerland (Al-Busaidi, 2005) و در عصاره اشباع خاک با EC متر مدل Metrohm Ohm-644, Switzerland (Bruckner, 2012) اندازه گیری شدند. درصد کربنات کلسیم به روش خنثی سازی با اسید کلریدریک (Elfaki et al, 2016)، درصد کربن آلی به روش اکسیداسیون تر (Walkley, 1947) و غلظت نیتروژن با استفاده از هضم کج لادال (Bremner & Mulvaney, 1982) اندازه گیری شدند. غلظت آهن قابل دسترس در خاک با استفاده از روش عصاره گیری با روش DTPA-TEA تعیین شد (Lindsay, 1972). غلظت پایین آهن قابل دسترس در خاک در عصاره گیری با DTPA (2.1 mg kg<sup>-1</sup>) نشان داد که خاک در شرایط کمبود شدید عنصر آهن است. برای آماده سازی گلدانها، ۴ کیلوگرم خاک به گلدانهایی با ارتفاع ۴۰ سانتی متر و قطر دهانه ۳۰ سانتی متر افزوده شد. قبل از کاشت بذور، با توجه به آزمون خاک و نیاز گیاه لوبیا، کودهای شیمیایی اوره (N)، فسفات آمونیوم (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) و نترات پتاسیم (K<sub>2</sub>O) طبق توصیه های عمومی به هر گلدان اضافه و مخلوط شدند. سپس بذور لوبیا با آب اکسیژنه ضد عفونی گردیده و در گلدانها کشت شدند. در روش مصرف خاکی، بعد از کاشت دانه در گلدان، کودهای آهن به صورت محلول و با غلظت ۴۰ کیلوگرم در هکتار (معادل با ۲۰ میلی گرم آهن در کیلوگرم خاک) و به یکباره به کمک سرنگ در نزدیکی دانه تزریق شدند. در روش کود آبیاری، کودهای آهن با همان غلظت طی سه مرحله شامل در ابتدای کاشت، قبل از گلدهی و در شروع تشکیل غلافها و همراه با آب آبیاری به گلدانها اضافه شدند. در روش محلول پاشی، به میزان ۱۰ میلی لیتر برای هر گلدان،

## اندازه گیری فعالیت آنزیم FCR ریشه

فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در ریشه نیز به روش چنری و همکاران (Chanery *et al.*, 1972) انجام شد. نوک ریشه های سفید در دوره های زمانی گفته شده با طول حدود یک سانتی متر از هر گیاه انتخاب شدند و برای حدود ۵ دقیقه در ظرفی حاوی آب و یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. ریشه ها وزن شدند و حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت تازه آنها در ظروف اندازه گیری قرار گرفتند. سپس، طبق روش گفته شده در بالا به مدت ۵ دقیقه در ۲ میلی لیتر  $\text{CaSO}_4 \cdot 0.2$  مولار قرار گرفتند. سپس محلول بافر MES به آنها اضافه شد. نمونه ها در محلول بافر در تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت در یک شیکر با دور ۵۰ rpm قرار گرفتند. فعالیت FCR با استفاده از روش فوق در وزن تازه ریشه ها تعیین گردید (Chaney *et al.*, 1972).

## تحلیل آماری

مقایسه میانگین و آنالیز واریانس فاکتورهای آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS در سه تکرار انجام شد و میانگین ها در سطح معنی داری  $p < 0.05$  با آزمون Tukey HSD مقایسه و نمودارها با کمک نرم افزار Excel رسم شدند.

## نتایج و بحث

## ویژگی های کلات های سنتزی آهن

داده های نظری مربوط به سنتز کلات های تیروزین-آهن و کیتوسان-آهن در جدول ۳ نشان داده شده است. اسید آمینه تیروزین با  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  با نسبت مولاری ۲ به ۱ و کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی با  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  با نسبت مولاری ۴ به ۱ و با عملکرد بیش از ۸۰ درصد ساخته شدند. ساختار فرضی کلات های ساخته شده در شکل ۱ نشان داده شده است. به منظور تایید تشکیل کمپلکس بین لیگاند آزاد و فلز آهن، طیف های IR ترکیبات شناسایی شدند اسیدهای آمینه و کیتوسان در حالت کریستالی به صورت یون های دوقطبی با چند گروه عامل هستند و بر روی طیف IR این ترکیبات نشان می دهند که فرکانس های غالب برای لیگاندهای

فعالیت آنزیم کاتالاز آماده شدند (Kang *et al.*, 2003). فعالیت آنزیم کاتالاز با روش کک مک و مارشسرن (Calmak & Marschner, 1992) اندازه گیری شد. کل حجم مخلوط به کار رفته برای اندازه گیری (۳ میلی لیتر) شامل بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH=7) و پروکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی استخراج شده شروع شد و فعالیت آنزیم با ناپدید شدن پروکسید هیدروژن، در مدت زمان ۷۰ ثانیه و در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه طیف سنج اندازه گیری شد.

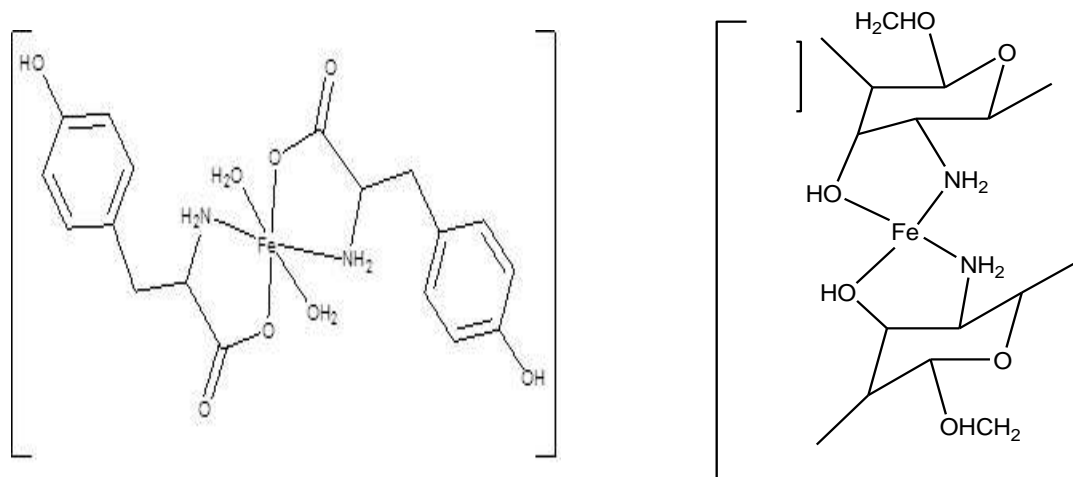
## اندازه گیری فعالیت آنزیم FCR برگ

فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (FCR) در برگ گیاهان با استفاده از روش چنری و همکاران (Chanery *et al.*, 1972) تعیین شد. برای این منظور، برگ های تازه و نوک هر گیاه در طول دوره رشد گیاه جداسازی شدند. اولین نمونه، پس از باز شدن اولین برگ گیاه برداشته شد و بعد از آن به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز بعد نیز نمونه برداری از برگ انجام شد. پس از هر بار نمونه برداری، برگ ها به آزمایشگاه منتقل و وزن شدند و تقریباً ۱۰۰ میلی گرم برگ تازه انتخاب و در لوله های آزمایش حاوی  $\text{CaSO}_4 \cdot 0.2$  میلی مولار برای مدت ۱۰ دقیقه شناور شدند. سپس، این محلول با ۲ میلی لیتر محلول استاندارد شامل بافر MES  $0.2$  میلی مولار [2- [4-Morpholino) - ethane sulfonic acid]، با pH=5.5،  $\text{Fe}^{+3}$ -EDTA ۰/۱ مولار،  $\text{CaSO}_4$  ۱۰ میلی مولار و سدیم باتو فنانترولین دی سولفونیک اسید ۰/۳ میلی مولار [Na-BPDS] جایگزین شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در نور قرار داده شدند. سپس در یک شیکر درون آب گرم در دمای ۲۳ درجه سلسیوس با دور ۵۰ rpm به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. بعد از آنکوباسیون، ۱ میلی لیتر از محلول درون هر لوله آزمایش برداشته شد و مقدار  $\text{Fe}^{+2}$ -Na-BPDS با روش اسپکتروسکوپی در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت غلظت  $\text{Fe}^{+2}$ -BPDS با استفاده از ضریب مولاری  $22/14 \text{ mM cm}^{-1}$  تعیین شد و فعالیت FCR با استفاده از وزن تازه برگ ها تعیین شدند (Chaney *et al.*, 1972).



جدول ۳- ویژگی های ساختاری کلات های آلی آهن  
Table 3. Structural characteristics of Fe Organic Chelates

(Organic Fe chelates)	(Molecular weight)	Size of chelate (nm)	(Yield)	(% ) Found (calculated)		
				C	H	N
Fe(Chi) <sub>2</sub> hyd-a	564.14	1.72	85.2	43.12 (44.28)	7.70 (7.45)	6.96 (6.01)
[Fe(Tyr) <sub>2</sub> ].(SO <sub>4</sub> ).0.5H <sub>2</sub> O	704.48	1.25	81.36	46.17 (46.03)	6.33 (4.86)	5.81 (5.96)

شکل ۱- ساختار فرضی کلات های Fe-Tyr و Fe-Chi  
Figure 1. Possible structure of Fe-Tyr and Fe-Chi

تغییرات در فرکانس پیوندهای گروه های آمین و کربوکسیل نشان دهنده واکنش فلز آهن با این گروه های عامل در ترکیبات آلی می باشد (Caiqin *et al*, 2002). باندهای ویریشنال مشاهده شده برای گروه های  $\nu$  (C=O)، در لیگاندهای آزاد در محدوده 1600 – 1625  $\text{cm}^{-1}$  و کلات های این ترکیبات با آهن در محدوده 1570-1593  $\text{cm}^{-1}$  مشاهده شدند. کاهش در فرکانس گروه های کربوکسیل در ترکیبات آلی نشان دهنده تشکیل کمپلکس بین گروه های کربوکسیل با فلز آهن می باشد. به طور کلی، تغییرات فرکانس در محل پیوندها نشان می دهند که گروه های آمین و کربوکسیل در ترکیبات آلی در تشکیل کمپلکس، با فلز آهن درگیر هستند. داده های آنالیتیکی موجود در جدول ۳ نیز نشان می دهد که ویژگی های اسپکتروسکوپی و نظری مطابق با هم هستند.

آزاد با پیوندهای  $\nu_s$  (Coo<sup>-</sup>),  $\nu_a$  (Coo<sup>-</sup>),  $\delta_s$ ,  $\delta_d$  (NH<sub>2</sub>),  $\nu_s$  (CNN) و  $\nu_a$  (CNN) همراه است (Nakamoto & Nakamoto, 1977). یعنی بیشتر مکان های پیوند در گروه های آمین و کربوکسیل در روی این ترکیبات اتفاق می افتد. به طور کلی اسیدهای آمینه و کیتوسان به صورت لیگاندهای دودندانه عمل می کنند و با یک اتم اکسیژن و یک اتم نیتروژن، با فلزات پیوند می دهند. پیوندهای IR انتخاب شده برای لیگاندهای آزاد و کلات های آنها با فلز آهن در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که الگوی جذب مشابهی بین لیگاندهای آزاد و همراه با فلز آهن در محدوده 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  وجود دارد. برای گروه های -NH<sub>2</sub> پیوندهای ویریشنال در کلات های آلی با فلز آهن در محدوده 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  مشاهده شدند که این پیوندها به واکنش های بین مولکولی در حالت جامد بسیار حساس بوده و به طور گسترده ای پیک های واضح نشان می دهند.

جدول ۴- باندهای IR انتخابی اسیدهای آمینه و کیتوسان با آهن (دیسک KBr)  
Table 4. Selected IR bands (cm<sup>-1</sup>) of amino acids and chitosan with Fe (KBr disk)

	$\nu$ (NH <sub>2</sub> )	$\nu$ (C=O)	$\nu$ (C-O)	$\nu$ (C-N)	$\delta$ (C=O)
Chitosan	3244.6	1600.7	1500.7	1099.3	775.3
Tyrosine	3150	1620	1500	1180	750
Fe(Chi) <sub>2</sub> hyd-a	3429.2	1570.5	1450	1103.2	775.3
[Fe(Tyr) <sub>2</sub> ].(SO <sub>4</sub> ).0.5H <sub>2</sub> O	3205.5	1589.2	1480	1153.4	740.6

نمودارهای پایداری کلات ها می توانند اطلاعات دقیق تری را در اختیار قرار دهند.

#### شاخص های رشد و مقدار آهن در شاخسار و ریشه گیاه لوبیا

نتایج آنالیز واریانس وزن خشک ریشه و شاخسار و همچنین مقدار آهن کل در شاخسار و ریشه و مقدار نیتروژن کل در شاخسار گیاه لوبیا تحت تاثیر دو کلات آلی Fe-Tyr و Fe-Chi و کلات Fe-EDDHA به عنوان شاهد با سه روش مصرف متفاوت در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر اصلی و متقابل نوع کلات و روش مصرف کلات بر تمام ویژگی های اندازه گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود.

برخی از ویژگی های فیزیکی و شیمیایی کمپلکس های آهن در جدول ۱ نشان داده شده است. در pH ثابت، کمپلکس های آهن فرکشن بالای کمپلکس شدن را نشان دادند و مخصوصا کیتوسان که ۹۸ درصد با آهن تشکیل کمپلکس داد. درصد کمپلکس شدن برای تیروزین کمتر بود که به ساختار و ویژگی های پیوندهای آنها وابسته است. نتایج دیگر محققین نشان می دهد که درصد کمپلکس شدن بالای ۵۰ درصد می تواند کارایی کمپلکس ها را در محلول تایید کند (Belokon *et al.*, 1988). نتایج نشان می دهند که کلاتهای سنتز شده تیروزین و کیتوسان هیدرولیز شده با آهن، شرایط اولیه را برای استفاده در امر تغذیه گیاه دارا هستند. هر چند مطالعات شیمیایی بیشتر مثل کریستالوگرافی و

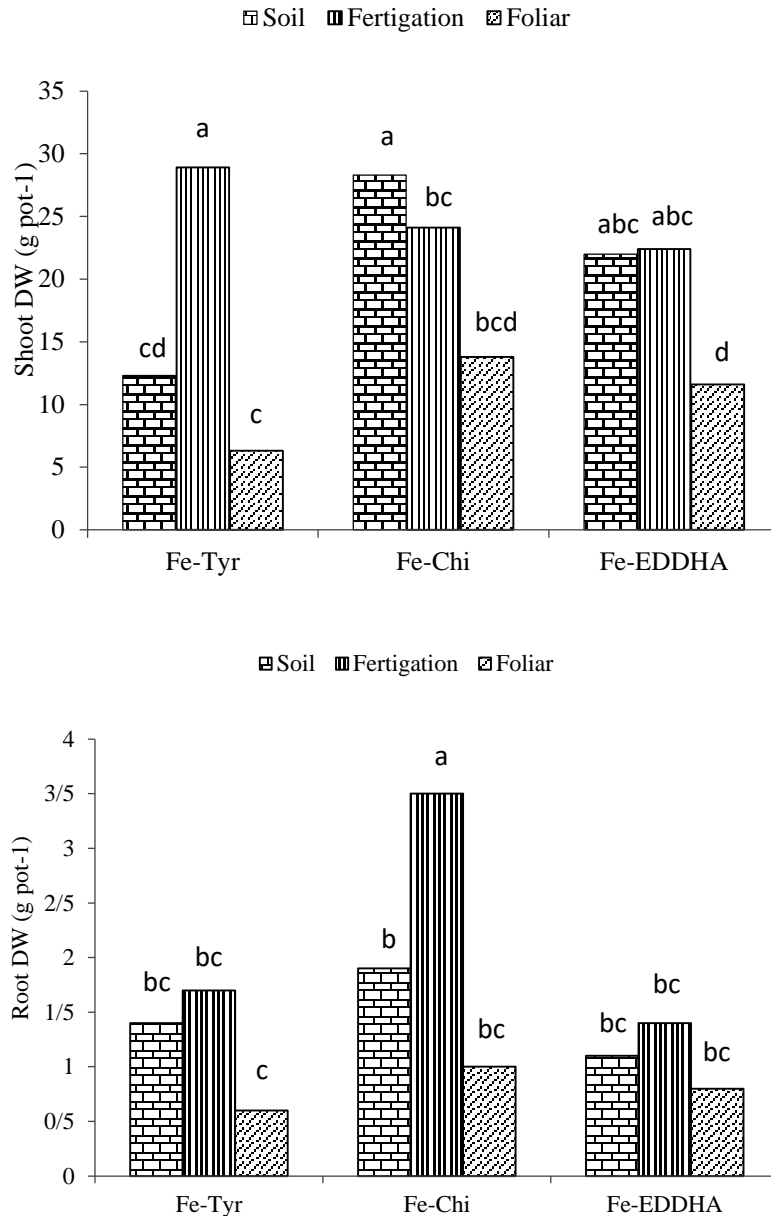
جدول ۵- آنالیز واریانس وزن خشک شاخسار و ریشه، مقدار آهن در شاخسار و ریشه و مقدار نیتروژن در شاخسار گیاه لوبیا تیمار شده با کلاتهای آلی آهن به سه روش مصرف مختلف

Table 5. Analysis of variance of shoot dry matter, root dry matter, Shoot Fe content, Root Fe content and Shoot N content of bean treated with Fe organic chelates in three application methods

Source of variation	Df	Mean square						Catalase activity $\mu\text{mol g}^{-1}$ (FW min <sup>-1</sup> )
		Shoot DW (g pot <sup>-1</sup> )	Root DW (g pot <sup>-1</sup> )	Shoot Fe content (mg pot <sup>-1</sup> )	Shoot Fe concentration (mg kg <sup>-1</sup> DW)	Root Fe content (mg pot <sup>-1</sup> )	Shoot N content (mg pot <sup>-1</sup> )	
Type of chelate	2	88.05**	2.06***	12.25***	18395.98**	8.38***	49427***	0.927***
Method	2	505.79***	4.155***	54.97***	351888.77***	26.12***	40584***	2.353***
Type * Method	4	5.467**	0.913**	19.24***	60447***	9.754***	27308***	1.28***
Error	18	16.98	0.196	0.615	11240	0.502	119.63	0.004
CV (%)		4.66	4.96	6.59	6.01	4.2	4.56	2.39

\*\* Significant in P<0.05, \*\*\* Significant in P<0.01





شکل ۲- میانگین وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه لوبیا در کاربرد کلات‌های تیروزین-آهن (Fe-Tyr)، کیتوسان-آهن (Fe-Chi) و شاهد (Fe-EDDHA) با سه روش مصرف خاکی (Soil)، کودآبیاری (Fertigation) و محلول‌پاشی (Foliar)  
Figure 2. The mean of shoot and root dry weight in application of Fe-Tyr, Fe-Chi and Fe-EDDHA chelates with three soil, fertigation and foliar application methods

نسبت به Fe-EDDHA (شاهد) افزایش دادند. واهبا و همکاران (Wahba *et al*, 2007) اثر مثبت اسید آمینه تیروزین را روی پارامترهای رشد و عملکرد گیاه *U. pilulifera* گزارش کردند. تیروزین نه فقط در سنتز پروتئین‌ها نقش دارد، بلکه به عنوان یک پیش ماده برای سنتز محصولات طبیعی شامل رنگدانه‌ها، آلکالوئیدها، و هورمون‌ها نیز عمل می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند که

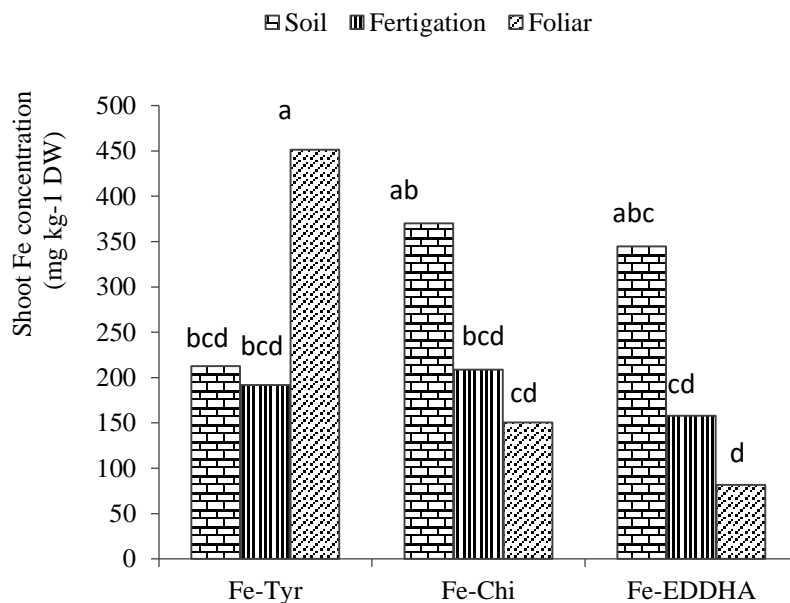
نتایج مقایسه میانگین وزن خشک ریشه و شاخسار گیاه لوبیا با سه روش مصرف کلات‌های آهن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که روش‌های مصرف خاکی و کودآبیاری، تاثیر مثبت بیشتری در افزایش وزن خشک شاخسار گیاه لوبیا داشتند. بیشترین وزن خشک شاخسار، در کاربرد خاکی Fe-Tyr و Fe-Chi حاصل شد که به ترتیب ۲۶ و ۲۹ درصد وزن خشک شاخسار را

پتاسیم، منیزیم و نیتروژن را نیز افزایش دهد و همچنین توازن جذب بین کاتیون ها و آنیون ها برقرار گردد.

افزایش وزن خشک گیاه ممکن است هم به دلیل افزایش جذب آهن و هم به دلیل تاثیر ترکیبات آلی کیتوسان و تیروزین در رشد گیاه باشد. مطالعات نشان داده است که با افزایش غلظت نیتروژن در محیط رشد گیاه، غلظت آهن در شاخسار گیاه نیز افزایش می یابد (Aciksoz et al, 2011). افزایش در مقدار آهن در شاخسار گیاهان با افزایش مقدار نیتروژن توسط کوتمن و همکاران (Kutman et al, 2011) نیز در گیاه گندم گزارش شده است. برای ارزیابی این موضوع، غلظت آهن کل در شاخسار و مقدار آهن کل در شاخسار و ریشه گیاه لوبیا تعیین شد. میانگین غلظت آهن کل در شاخسار در شکل ۳ و میانگین مقدار آهن کل در شاخسار و ریشه در نمودار شکل ۴ نشان داده شده است.

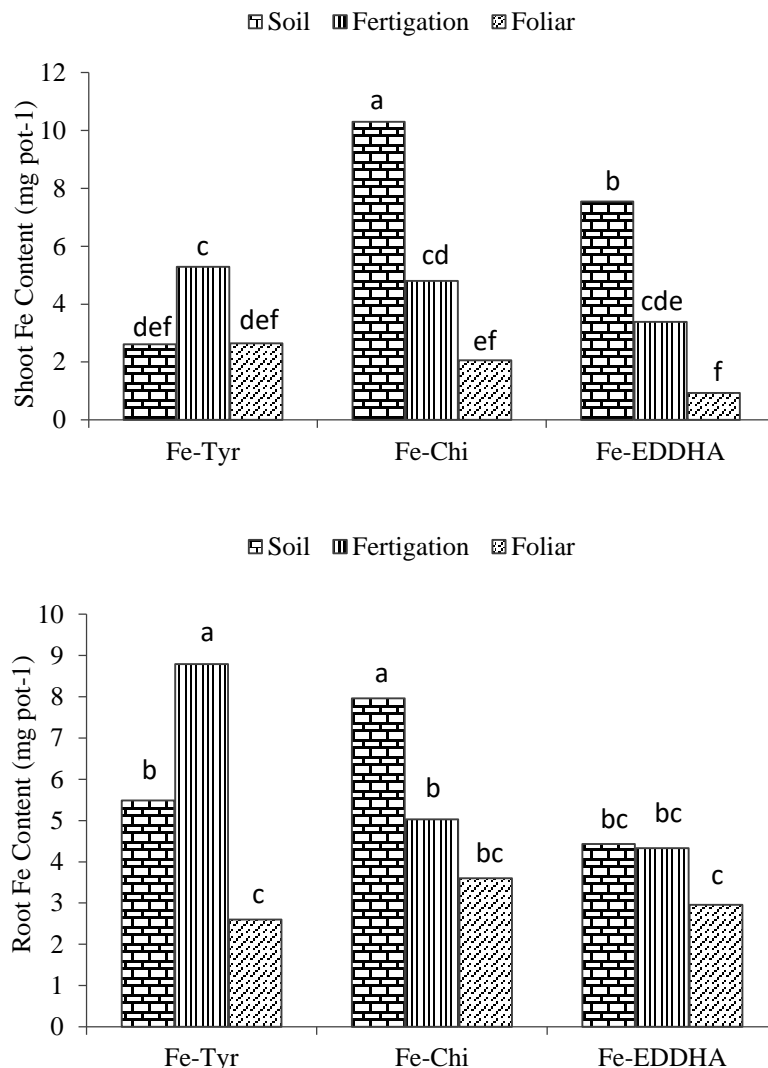
کیتوسان منجر به افزایش عملکرد (Mondal et al, 2012)، کاهش تعرق (Dzung et al, 2011) و کاهش رنجی از تغییرات متابولیسمی می شود که بر اثر آن گیاه به عوامل بیماری زایی مانند قارچ ها و باکتری ها مقاوم می شود. همچنین هیدرولیز اسیدی کیتوسان منجر به شکسته شدن ساختار و کاهش وزن مولکولی آن می شود که این فرآیند، جذب آن برای گیاه و به طور کلی اثر بخشی آن را در کاربرد کشاورزی افزایش می دهد (Aranaz et al, 2009).

بیشترین وزن خشک ریشه ۳/۵ گرم در گلدان در کاربرد کود آبیاری Fe-Chi مشاهده شد که بیش از ۱۰۰ درصد نسبت به شاهد (Fe-EDDHA) با ۱/۷ گرم در گلدان، افزایش داشت. در بین دیگر تیمارها، نسبت به شاهد تفاوت معنی داری در وزن خشک ریشه ها مشاهده نشد. افزایش وزن خشک ریشه نیز به دلیل نقش کیتوسان به عنوان محرک رشد گیاه می باشد که این افزایش عملکرد مخصوصا در ریشه، می تواند جذب دیگر عناصر مثل



شکل ۳- میانگین غلظت آهن کل در شاخسار گیاه لوبیا در کاربرد کلات های تیروزین-آهن (Fe-Tyr)، کیتوسان-آهن (Fe-Chi) و شاهد (Fe-EDDHA) با سه روش مصرف خاکی (Soil)، کودآبیاری (Fertigation) و محلول پاشی (Foliar)

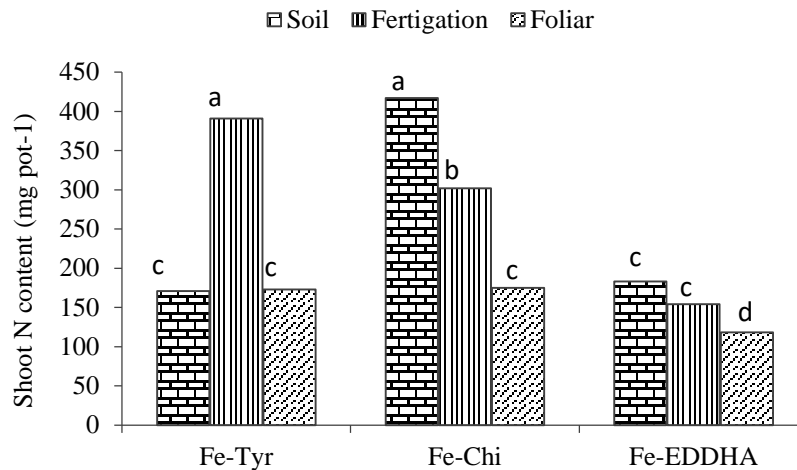
Figure 3. The mean of shoot Fe concentration in application of Fe-Tyr, Fe-Chi and Fe-EDDHA chelates with three soil, fertigation and foliar application methods



شکل ۴- میانگین مقدار آهن کل در شاخسار و ریشه گیاه لوبیا در کاربرد کلات‌های تیروزین-آهن (Fe-Tyr)، کیتوسان-آهن (Fe-Chi) و شاهد (Fe-EDDHA) با سه روش مصرف خاکی (Soil)، کودآبیاری (Fertigation) و محلول‌پاشی (Foliar)  
Figure 4. The mean of shoot and root Fe content in application of Fe-Tyr, Fe-Chi and Fe-EDDHA chelates with three soil, fertigation and foliar application methods

بهرتر آهن بوده است یا به دلیل فراهمی نیتروژن در شکل اسید آمینه و کیتوسان و یا حتی نقش این ترکیبات در افزایش فعالیت‌های هورمونی گیاه (Wahba *et al*, 2007) و یا اینکه مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زای گیاهی بوده است. شکل ۵ میانگین مقدار نیتروژن در شاخسار گیاه لوبیا را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که در کاربرد کلات‌های کیتوسان و تیروزین، مقدار نیتروژن به طور معنای‌داری در شاخسار نسبت به شاهد افزایش یافته است.

نتایج نشان می‌دهد که کاربرد خاکی Fe-Chi، به میزان ۳۶/۴۲ درصد نسبت به کاربرد خاکی Fe-EDDHA، مقدار آهن کل را در شاخسار گیاه لوبیا افزایش داد. افزایش در وزن خشک شاخسار نیز با این نتایج تطابق داشت و همچنین در کاربرد خاکی Fe-Chi، وزن خشک شاخسار نسبت به شاهد ۲۸/۶۳ درصد افزایش را نشان داد. اسیدهای آمینه و کیتوسان به عنوان منبع نیتروژن و کربن عمل می‌کنند و منجر به بهبود وضعیت تغذیه‌ای و افزایش عملکرد گیاه می‌شوند. ولی این موضوع به راحتی قابل بحث نیست که آیا این اثر به دلیل جذب



شکل ۵- میانگین مقدار نیتروژن در شاخسار گیاه لوبیا در کاربرد کلات های تیروزین-آهن (Fe-Tyr)، کیتوسان-آهن (Fe-Chi) و شاهد (Fe-EDDHA) با سه روش مصرف خاکی (Soil)، کودآبیاری (Fertigation) و محلول پاشی (Foliar)

Figure 5. The mean of shoot N content in application of Fe-Tyr, Fe-Chi and Fe-EDDHA chelates with three soil, fertigation and foliar application methods

آهن از یک منبع رایج آهن مثل Fe-EDDHA به عنوان شاهد می تواند نقش کمپلکس های جدید آهن را به بهترین شکل برای افزایش رشد و عملکرد گیاه و جذب آهن نشان دهد. قاسمی و همکاران (Ghasemi *et al.*, 2012) نیز در بررسی کاربرد کلات های اسیدهای آمینه با آهن روی رشد و عملکرد گوجه فرنگی گزارش کردند که رابطه متقابل مثبت بین میزان جذب نیتروژن و آهن در بهبود وضعیت تغذیه ای گیاه وجود دارد.

اثر متقابل مثبت و معنای دار بین وزن خشک شاخسار و جذب آهن و نیتروژن در گیاه لوبیا (جدول ۶) نشان می دهد که هر دوی افزایش جذب آهن و نیتروژن، در بهبود رشد گیاه لوبیا نقش دارند. استفاده از یک شاهد بدون آهن نمی تواند تفاوت بین اثر اسیدهای آمینه و آهن روی رشد گیاه را نشان دهد. همچنین استفاده از لیگاند های اسید آمینه یا کیتوسان به تنهایی نیز به عنوان شاهد به دلیل تضعیف شدن رشد گیاه در شرایط بدون آهن، نمی توانست مفید باشد. به همین دلیل، فراهمی

جدول ۶- رابطه متقابل بین وزن خشک شاخسار، مقدار آهن در شاخسار، مقدار آهن در ریشه و مقدار نیتروژن در شاخسار گیاه لوبیا در کاربرد کلات های آلی آهن

Table 6. Correlation between shoot DW, Shoot Fe content, Root Fe content and Shoot N content of bean plant in application of Fe-organic chelates

	Shoot DW	Shoot Fe content	Root Fe content	Shoot N content
DW Shoot	1	0.65**	0.74**	0.71**
Shoot Fe content		1	0.60**	0.71**
Root Fe content			1	0.86**
Shoot N content				1

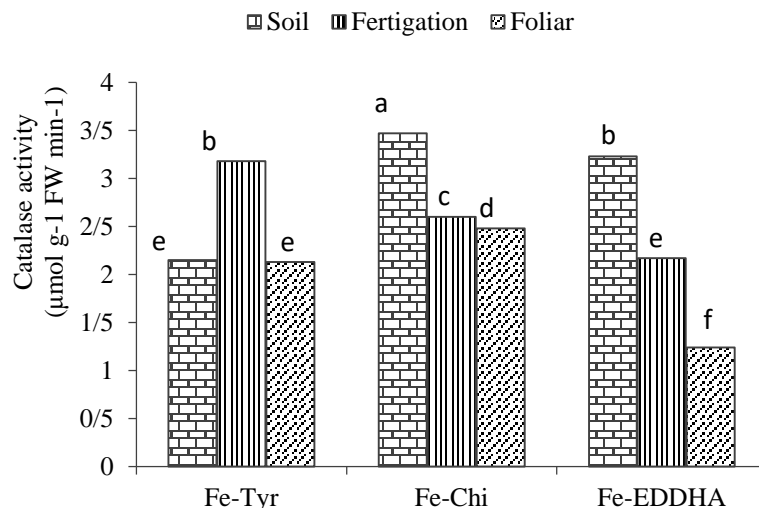
\*\* Correlation is significant at the 0.01 level

Tyr، ۸/۷۹ میلی گرم در گلدان مشاهده شد که نسبت به شاهد، افزایش معنی داری نشان دادند (شکل ۴). در

مقدار آهن کل در ریشه گیاه در کاربرد خاکی Fe-Chi، ۷/۹۶ میلی گرم در گلدان و در کاربرد کود آبیاری Fe-

مستقیم توسط گیاهان جذب شوند (Jämtgård *et al.*, 2008). استفاده از روش‌های ردیابی، می‌تواند دلایل قانع‌کننده‌تری در این زمینه فراهم سازد. برای ارزیابی دقیق‌تر تاثیر کلات‌های آلی آهن بر بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن در گیاه، بهتر است از پارامترهای بیوشیمیایی مثل فعالیت آنزیم‌هایی که در متابولیسم‌های مربوط به جذب و انتقال آهن در گیاهان درگیر هستند، استفاده شود (Yildiz Dasgan *et al.*, 2003). اثر کلات‌های آلی آهن روی فعالیت آنزیم کاتالاز شاخسار در روش‌های مختلف مصرف کلات‌ها و همچنین نوع کلات استفاده شده، متفاوت بود (شکل ۶). فعالیت آنزیم کاتالاز در مصرف خاکی Fe-Chi بیشترین مقدار بود. تیمارهای کود آبیاری Fe-Tyr و مصرف خاکی Fe-EDDHA نیز فعالیت آنزیم کاتالاز بالایی را در شاخسار نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شاخسار، تقریباً مطابق با افزایش مقدار آهن در اندام هوایی گیاهان بود. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم کاتالاز شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای آهن در گیاه لوبیا است. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور کلات‌های آلی، به دلیل نقش آمین‌ها در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مخصوصاً کاتالاز است (Kuznetsov & Shevyakova, 2007).

کاربرد کود آبیاری Fe-Tyr، آهن به میزان بالایی در ریشه گیاه ذخیره شد، ولی انتقال آن به شاخسار، با کارایی بالایی انجام نشد. کارایی Fe-Tyr در افزایش مقدار آهن در شاخسار گیاه، کمتر از شاهد بود. به طوریکه با کاربرد خاکی Fe-EDDHA، مقدار آهن در اندام هوایی به ۷/۵۵ میلی‌گرم در گلدان رسید. ولی نتایج محققین دیگر نشان داده است که فلزات در کمپلکس با اسیدهای آمینه، کارایی بالایی را در بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن در گیاهان داشته‌اند. هسو و همکاران (Hsu, 1986) گزارش کردند که اسیدهای آمینه بلوک‌های پروتئینی هستند که در ساختار همه موجودات زنده یافت می‌شوند و کلات‌شدن عناصر با اسیدهای آمینه، منجر به افزایش کارایی انتقال عناصر در گیاهان می‌شود. تفاوت بین تیمارها در انتقال آهن را می‌توان به مدیریت تغذیه‌ای نیتروژن روی تعداد و فعالیت پروتئین‌های ناقل آهن در دیواره سلولی ریشه نسبت داد که منجر به افزایش جذب و انتقال آهن به بافت‌های گیاهی می‌شود (Curie *et al.*, 2008). تفاوت در جذب کلات‌های آهن توسط ریشه‌ها، رابطه مستقیم با نوع ناقلین پروتئینی در غشاء سلول‌های ریشه دارد. مطالعات نشان داده است که گرچه گیاهان، نیتروژن را به شکل‌های آمونومی و نیتراتی جذب می‌کنند، ولی شواهدی وجود دارد که اسیدهای آمینه می‌توانند به طور

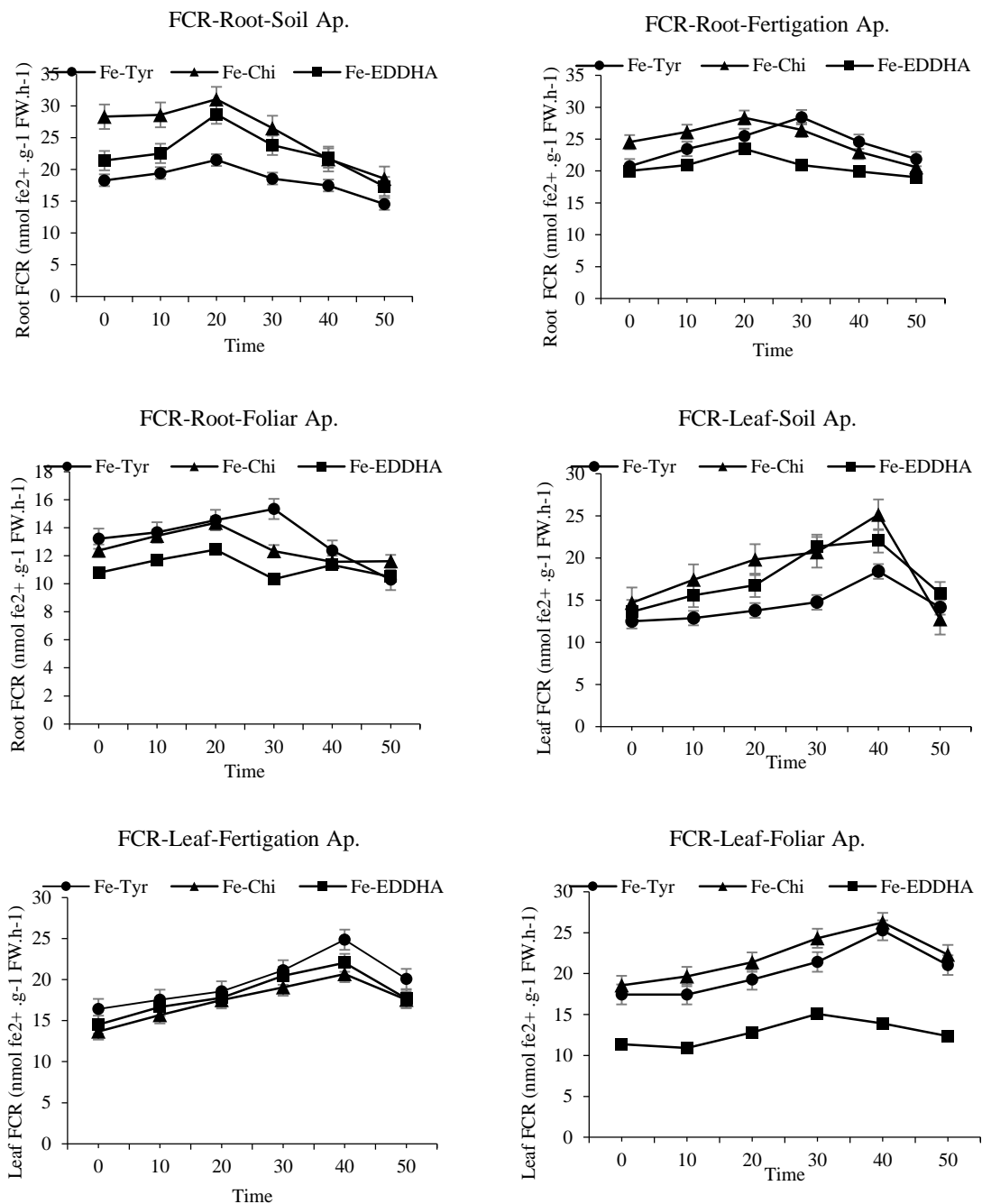


شکل ۶- میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز شاخسار گیاه لوبیا در کاربرد کلات‌های تیروزین-آهن (Fe-Tyr)، کیتوسان-آهن (Fe-Chi) و شاهد (Fe-EDDHA) با سه روش مصرف خاکی (Soil)، کودآبیاری (Fertigation) و محلول‌پاشی (Foliar)

Figure 6. The mean of Catalase activity in application of Fe-Tyr, Fe-Chi and Fe-EDDHA chelates with three soil, fertigation and foliar application methods

(2011b). نتایج تغییرات فعالیت آنزیم FCR ریشه و برگ با گذشت زمان در شکل ۷ نشان داده شده است. نمودارها نشان می دهند که میانگین فعالیت آنزیم FCR ریشه، تحت تاثیر نوع کلات آهن اضافه شده و روش مصرف آن برای گیاه، متفاوت بود.

با توجه به اینکه آهن در بافت های گیاهی به شکل نامحلول وجود دارد (Marschner, 1995) و با کلات کننده ها و ناقلین حمل می شود، فعالیت آنزیم FCR برای توصیف کارایی آهن در گیاه می تواند مفید باشد (González-Vallejo *et al*, 2000; Mikami *et al*, )



شکل ۷- اثر کلاتهای آلی آهن روی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ و ریشه لوبیا در طول زمان

Figure 7. Effect of Fe organic chelates on root Fe chelate reductase activity (FCR) of bean over time.

خاکی Fe-Chi، از ۲۸/۳۱ nmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup> در روز اول (شروع کاربرد تیمارهای آهن) به ۱ nmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>

به طور کلی فعالیت FCR ریشه با گذشت زمان در همه تیمارها کاهش یافت. در ریشه، فعالیت FCR در کاربرد



ریشه در بعضی از گونه‌های چوبی که در معرض آهن قرار گرفتند، کم شد که دلیل این امر ممکن است ذخیره مقادیر زیاد آهن در ریشه‌های آنها باشد. در این شرایط، گیاهان ممکن است نیاز به فعال کردن مکانیسم‌های فیزیولوژیکی برای بدست آوردن آهن نداشته باشند.

فعالیت آنزیم FCR برگ با کاربرد منابع مختلف آهن و روش‌های مصرف متفاوت آنها در نمودارهای شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در همه روش‌های مصرف، فعالیت FCR برگ با گذشت زمان تا روز ۴۰ام افزایش و سپس کاهش یافت. در کاربرد محلول پاشی کلات‌ها، فعالیت FCR برگ با کاربرد Fe-Chi و Fe-Tyr به طور میانگین ۴۲ درصد تا روز ۴۰ام افزایش یافت، که این افزایش در همین دوره زمانی برای شاهد ۲۲/۲۵ درصد مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که کاربرد محلول پاشی کلات‌های آلی، تقریباً به میزان ۲ برابر فعالیت FCR برگ را نسبت به شاهد افزایش داد. در کاربرد خاکی و کود آبیاری، به ترتیب کلات‌های Fe-Chi و Fe-Tyr اثر تحریک‌کنندگی بیشتری را بر فعالیت FCR برگ نسبت به شاهد با همان روش مصرف نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که در شرایط کمبود آهن، فعالیت FCR برگ نیز کاهش می‌یابد که این کاهش می‌تواند به دلیل کاهش در تعداد کلروپلاست‌ها باشد (Mikami *et al.*, 2011a). مقایسه فعالیت FCR برگ و مقدار آهن کل در شاخسار گیاه نیز این نتایج را تایید می‌کند و این نتایج با یافته‌های آجدا و همکاران (Ojeda *et al.*, 2005) نیز مطابقت دارد. در روش محلول پاشی، با وجود غلظت کم آهن در اندام هوایی گیاه، فعالیت FCR برگ افزایش یافته است که دلیل این امر می‌تواند اندازه‌گیری غلظت آهن در برگ‌ها در پایان آزمایش باشد که در آن شرایط، فعالیت FCR برگ رو به کاهش بوده است. این موضوع اهمیت ارزیابی فعالیت FCR را در طول دوره رشد گیاه نشان می‌دهد. افزایش فعالیت FCR برگ‌ها ممکن است یک فرآیند پیشگام برای کاهش آهن (III) به آهن (II) باشد، قبل از اینکه شکل کاهش یافته بتواند از پلاسما به سمت سلول‌های برگ عبور کند و این فرآیند کارایی گیاه را در استفاده از آهن در فرآیندهای فیزیولوژیکی خود بالا می‌برد. نتایج این پژوهش با نتایج مشاهده شده در گیاه آفتابگردان (de la

۱۸/۵۴ FW h<sup>-1</sup> در روز ۵۰ کاهش یافت. میزان کاهش FCR ریشه در کاربرد خاکی Fe-Chi، ۳۴/۵۱ درصد، در کود آبیاری ۱۵/۸۹ درصد و در محلول پاشی ۶/۰۶ درصد در پایان ۵۰ روز مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که کاهش فعالیت FCR ریشه در کاربرد Fe-Chi در روش محلول پاشی، کم‌تر از روش‌های دیگر بود. ولی میانگین فعالیت آنزیم در روش مصرف خاکی (بین ۱۵ تا ۳۰ nmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup>) در فاصله زمانی ۰ تا ۲۰ روز، تقریباً دو برابر بیشتر از روش محلول پاشی (بین ۱۰ تا ۱۵ nmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup>) مشاهده شد.

تغییرات FCR ریشه در روش کاربرد کود آبیاری و محلول پاشی، تقریباً از الگوی یکسانی برخوردار بود و کلات Fe-Tyr در هر دو روش تا روز ۳۰ام از شروع آزمایش، منجر به افزایش فعالیت FCR ریشه شد. در مصرف خاکی، کارایی کمتری را نسبت به دو کلات دیگر در افزایش FCR ریشه نشان داد. در کاربرد کود آبیاری، چون کلات Fe-Tyr طی چند مرحله در اختیار گیاه قرار می‌گیرد، قابلیت استفاده گیاه از آهن افزایش می‌یابد.

به طور کلی میانگین فعالیت FCR ریشه با کاربرد خاکی Fe-Chi در روز ۲۰ام، ۳۱/۰۶ nmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> FW h<sup>-1</sup> مشاهده شد که نسبت به مقدار ۲۸/۶۹ FW h<sup>-1</sup>، ۸/۲۶ درصد افزایش را نشان داد. این نشان می‌دهد که Fe-Chi اثر تحریک‌کنندگی بیشتری را بر فعالیت آنزیم FCR ریشه دارد، ولی شدت کاهش فعالیت آنزیم در کاربرد کود آبیاری و محلول پاشی، کمتر بود. دلیل این امر می‌تواند در معرض قرارگیری سریع آهن در نواحی ریشه در کاربرد خاکی باشد. همچنین، افزایش غلظت آهن در گیاه لوبیا در کاربرد خاکی Fe-Chi نیز این نتایج را تایید می‌کند. مطالعات نشان داده است که با افزایش غلظت آهن در محلول خاک، فعالیت آنزیم FCR ریشه افزایش می‌یابد تا جذب آهن توسط گیاه با کارایی بالاتری صورت گیرد (Ojeda *et al.*, 2005).

تغییرات فعالیت آنزیم FCR ریشه شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت آهن در گیاه است، ولی فعالیت FCR ریشه همیشه نمی‌تواند برای ارزیابی وضعیت آهن در برگ گیاهان کارایی داشته باشد. منگل و همکاران (Mengel & soil, 1994) گزارش کردند که فعالیت FCR

در شرایط گلخانه‌ای استفاده شوند. به طور کلی در روش مصرف خاکی، Fe-Chi و در روش کود آبیاری، Fe-Tyr بهترین کارایی را در بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن در گیاه داشتند. با بررسی فعالیت آنزیم‌های FCR ریشه و برگ مشخص شد که در روش محلول‌پاشی، هر دو کلات Fe-Chi و Fe-Tyr رفتار مشابهی را در بهبود وضعیت آهن در گیاه نشان دادند. ولی محلول‌پاشی Fe-Try با افزایش فعالیت هر دو آنزیم FCR ریشه و برگ، موثرترین کلات در روش محلول‌پاشی شناسایی شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بهترین توصیه برای کلات‌های مطالعه شده، کاربرد همزمان محلول‌پاشی Fe-Tyr و مصرف خاکی Fe-Chi برای گیاه لوبیا در طول دوره رشد می‌باشد. کاربرد این کلات‌ها باید برای گیاهان مختلف و همچنین در زمان‌های مشخص در طول دوره رشد و نمو گیاه مورد بررسی قرار گیرند.

Rombolà *et al.* (Guardia & Alcántara, 1996) و کیوی (al, 2000b) نیز مشابه بود. تفاوت فعالیت FCR در برگ و ریشه نشان می‌دهد که احتمالاً بیان ژن FCR در سلول‌های برگ با سلول‌های اپیدرم ریشه غیر مشابه است که مکانیسم این فرآیند هنوز به خوبی شناخته نشده است. نتایج اجدا و همکاران (Ojeda *et al.*, 2005) در تحقیق روی گونه‌های *Annona* نشان داد که تفاوت مکانیسم‌های جذب آهن در برگ‌ها و ریشه‌ها و همچنین تفاوت فعالیت FCR برگ و ریشه ممکن است به دلیل تفاوت در میزان نیاز گیاه نسبت به عنصر آهن باشد.

### نتیجه‌گیری کلی

کلات‌های Fe-Tyr و Fe-Chi به عنوان منبع تامین آهن به جای کلات‌های سنتزی رایج آهن مثل Fe-EDDHA، می‌توانند در بهبود وضعیت تغذیه‌ای آهن برای گیاه لوبیا

### Reference

- Al-Busaidi P., Cookson L., and Yamamoto T. 2005. Methods of pH determination in calcareous soil: use of electrolytes and suspension effect. *Soil Research*, 43: 541-545.
- Aciksoz S. B., Yazici A., Ozturk, L., and Cakmak I. 2011. Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant and Soil*, 349: 215-225.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G. and Heras, Á. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.
- Belokon Y. N., Bakhmutov V. I., Chernoglazova N. I., Kochetkov K. A., Vitt S. V., Garbalinskaya N. S. and Belikov, V. 1988. General method for the asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids via alkylation of the chiral nickel (II) Schiff base complexes of glycine and alanine. 305-312.
- Bernkop Schnürch, A., and Dünhaupt, S. 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *Biopharmaceutics*, 81: 463-469.
- Bouyoucos G.J. 1936. Direction for making mechanical analysis of soil by the hydrometer method. *Journal of Soil Science*, 41: 225-228.
- Bremner J. M., and Mulvaney C. 1982. Nitrogen-Total. In: Page A.L. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. pp: 595-624.
- Bruckner M. Z. 2012. Water and Soil Characterization, pH and Electrical Conductivity. *Microbial Life Educational Resources*, Montana State University Bozeman.
- Brüggemann W., Maas-Kantel K., and Moog P. 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta*, 190: 151-155.
- Caiqin Q., Ling X., Yumin D., Xiaowen S., and Jiawei C. 2002. A new cross-linked quaternized-chitosan resin as the support of borohydride reducing agent. *Reactive and Functional Polymers*, 50: 165-171.
- Cakmak I., and 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.
- Çakmak İ., Torun A., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E., Braun H., Özkan H., 2004. Triticum dicoccoides: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50: 1047-1054.

- Chaney R. L., Brown J. C. and Tiffin L. O. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology*, 50: 208-213.
- Chapman H. D., and Pratt P. 1961. *Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters*, University of California Div. pp: 168-169.
- Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Le Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P., and Mari S. 2008. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, 103: 1-11.
- De La Guardia M. D., and Alc´ Ntara E. 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *Journal of Experimental Botany* 47: 669-675.
- Dias A., Cortez A., Barsan M., Santos J., Brett C. and De Sousa H. 2013. Development of greener multi-responsive chitosan biomaterials doped with biocompatible ammonium ionic liquids. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1: 1480-1492.
- Dzung N. A., Khanh V., and Dzung, T. 2011. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate Polymer*, 84: 751-755.
- Elfaki J. T., Gafer M. O., Sulieman M. M., and Ali M. E. 2016. Assessment of calcimetric and titrimetric methods for calcium carbonate estimation of five soil types in central Sudan *Egypt Journal Soil Science*, 58: 383-397.
- Ghasemi S., Khoshgoftarmanesh A. H., Afyuni M. and Hadadzadeh H. 2013a. The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. *European Journal of Agronomy*, 45: 68-74.
- Ghasemi S., Khoshgoftarmanesh A. H., Hadadzadeh H. and Afyuni M. 2013b. Synthesis, characterization, and theoretical and experimental investigations of zinc (II)-amino acid complexes as ecofriendly plant growth promoters and highly bioavailable sources of Zinc. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 315-323.
- Ghasemi S., Khoshgoftarmanesh A. H., Hadadzadeh H. and Jafari M. 2012. Synthesis of iron-amino acid chelates and evaluation of their efficacy as iron source and growth stimulator for tomato in nutrient solution culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 498-508.
- González-Vallejo E. B., Morales F., Cistué L., and Abadia A. 2000. Iron deficiency decreases the Fe (III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 122: 337-344.
- Hangarter R. P., and Stasinopoulos T. C. 1991. Effect of Fe-catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant Physiology*, 96: 843-847.
- HSU, H.-H. 1986. Chelates in plant nutrition.
- Hudson S. M., Jenkins D. 2002. Chitin and chitosan. *Journal of Uropan Science and Tchnology*, 23: 341-358.
- Il'ina A., Varlamov H. 2004. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. *Journal of Biology and Microbiology*, 40: 300-303.
- Jämtgård S., Näsholm T. and Huss-Danell K. 2008. Characteristics of amino acid uptake in barley. *Plant and Soil*, 302: 221-231.
- Jones D. and Hodge A. 1999. Biodegradation kinetics and sorption reactions of three differently charged amino acids in soil and their effects on plant organic nitrogen availability. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1331-1342.
- Kang G., C. Wang G. Sun and Z. 2003. Salicylic acid changes activities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 50: 9-15.
- Kazem Souri M., Sooraki F. Y., and Moghadamyar M. 2017. Growth and quality of cucumber, tomato, and green bean under foliar and soil applications of an aminochelate fertilizer. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 58: 530-536.
- Kosegarten H. U., Hoffmann B. and Mengel K. 1999. Apoplastic pH and Fe<sup>3+</sup> reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiology*, 121: 1069-1079.
- Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Y. and Abramchuk S. 2012. Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Carbohydrate Polymers*, 87: 545-550.

- Kutman U. B., Yildiz B. and Cakmak. 2011. Improved nitrogen status enhances zinc and iron concentrations both in the whole grain and the endosperm fraction of wheat. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 53: 118-125.
- Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I. 2007. Polyamines and stress tolerances of plants. *Plant Stress*, 1:50-71.
- Lindsay W. 1972. Zinc in Soils and Plant Nutrition. *Advances in Agronomy*, 24: 147-186.
- Lowe A., Rafferty-Mcardle S. M. and Cassells A. C. 2012. Effects of AMF-and PGPR-root inoculation and a foliar chitosan spray in single and combined treatments on powdery mildew disease in strawberry. *Agricultural and Food Science*, 21: 28-38.
- Lucena J. 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *Journal of Plant Nutrition*, 23: 1591-1606.
- Manthey J., McCoy D., Crowley D. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. Plant Biology and Biochemistry. France press.
- Marschner H. 1995. Function of mineral nutrients: micronutrients. Mineral Nutrition of High plants.
- Marschner H., and Römheld V. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165: 261-274.
- Mengel K. 1994. Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Journal of Plant and Soil*, 165: 275-283.
- Metsärinne S., Rantanen P., Aksela R. and Tuhkanen T. 2004. Biological and photochemical degradation rates of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in the presence and absence of Fe (III). *Chemosphere*, 55: 379-388.
- Mikami Y., Saito A., Miwa E. and Higuchi K. 2011a. Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 513-519.
- Mondal M. A., Malek M., Puteh A., Ismail M., Ashrafuzzaman M., and Naher, L. 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science* 6, 918.
- Nakamoto, K. and NAKAMOTO, K. 1977. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, Wiley.
- Nomiya K. and Yokoyama H. 2002. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of polymeric silver (I) complexes with three amino-acids [aspartic acid (H<sub>2</sub> asp), glycine (Hgly) and asparagine (Hasn)]. *Journal of the Chemical Society*, 12: 2483-2490.
- Ojeda M., Schaffer B. and Davies F. 2005. Root and leaf ferric chelate reductase activity in pond apple and soursop. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 1381-1393.
- Prabaharan M., and Mano J. 2004. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*, 12: 41-57.
- Renella G., Landi L., and Nannipieri P. 2004. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122: 311-315.
- Rombolà A., Brüggemann W., Tagliavini M., Marangoni B. and Moog P. 2000a. Iron source affects iron reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 23: 1751-1765.
- Romera F., Alcántara E., and De La Guardia M. 1991. Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. Iron Nutrition and Interactions in Plants. Springer.
- Smith B. R., and Cheng, L. 2007. Iron assimilation and carbon metabolism in 'Concord' grapevines grown at different pHs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 473-483.
- Svenson A., Kaj L., and Björndal H. 1989. Aqueous photolysis of the iron (III) complexes of NTA, EDTA and DTPA. *Chemosphere*, 18: 1805-1808.
- Tietze L. 1996. Domino reactions in organic synthesis. *Chemical Review*, 96: 115-136.
- Vadas T. M., Zhang X., Curran A. M., and Ahner B. A. 2007. Fate of DTPA, EDTA, and EDDS in hydroponic media and effects on plant mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1229-1246.
- Villén M., Lucena, J. J., Cartagena M. C., Bravo R., García-Mina J., De La Hinojosa M. F. 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers

- and the complexing capacity of complexing agents. *Journal of Biology and Chemistry*, 55: 574-584.
- Wahba H., Motawe H., Ibrahim A. and Mohamed A. The influence of amino acids on productivity of *Urtica pilulifera* plant. 3rd International Conference of Pharmaceutical and Drug Industries Division, National Research Council, Cairo, 2007.
- Walkley A. 1947. Organic carbon by the Walkley-Black oxidation procedure. *Soil science*, 63: 251-264.
- Wang X., Du Y., and Liu H. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56: 21-26.
- Waters B. M., Uauy C., Dubcovsky J., and Grusak M. A. 2009. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *Journal of Experimental Botany*, 60: 4263-4274.
- Yildiz Dasgan H., Ozturk L., Abak K. and Cakmak I. 2003. Activities of Iron-Containing Enzymes in Leaves of Two Tomato Genotypes Differing in Their Resistance to Fe Chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 26: 1997-2007.
- Zhou Z., Zhou J., Li R., Wang H. and Wang J. 2007. Effect of exogenous amino acids on Cu uptake and translocation in maize seedlings. *Plant and Soil*, 292: 105-117.



## Effect of Iron Chelates and their Application Methods on Iron Nutrition Status of Bean Plant (*Phaseolus vulgaris*) in a Calcareous Soil

Atena Mirbolook<sup>1</sup>, MirHassan Rasouli-Sadaghiani<sup>2\*</sup>, Ebrahim Sepehr<sup>3</sup>, Amir Lakzian<sup>4</sup>, Mohammad Hakimi<sup>5</sup>

(Received: August 2019 Accepted: November 2019)

### Abstract

Identification and synthesis of new organic iron chelates with higher efficiency than conventional synthetic chelates seems to be necessary to improve the nutritional status of iron in calcareous soils of Iran. In this study, first the amino acid chelates of tyrosine-iron (Fe-Tyr) acid-hydrolyzed chitosan-iron (Fe-Chi) were synthesized by laboratory methods and then some of their properties were characterized. A greenhouse experiment was designed as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications including three types of iron chelate, Fe-Chi, Fe-Tyr and Fe-EDDHA (control) and three methods of soil application, fertigation and foliar application. Bean plants were grown and some growth parameters and total iron content in shoot and root were determined. The activity of root and leaf FCR (Ferric Chelate Reductase) enzymes were measured. The results of experimental and theoretical data showed that the tyrosine and chitosan were complexed with iron metal. The results showed that the highest shoot dry weight was observed in soil application of Fe-Chi and fertigation of Fe-Tyr. Also, fertigation of Fe-Chi increased root dry weight compared to control significantly. The highest content of total iron (10.3 mg pot<sup>-1</sup>) was observed in soil application of Fe-Chi in bean shoots which showed 36% higher Fe uptake than Fe-EDDHA. There was a significant positive correlation between shoot dry weight with iron and nitrogen content in shoots of bean plants. Investigation of root FCR enzyme activity revealed that soil application of Fe-Chi and fertigation of Fe-Tyr had the highest mean of FCR activity. In the foliar and fertigation application of Fe-Tyr, leaf FCR activity increased to 40 days after the start of the experiment. Soil application of Fe-Chi and foliar of Fe-Tyr during plant growth can improve the nutritional status of iron in bean plant

**Keywords:** Amino acid, Chelate, Fertigation, Chitosan, Foliar, Soil application

Mirbolook A., Rasouli-Sadaghiani MH., Sepehr E., Lakzian A., Hakimi M. 2020. Effect of iron chelates and their application methods on iron nutrition status of bean plant (*Phaseolus vulgaris*) in a calcareous soil. *Applied Soil Research*, 8(3): 109-128.

1. Ph D student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University.

2. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University.

3. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University.

4. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

5. Professor, Department of Chemistry, Payam noor University of Iran.

\*Corresponding Author Email [m.rsadaghiani@urmia.ac.ir](mailto:m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)