

مقاله علمی-پژوهشی

معرفی کیلیت‌های اسید آمینه و کیتوسان آهن به عنوان منبع قابل دسترس آهن در محلول غذایی برای گیاهان با استراتژی I و II

آتنا میربلوک^۱ - میر حسن رسولی صدقیانی^{۲*} - ابراهیم سپهر^۳ - امیر لکزبان^۴ - محمد حکیمی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۹

چکیده

فراهمی مقدار کافی از عنصر آهن قابل دسترس برای گیاهان در محلول‌های غذایی یک چالش بزرگ است. کیلیت‌کننده‌های رایج که در محلول‌های غذایی برای فراهمی عنصر آهن استفاده می‌شوند، مضرات زیادی دارند و می‌توانند اثرات منفی روی رشد گیاهان داشته باشند. در این تحقیق کیلیت‌های اسیدهای آمینه و آهن شامل گلايسین-آهن (Fe-Gly)، فنیل آلانین-آهن (Fe-Phe)، تیروزین-آهن (Fe-Tyr) و متیونین-آهن (Fe-Met) و کیلیت‌های کیتوسان به دو فرم هیدرولیز شده‌ی اسیدی [Fe-C(A.hyd)] و آنزیمی [Fe-C(E.hyd)] سنتز و ویژگی‌های شیمیایی آنها با اسپکتروسکوپی IR و آنالیز CHN انجام شد. سپس کارایی این منابع آهن در مقایسه با Fe-EDDHA برای دو گیاه لوبیا (استراتژی I) و ذرت (استراتژی II) در محیط آبکشت بررسی گردید. کاربرد برخی از کیلیت‌های آلی اسیدهای آمینه و کیتوسان به طور معنی‌داری وزن خشک اندام هوایی گیاهان را در مقایسه با Fe-EDDHA افزایش داد. بیشترین مقدار آهن در اندام هوایی گیاهان ذرت و لوبیا در کاربرد کیلیت‌های Fe-Tyr، Fe-Met و [Fe-C(A.hyd)] مشاهده گردید. کاربرد کیلیت‌های مورد مطالعه منجر به تجمع آهن در ریشه‌ها گردید، لیکن بیشترین مقدار انتقال آهن به اندام‌های هوایی در گیاهانی که در معرض کیلیت‌های [Fe-C(A.hyd)] و Fe-Tyr بودند، اتفاق افتاد. بیش از ۵۰ درصد آهن در کمپلکس با Fe-Tyr در گیاه لوبیا و در کمپلکس با Fe-C(A.hyd) در ذرت و لوبیا از ریشه به اندام‌های هوایی انتقال یافتند. استفاده از کیلیت‌های آلی آهن در محیط رشد گیاه فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (FCR) برگ را در دو گیاه لوبیا و ذرت در مقایسه با Fe-EDDHA افزایش داد. با این حال میانگین کلی فعالیت این آنزیم در گیاه لوبیا بیشتر از ذرت بود. نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از برخی کیلیت‌های آلی آهن در محلول‌های غذایی در مقایسه با Fe-EDDHA می‌تواند مقادیر کافی از آهن را برای جذب گیاه فراهم کند و همچنین رشد اندام هوایی و ریشه گیاه لوبیا و ذرت را بهبود بخشد. بر طبق نتایج این کیلیت‌ها می‌تواند به عنوان یک جانشین برای فراهمی آهن به جای Fe-EDDHA در محلول‌های غذایی به کار روند.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای آمینه، ذرت، فاکتور انتقال، فریک کیلیت رداکتاز، کیلیت، کیتوسان، لوبیا

مقدمه

می‌شود و جذب آهن به کمک پروتئین‌های ناقل موجود در غشاء به داخل گیاه صورت می‌گیرد، این مکانیسم در گیاهان غیر لگوم فعال است (۲۳). در گیاهان گونه‌های گرامینه این فرایند با تولید فیتوسایدروفورها به وسیله ریشه انجام می‌شود که آهن (III) با سایدروفور کیلیت شده و بدون اینکه به آهن (II) احیا شود به وسیله ناقلین موجود در ریشه جذب می‌شود، این مکانیسم استراتژی (II) نامیده می‌شود (۳۱). برای افزایش کارایی جذب آهن به وسیله گیاهان از کیلیت‌های سنتزی زیادی مخصوصاً از خانواده آمینوپولی کربوکسیلات‌ها مثل EDTA، DTPA و EDDHA به میزان گسترده‌ای استفاده می‌شود (۵۲). این کیلیت‌ها قابلیت دسترسی و

آهن (Fe) یکی از عناصر ضروری مهم برای گیاهان است که واکنش‌های سلولی مهمی مثل سنتز کلروفیل، تولید کلروپلاست و فرایندهای آنتی اکسیدانی سلول را کنترل می‌کند (۳۲). علی‌رغم فراوانی این عنصر در خاک‌ها، آهن اصولاً به فرم نامحلول فریک [Fe(III)] و غیر قابل دسترس برای گیاهان در خاک وجود دارد. گیاهان برای دستیابی به آهن خاک به دو مکانیسم مختلف عمل می‌کنند. در گیاهان دارای استراتژی (I) کاهش Fe(III) به Fe(II) به کمک آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (FCR) موجود در ریشه انجام

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

۵- استاد گروه شیمی، دانشگاه پیام نور مرکز مشهد

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استادان گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*- نویسنده مسئول: (Email: m.rsadaghiani@urmia.um.ac.ir)

گیاه را افزایش می‌دهد. در بین پلی ساکاریدها، کیتوسان^۱ (پلی مری از جنس کیتین) به دلیل داشتن گروه‌های زیاد آمین^۲ و کربوکسیل^۳، کی‌لیت‌کننده مناسب برای فلزات و منبع کربن و نیتروژن برای رشد و عملکرد گیاه می‌باشد. ولی کیتوسان به دلیل وزن مولکولی بالا، حلالیت کمی در آب دارد و در محیط‌های اسیدی ضعیف قابل حل شدن است. کیتوسان می‌تواند به زنجیره‌های کوتاه تر دپلی‌مریزه شود که این عمل منجر به افزایش حلالیت آن و همچنین افزایش گروه‌های عامل برای واکنش با فلزات می‌شود. هیدرولیز کیتوسان به دو روش اسیدی و آنزیمی قابل انجام است. در روش اسیدی از اسیدهایی چون HCl، H₂SO₄ و HNO₃ برای شکستن پیوندها و تولید کیتوسانی با وزن مولکولی کم استفاده می‌شود. در هیدرولیز آنزیمی کیتوسان می‌توان از آنزیم‌های اختصاصی مثل کیتیناز و آنزیم‌های غیر اختصاصی مثل سولاز و پکتیناز استفاده کرد (۲). کیتوسان امروزه در امور مختلفی به عنوان جاذب (۲۲)، سیستم انتقال دارو در بدن (۴۲) و کنترل بیماری‌های گیاهی (۲۵) مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهد که شاخص‌های بیوشیمیایی مثل فعالیت آنزیم‌های حاوی آهن می‌تواند برای ارزیابی کارایی جذب آهن در گیاه استفاده شود (۴۷). در گیاهان، بعد از جذب آهن در ریشه‌ها، انتقال آهن در آوندهای چوبی به کمک حامل‌هایی مثل سیترات، نیکوتین آمین و میوجینیک اسید انجام می‌شود (۲۸)، که این فرم آهن (III) بعد از انتقال به اندام‌های هوایی باید به آهن (II) کاهش یابد تا قادر به انتقال به سلول‌های مزوفیل برگ باشد. این عمل به کمک آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (Fe chelate reductase (FCR)) در سلول‌های برگ انجام می‌شود (۷). شواهد اولیه برای حضور این سیستم کاهشی در غشاء پلاسمایی سلول‌های مزوفیل، اولین بار به وسیله‌ی بروگمن و همکاران ارائه شد؛ آنها نشان دادند که یک مرحله‌ی کاهشی جذب آهن در سلول‌های مزوفیل برگ گیاه *Vigna unguiculata* اتفاق افتاد. مطالعات فیزیولوژیکی نیز بر اساس تقاضای آهن در سلول‌های برگ، سیستم کاهش آهن در برگ را تأیید می‌کنند. در مطالعات زیادی کاهش در فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ در پاسخ به کمبود آهن در گیاهان مطالعه شده است. این مطالعات بر روی گیاه آفتابگردان (۲۴)، انگور (۴۹)، کیوی (۴۶)، جو و سورگوم (۳۵) نشان دادند که فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ اغلب در گیاهان دارای کمبود آهن نسبت به گیاهانی که آهن را به حد کافی دریافت کرده‌اند، کمتر است. این مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ می‌تواند به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی وضعیت تغذیه ای آهن را در گیاه نشان دهد. در این پژوهش، ابتدا کی‌لیت‌های اسیدهای آمینه (متیونین،

زیست‌فراهمی آهن را در ناحیه ریزوسفر گیاه افزایش می‌دهند، اما مضرات زیادی دارند که استفاده از آنها را دچار تردید کرده است. زیست‌تجزیه پذیری کم و پایداری بالای این کی‌لیت‌ها در محیط زیست (۱۹) منجر به ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی می‌شود. کاربرد این کی‌لیت‌ها در کشت هیدروپونیک، باعث می‌شود که بعد از جذب آهن توسط گیاه، لیگاند‌های آزاد در محلول افزایش یابد و این لیگاند‌ها با دیگر عناصر فلزی در محلول مثل مس و منگنز کمپلکس‌های قوی ایجاد کرده و قابلیت دسترسی آنها را برای گیاه کاهش می‌دهند (۳). در محلول‌پاشی، کی‌لیت‌های سنتزی می‌توانند یون‌های کلسیم موجود دیواره سلولی گیاه را به دام ببندازند و منجر به تخریب بافت برگ گیاه شوند (۳۴). کی‌لیت‌های سنتزی نسبت به تجزیه نوری غیر مقاوم هستند و نیمه عمر ترکیباتی چون Fe-EDTA و Fe-DTPA در مقابل نور فرابنفش ۸ تا ۱۱ دقیقه گزارش شده است (۵۱). هانگارت و استاسینوپولوس (۱۷) مشاهده کردند که Fe-EDTA در مقابل نور سفید به ترکیبات گلیو زایلیک اسید و فرم‌الدهید تجزیه می‌شود که این دو ترکیب ممانعت‌کننده از رشد گیاه می‌باشند. با توجه به مضرات این کی‌لیت‌ها، جایگزین کردن ترکیباتی با مضرات کمتر ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً کی‌لیت‌های آلی فلزی که تحت عنوان ترکیبات دوستار محیط زیست شناخته شده‌اند در حال یافتن جایگاه مناسبی در بین کودهای مورد استفاده در کشاورزی هستند.

مطالعات نشان می‌دهد که کاربرد ترکیبات آلی مثل اسیدهای آمینه و پلی ساکاریدها به عنوان عوامل کی‌لیت‌کننده عناصر فلزی مورد نیاز گیاه می‌تواند در بهبود کیفیت تغذیه‌ای آهن برای گیاهان مورد استفاده قرار گیرد و این کی‌لیت‌ها غلظت آهن و قابلیت دسترسی آن را برای گیاه افزایش می‌دهند (۴۸). این ترکیبات آلی ویژگی‌هایی دارند که استفاده از آنها را برای کاربری کشاورزی به عنوان کی‌لیت‌کننده فلزات و افزایش قابلیت دسترسی آنها مناسب کرده است. زیست‌تجزیه پذیری پایین این ترکیبات در خاک‌ها، سمیت کم، حساسیت کم آنها به تجزیه نوری و تأثیر مثبت روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها و همچنین شاخص‌های رشد گیاه این ترکیبات را برای کاربری کشاورزی منحصر به فرد کرده است (۲۱). قاسمی و همکاران (۱۵) با اضافه کردن کی‌لیت‌های اسیدهای آمینه و فلز روی به محیط رشد گیاه کاهو مشاهده کردند که علاوه بر افزایش رشد و عملکرد گیاه، انتقال موثر عنصر روی به اندام‌های هوایی نسبت به شاهد در گیاه اتفاق می‌افتد. اسیدهای آمینه هم‌چنین با کمک به بهبود فرایند فتوسنتز، ساخت پروتئین‌ها و رونویسی mRNA قادر به افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌باشند. مطالعات نشان داده است که کاربرد آرجینین (۱۳) و گلوتامین (۴۵) به طور معنی‌داری رشد و عملکرد

تعیین ویژگی‌های کی‌لیت‌های آلی-آهن

اسپکتروسکوپی IR با استفاده از دستگاه FT-IR-8400 Shimadzu در رنج 400 تا 4000 cm^{-1} با صفحه‌ی KBr انجام شد. مقدار کربن، نیتروژن و هیدروژن ترکیبات با استفاده از دستگاه Thermo Finnigan Flash 1112EA elemental analyzer اندازه‌گیری شدند. غلظت آهن با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer 3030, USA تعیین شد. عملکرد واقعی واکنش یعنی مقدار محصول بدست آمده در یک واکنش شیمیایی (با در نظر گرفتن خطاهای آزمایشگاهی) که بر حسب گرم یا به صورت مول بیان می‌شود. درصد عملکرد در واقع کارایی فرایند سنتز را نشان می‌دهد و از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود:

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

که عملکرد نظری (عملکرد نظری در واقع ماکزیمم مقدار محصول تولید شده در یک واکنش شیمیایی که بر اساس فرمول شیمیایی می‌تواند بدست بیاید، است) با استفاده از محاسبات استیکیومتری بر اساس تعداد مول‌های شرکت‌کننده در واکنش محاسبه می‌شود (۲۶). اندازه کی‌لیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem تعیین شد.

به منظور تعیین حلالیت عناصر و مقدار عنصر کمپلکس شده با کی‌لیت از روش ویلن و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. برای تعیین حلالیت عناصر، ۵ گرم از هر ترکیب با ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر به مدت ۳۰ دقیقه شیک شدند و سپس حجم محلول به ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. محلول‌ها فیلتر شدند و بعد از حذف ترکیبات آلی (فیلتر ۰/۴۵ میکرون) غلظت عنصر آهن به کمک دستگاه جذب اتمی (Perkin Elmer 3030, USA) اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین غلظت عنصر کمپلکس شده، ۵ گرم از هر کمپلکس در آب مقطر دوبار تقطیر حل شد و به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. ۲۰ میلی لیتر از هر محلول برداشته شد و دو قطره H_2O_2 (۳۳ درصد) به آن اضافه گردید و سپس pH محلول با NaOH (۰/۵ مولار) به ۹ رسانیده شد. بعد از ۳۰ دقیقه دوباره pH در ۹ تنظیم شد و سپس در ظروف با پارافیلیم پوشیده شد. محلول‌ها یک روز در تاریکی باقی ماندند. سپس pH دوباره به ۹ تنظیم شد و نمونه‌ها به فلاسک‌های حجمی ۱۰۰ میلی لیتری انتقال پیدا کردند و با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم رسانیده شدند. در انتها محلول‌ها از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند و عناصر کمپلکس شده با دستگاه جذب اتمی تعیین شدند. قبل از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرون در صورت مشاهده‌ی رسوب در برخی از نمونه‌ها لازم است که محلول‌ها با دور ۷۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شوند.

تیروزین، فنیل آلانین و گلایسین) و دو فرم کیتوسان (هیدرولیز شده اسیدی و آنزیمی) سنتز شد و سپس با دو هدف (۱) انتخاب مناسب‌ترین کی‌لیت آهن بر اساس استراتژی‌های مختلف جذب آهن در دو گیاه لوبیا و ذرت و (۲) مقایسه‌ی اثر تغذیه کی‌لیت‌های آلی آهن روی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ در طول زمان، کارایی این منابع آلی تامین‌کننده آهن، بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی کی‌لیت‌های کیتوسان-آهن

کیتوسان به دو روش اسیدی و آنزیمی هیدرولیز شد. برای ساخت کیتوسان هیدرولیز شده به روش آنزیمی ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر کیتوسان ۲/۲ درصد (Medium Molecular Weight-Aldrich)، حل شده در بافر استات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = 4.0)، با ۲۰ میلی لیتر آنزیم خالص سلولاز (100 U/ml) مخلوط شد و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت نگهداری شد (۴۱). بعد از چهار ساعت برای توقف فعالیت آنزیم، محلول، ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سپس در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. برای تهیه کیتوسان هیدرولیز شده‌ی اسیدی، ۵ گرم پودر کیتوسان در ۵۰ سی‌سی HCl یک مولار حل شد و سپس به مدت چهار ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. کیتوسان هیدرولیز شده با اتانول در نسبت ۱ : ۳ (V/V) رسوب داده شد و سپس با فرایند مکش در حضور هیدروکسید سدیم خشک شد (۳۹). به منظور آماده‌سازی کی‌لیت‌های کیتوسان هیدرولیز شده با فلز آهن، ۰/۳ گرم کیتوسان هیدرولیز شده با $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در نسبت مولاری چهار به یک در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک (۵٪) حل شده و سپس با اضافه کردن $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pH محلول به ۷ افزایش داده شد. مخلوط در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد 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 کی‌لیت کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی-آهن [Fe-C(A.hyd)] و کیتوسان هیدرولیز شده آنزیمی-آهن [Fe-C(E.hyd)] آماده شدند.

آماده‌سازی کی‌لیت‌های اسید آمینه-آهن

اسیدهای آمینه متیونین (Met)، فنیل آلانین (Phe)، تیروزین (Tyr) و گلایسین (Gly) به عنوان لیگاند با نمک $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ با نسبت مولاری ۲ به ۱ مخلوط شدند (۳۹). مخلوط در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت روی هیتر قرار گرفت. کی‌لیت‌های اسید آمینه‌های با فلز آهن (II) با استفاده از اتانول ۹۵ درصد و هواخشک شدن تهیه شدند. در انتها کی‌لیت‌های گلایسین-آهن (II) (Fe-Gly)، فنیل آلانین-آهن (II) (Fe-Phe)، تیروزین-آهن (II) (Fe-Tyr) و متیونین-آهن (II) (Fe-Met) سنتز شدند.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های شیمیایی کی‌لیت‌های تهیه شده

Table 1- Chemical characteristics of chelates

ترکیب Compound	رنگ Color	pH محلول Solution pH	pH شروع رسوب Precipitation pH	حلالیت عنصر (گرم بر کیلوگرم) Soluble element (g kg ⁻¹)	عنصر کمپلکس شده (گرم بر کیلوگرم) Complexed element (g kg ⁻¹)	بخش کمپلکس شده (درصد) Complexed fraction (%)
Fe(Chi) ₂ -acid-hyd	Dark Brown	3.5	5.5	44.31	43.42	98
Fe(Chi) ₂ -enzymatic-hyd	Light Brown	3.8	5.0	39.50	29.50	74
[Fe(Gly)].(SO ₄) ₂ .5H ₂ O	Dark Red	4.5	5.0	181.2	108.6	60
[Fe(Phe)].(SO ₄) ₂ .5H ₂ O	Light Red	3.2	5.2	21.50	10.20	47
[Fe(Met) ₂].(SO ₄).H ₂ O	Red	3.3	5.0	56.12	30.86	55
[Fe(Tyr) ₃].(SO ₄).0.5H ₂ O	Light green	3.6	6.5	14.21	07.10	50
Fe-EDDHA	Red	----	----	14.11	13.26	93

(۳۰).

طراحی آزمایش

دو گونه گیاهی ذرت (*Zea mays*) به عنوان گیاه استراتژی (I) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) به عنوان گیاه استراتژی (II) انتخاب شدند. دانه‌های گیاهان در محیطی شامل کوکویت، پرلیت و ورمی کمپوست (۱:۱:۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در تاریکی جوانه زده و تا مرحله گیاهچه‌ای رشد کردند. سپس گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی که حاوی محلول‌های غذایی آماده شده طبق جدول ۲ بودند، انتقال یافتند. در محلول‌های غذایی به جای فلز آهن از کی‌لیت‌های سنتزی اسیدهای آمینه و کیتوسان شامل [Fe-C(A.hyd)]، [Fe-C(E.hyd)]، [Fe-Gly]، [Fe-Phe]، [Fe-Met]، [Fe-Tyr] و Fe-EDDHA (به عنوان شاهد) استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه و در شرایط ثابت و کنترل شده، با ۸ ساعت نور در روز و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ تا ۷۵ درصد قرار گرفتند. برای ثابت نگه داشتن غلظت، هر هفته محلول‌های غذایی تعویض شدند. بعد از ۸ هفته گیاهان برداشت شدند. ریشه و اندام‌های هوایی به طور جداگانه جداسازی و بعد از شستشو با آب مقطر در آن در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده پودر شدند و در کوره الکتریکی و دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر شدند. خاکستر گیاهان در اسید کلریدریک ۲ مولار و با کمک حرارت هضم شدند و پس از رساندن به حجم مشخص، مقادیر آهن در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin Elmer 3030, USA تعیین شدند (۱۱). فاکتور انتقال^۱ با استفاده از رابطه‌ی زیر تعیین شد:

درصد فرکشن کمپلکس شده بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه شد (۵۳).

$$\text{Complexed fraction} = \frac{\text{complexed}}{\text{soluble}} \times 100 \quad (۲)$$

در این رابطه عنصر کمپلکس شده در صورت کسر و عنصر محلول در مخرج کسر مشخص شده است.

به منظور ارزیابی pH نهایی محلول‌ها، محلول کمپلکس‌های آهن با غلظت ۵ میلی‌مولار آماده شدند. نمونه‌ها در یک شیکر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دور ۵۰ rpm به مدت یک ساعت قرار گرفتند، سپس pH محلول‌ها با استفاده از pH متر مدل Metrohm 691, Switzerland تعیین شدند. برای تعیین pH رسوب کمپلکس‌های آلی آهن، NaOH و HCl به تدریج به محلول‌های ۵ میلی‌مولار کمپلکس‌های آلی آهن اضافه شدند، تا زمانی که رسوب مشاهده شود، سپس قرائت pH با pH متر انجام شد. نتایج حاصل از بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کمپلکس‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

به منظور تعیین پایداری کمپلکس‌های آلی آهن در محلول‌های غذایی، ۶ محلول غذایی (NS1-NS7، جدول ۳) با آب مقطر با محلول‌های استاندارد هوگلند (جدول ۳) آماده شدند. pH نهایی محلول با HCl و NaOH به ۵/۵ تا ۶ تنظیم گردید. آهن از ۶ منبع آهن شامل [Fe-C(A.hyd)]، [Fe-C(E.hyd)]، [Fe-Gly]، [Fe-Phe]، [Fe-Met] و Fe-Tyr با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌ها برای جلوگیری از تجزیه نوری در تاریکی قرار داده شدند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰ rpm شیک شدند. در پایان محلول رویی با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند و غلظت عنصر آهن با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد

جدول ۲- ترکیب محلول غذایی

Table 2- Composition of nutrient solution

ترکیب	غلظت (میلی مولار)	ترکیب	غلظت (میلی مولار)
Component	Concentration (mM)	Component	Concentration (mM)
KNO ₃	1.00000	H ₃ BO ₃	0.0200
Ca(NO ₃) ₂	1.00000	MnSO ₄	0.0020
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.00000	ZnSO ₄	0.0020
MgSO ₄	1.00000	CuSO ₄	0.0005
KCl	0.05000	NiSO ₄	0.0010
H ₂ Mo ₇ O ₄	0.00002	Fe-Organic chelates or Fe-EDDHA	0.1000

نکته: در همه‌ی محلول‌های غذایی pH=5.5-6 بود.

مولاری ۲۲/۱۴ تعیین شد و با استفاده از وزن اندام هوایی تازه، فعالیت کاهشی آهن در برگ تعیین شد.

(۳) $TF = C_{shoot}/C_{root}$
 غلظت فلز در اندام هوایی و C_{root} ، غلظت فلز در ریشه گیاه می‌باشد.

آنالیزهای آماری

مقایسه میانگین و آنالیز واریانس تیمارهای آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سه تکرار تعیین شدند و میانگین‌ها در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ با آزمون دانکن مقایسه شدند. نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های کی‌لیت‌های آلی-آهن

کی‌لیت‌های اسیدهای آمینه‌ی گلايسين، فیل آلانین، متیونین و تیروزین با $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ با نسبت مولی ۲ به ۱ و کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی و آنزیمی با $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ با نسبت مولی ۴ به ۱ و با عملکرد بیش تر از ۸۰ درصد ساخته شدند. نتایج جدول ۳ نشان دادند که کی‌لیت‌های آلی آهن پایداری بالایی را در محلول‌های غذایی نشان دادند. درصد آهن باقی مانده در محلول‌های غذایی بعد از ۵ روز برای Fe-Ch(A.hyd) و Fe-Tyr بیش از ۹۰ درصد مشاهده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (FCR)

فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در برگ گیاهان با استفاده از روش چنی و همکاران (۱۰) تعیین شد. برای این منظور برگ‌های تازه و انتهایی هر گیاه جدا شده و پس از انتقال به آزمایشگاه، وزن شدند و تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در لوله‌های آزمایش حاوی $CaSO_4$ ۰/۲ میلی‌مولار برای مدت ۱۰ دقیقه شناور شدند. سپس این محلول با ۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد شامل بافر MES [2-(4-Morpholino) ethane sulfonic acid] - با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار و $pH=5.5$ ، EDTA- Fe^{+3} ۰/۱ مولار، $CaSO_4$ ۱۰ میلی‌مولار و سدیم باتو فنانترویلین دی سولفونیک اسید [Na-BPDS] ۰/۳ میلی‌مولار جایگزین شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در نور قرار داده شدند و سپس در یک شیکر درون آب گرم در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰ rpm به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. بعد از آنکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر از محلول درون هر لوله آزمایش برداشته شد و با کمک دستگاه اسپکتروسکوپی و در طول موج ۵۳۵ نانومتر میزان جذب نور اندازه‌گیری شد. غلظت Fe^{+2} -BPDS با استفاده از ضریب

جدول ۳- درصد آهن باقی‌مانده در محلول بعد از ۵ روز اثرات متقابل در محلول‌های غذایی

تفاوت حروف نشان دهنده‌ی معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Table 3- Percentage of Fe remained in solution after 5 days of interaction in nutrient solution

Different letters denote significant differences following Duncan test (n=3, p<5%)^a.

محلول غذایی	کی‌لیت‌های آلی آهن	درصد آهن باقیمانده در محلول
Nutrient solution	Fe-organic chelates	Percentage(%) of Fe remaining in solution
NS ₁	Fe-Chi(A.hyd)	92 ^a
NS ₂	Fe-Chi(E.hyd)	71 ^b
NS ₃	Fe-Gly	88 ^a
NS ₄	Fe-Phe	65 ^b
NS ₅	Fe-Met	85 ^a
NS ₆	Fe-Tyr	91 ^a
NS ₇	Fe-EDDHA	90 ^a

^a pH of nutrient solutions in all of samples adjusted in 6 on based Hoagland & Arnon, 1950.

جدول ۴- داده‌های آنالیتیکی برای کیلیت‌های سنتز شده‌ی آهن

Table 4- Analytical data for synthesized Fe-Chelates

کیلیت‌های آلی آهن Fe organic chelates	وزن مولکولی Molecular weight	اندازه کیلیت (نانومتر) Size of chelate (nm)	راندمان (%) Yield	مشاهده شده (محاسبه شده) (%) Found (Calculated) (%)		
				C	H	N
Fe(Chi) ₂ -acid-hyd	564.14	1.72	85.20	43.12 (44.28)	7.70 (7.45)	6.96 (6.01)
Fe(Chi) ₂ -enzymatic-hyd	523.12	2.24	84.00	44.31 (45.82)	6.32 (7.56)	5.78 (6.01)
[Fe(Gly) ₂ .SO ₄].5H ₂ O	413.11	0.51	83.15	6.30 (5.81)	4.17 (3.66)	2.97 (4.17)
[Fe(Phe) ₂ .SO ₄].4H ₂ O	721.80	1.30	83.11	43.3.1 (44.48)	6.91 (5.89)	5.41 (5.74)
[Fe(Met) ₂ .SO ₄].H ₂ O	468.35	1.12	80.25	25.98 (25.64)	5.95 (5.17)	5.50 (5.98)
[Fe(Tyr) ₃ .SO ₄].0.5H ₂ O	704.48	1.25	81.36	46.17 (46.03)	6.33 (4.86)	5.81 (5.96)

جدول ۵- باندهای IR انتخابی اسیدهای آمینه و کیتوسان با آهن (دیسک KBr)

Table 5- Selected IR bands (cm⁻¹) of amino acids and chitosan with Fe (KBr disk)

کیلیت‌های آلی - آهن Fe - Organic chelates	v (NH ₂)	v _{asym} ¹ (COO ⁻)	v _{sym} ² (COO ⁻)	v (C-N)	Δ (v _{asym} - v _{sym})	Fe-N	Fe-O
Fe(Chi) ₂ -acid-hyd	3429.2	1610.5	1410.0	1103.2	200.5	450	617
Fe(Chi) ₂ -enzymatic-hyd	3465.0	1600.2	1415.0	1095.0	185.2	480	652
[Fe(Gly)].(SO ₄).5H ₂ O	3413.8	1593.1	1392.8	1080.1	200.3	509	624
[Fe(Phe) ₂].SO ₄ .4H ₂ O	3421.3	1682.2	1489.8	1148.1	192.4	482	675
[Fe(Met) ₂].(SO ₄).H ₂ O	3444.6	1608.5	1405.0	1107.1	203.5	570	617
[Fe(Tyr) ₃].(SO ₄).0.5H ₂ O	3205.5	1589.2	1380.0	1153.4	209.5	470	493

1- Asymmetric

2- Symetric

با فلز آهن می‌باشد. تغییرات در فرکانس پیوندهای گروه‌های آمین و کربوکسیل نشان دهنده‌ی واکنش فلز آهن با این گروه‌های عامل در ترکیبات آلی می‌باشد. باندهای جدیدی در کمپلکس‌های آلی آهن در مناطق بین ۴۵۰ تا ۶۷۵ مشاهده شد که به ترتیب مربوط به پیوندهای Fe-O و Fe-N می‌باشند.

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کمپلکس‌های آهن در جدول ۱ نشان داده شده است. در کاربرد ترکیبات آلی مثل اسیدهای آمینه و کیتوسان برای کمپلکس کردن فلزات به دلیل تغییر زیاد در ساختار عوامل کمپلکس کننده و حضور مکان‌های باند شدن متغیر بر روی آنها، می‌توان از درصد کمپلکس شدن آنها با فلزات در محلول برای ارزیابی پایداری آنها در محیط‌های محلول استفاده کرد. در pH ثابت، کمپلکس‌های آهن فرکشن بالای کمپلکس شدن را نشان دادند و مخصوصاً کیتوسان هیدرولیز شده‌ی اسیدی که ۹۸ درصد با آهن تشکیل کمپلکس داد (جدول ۱). تفاوت بین ترکیبات در ایجاد کمپلکس با فلز آهن به ساختار مکان‌های باند شدن بر روی آنها بستگی دارد. کیتوسان غنی است از گروه‌های آمین و کربوکسیل که به راحتی دی‌پروتونه می‌شوند و ظرفیت کمپلکس شدن با فلز را افزایش می‌دهند. در کمپلکس‌های اسیدهای آمینه با آهن درصد کمپلکس شدن کاهش می‌یابد که ممکن است به دلیل جایگزینی آهن (Log_{FeL} = 5.52) از درون کمپلکس با دیگر فلزات مثل مس و روی (Log_{CuL} = 18.29) باشد (۵۰). نتایج دیگر محققین نشان

داده‌های آنالیتیکی برای کیلیت‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. همه کیلیت‌های آلی با فرمول شیمیایی [Fe(L-L')₂] سنتز شدند. اسیدهای آمینه و کیتوسان در حالت کریستالی به صورت یون‌های دوقطبی با چند گروه عامل^۱ وجود دارند و فرکانس‌های غالب برای لیگاند‌های آزاد با پیوندهای δ_d (NH₂), ν_s (COO⁻), ν_a (COO⁻), δ_d (NH₂), δ_s (NH₂), ν_s (CNN) و ν_a (CNN) همراه است (۸). در این ترکیبات، اسیدهای آمینه و کیتوسان به صورت لیگاند‌های دودندانه عمل می‌کنند و با یک اتم اکسیژن و یک اتم نیتروژن با فلزات پیوند می‌دهند. پیوندهای غالب در مشارکت با کیلیت‌های اسیدهای آمینه و کیتوسان با پیوندهای ν (C-N), ν (C=O), ν (NH₂), δ (C=O) و ν (C-N), O, برای کیلیت‌های آلی با فلز آهن در جدول ۵ نشان داده شده است. اسپکتروسکوپی IR کیلیت‌ها الگوی جذب مشابهی را در مقایسه با لیگاند‌های آزاد و در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ نشان دادند. برای گروه‌های -NH₂ پیوندهای ویبریشنال در کیلیت‌های آلی با فلز آهن در محدوده ۳۲۰۰-۳۵۰۰ cm⁻¹ مشاهده شدند که این پیوندها به واکنش‌های بین مولکولی در حالت جامد بسیار حساس بوده به طور گسترده‌ای پیک‌های واضح نشان می‌دهند. باندهای جذب کمپلکس‌ها در محدوده‌های ۱۶۰۰ و ۱۴۰۰ cm⁻¹ می‌تواند به ترتیب مربوط به ν_{asym} (COO⁻) و ν_{sym} (COO⁻) باشد. مقادیر Δ (ν_{asym}-ν_{sym}) > 200 cm⁻¹ نشان دهنده‌ی باندهای تک دندانه‌ی گروه‌های کربوکسیل

می‌دهد که فلز آهن در کمپلکس با اسید آمینه‌ی تیزورین و کیتوسان هیدرولیز شده‌ی اسیدی، درصد کمپلکس شدن بالایی را تقریباً نزدیک به Fe-EDDHA نشان داد. این موضوع پایداری بیشتر کمپلکس‌ها را در محیط‌های آبی نشان می‌دهد (۱۴).

می‌دهد که درصد کمپلکس شدن بالای ۵۰ درصد می‌تواند کارایی کمپلکس‌ها را در محلول تایید کند (۵). لیوسنا و چنی (۲۰۰۵ a) بیان کردند که کاربرد کی‌لیت‌هایی از ترکیبات آهن که پایداری خیلی بالایی داشته باشند، می‌توانند منجر به کاهش جذب آهن توسط گیاه مخصوصاً در محیط‌های کشت آبی گردند (۲۹). نتایج جدول ۱ نشان

جدول ۶- تجزیه واریانس کاربرد کی‌لیت‌های آلی آهن بر برخی پارامترهای رشد و مقدار آهن در اندام هوایی و ریشه ذرت (الف) و لوبیا (ب)
Table 6- Analysis of variance of application of Fe organic chelates on some growth indexes and Fe content in shoot and root of corn (A) and bean (B)

میانگین مربعات Mean square						
منابع تغییرات Source	درجه آزادی Bradford	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry matter	وزن خشک ریشه Root dry matter	مقدار آهن در اندام هوایی Shoot Fe content	مقدار آهن در ریشه Root Fe content	فاکتور انتقال Translocation factor
تیمار Treatment	6	428.97***	30.91**	51916.89***	126104.74***	0.973***
خطا (Error)	14	18.5	4.01	285.62	9857.53	0.027
ضریب تغییرات (%) (CV)		8.06	15.22	6.86	9.63	8.21

میانگین مربعات Mean square						
منابع تغییرات Source	درجه آزادی (Bradford)	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry matter	وزن خشک ریشه Root dry matter	مقدار آهن در اندام هوایی Shoot Fe content	مقدار آهن در ریشه Root Fe content	فاکتور انتقال Translocation factor
تیمار (Treatment)	6	38.83**	1.183**	57819.9***	91662.31***	0.748***
خطا (Error)	14	9.80	0.332	1188.85	91662.31***	0.008
ضریب تغییرات (%) (CV)		10.38	7.91	13.57	12.34	11.36

*** و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۱ و ۰/۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن
***0.1 significant and ** 0.5 significant correlations with Duncan's test

انجام می‌شود و همچنین فعالیت آنزیم‌های درگیر با آهن مثل FCR کاهش می‌یابد (۳۰). این نتایج می‌تواند دلیلی بر جایگزینی کی‌لیت‌های آلی آهن بجای کی‌لیت‌های سنتزی آن باشد. pH اولیه همه کی‌لیت‌ها بسیار کم و بین ۳/۲ تا ۴/۵ متغیر بودند.

ولی ترکیبات سنتزی مثل EDDHA تجزیه زیستی ضعیف‌تری نسبت به ترکیبات آلی داشته و ثابت پایداری بالاتری دارند. تحقیقات لیوسنا و چنی (۲۰۰۵ b) نشان دادند که هر چه ثابت پایداری کمپلکس‌های آهن بالاتر باشد، جذب آهن توسط گیاه با شدت کمتری

تعداد بیشتری از یون‌های فلزی پیوند برقرار می‌کنند (۱۸). از طرفی پس از شکسته شدن کیتوسان، وزن مولکولی آن کمتر شده و واکنش‌پذیری آن افزایش می‌یابد. همچنین هر چه اندازه مولکولی کیلیت‌ها کوچکتر باشد جذبشان راحت‌تر انجام می‌شود. گزارش شده است که به دلیل اندازه مولکولی بزرگ کیلیت‌های سنتزی مثل Fe-EDTA و Fe-EDDHA، جذب گیاهی این ترکیبات بسیار کمتر از کاتیون‌های فلزی آزاد است. نرم‌افزار Hyperchem نشان داد که قطر مولکولی کیلیت‌های آلی آهن خیلی کوچکتر از اندازه‌ی منافذ دیواره‌ی سلولی (کمتر از ۵ نانومتر) (۳۲) می‌باشد (جدول ۴). بنابراین منافذ موجود در دیواره‌ی سلولی مانعی برای جذب و حرکت کیلیت‌های آلی به فضای آزاد آپوپلاست نیست و بنابراین کیلیت‌های آلی آهن می‌توانند به راحتی از میان دیواره‌ی سلولی عبور کرده و وارد فضای آپوپلاست سلول‌های ریشه شوند. انتقال این کیلیت‌ها نیز از محلول غذایی به دیواره‌ی سلول‌های ریشه از طریق فرایندهای پخشیدگی و جریان توده‌ای اتفاق می‌افتد. تغییرات وزن خشک دو گیاه ذرت و لوبیا، در کاربرد کیلیت‌های مختلف متفاوت بود. تفاوت در پاسخ گیاهان به کیلیت‌های آلی می‌تواند به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی، تفاوت در میزان نیاز هر گیاه به عنصر آهن و یا تفاوت در استراتژی‌های جذب آهن در هر گونه گیاهی باشد. قاسمی و همکاران (۲۰۱۲) در کاربرد کیلیت‌های اسیدهای آمینه و آهن روی دو وارپته از گیاه گوجه فرنگی بیان کردند که در هر دو وارپته کیلیت‌های گلایسین-آهن و هیستیدین-آهن منجر به افزایش رشد و عملکرد اندام هوایی و ریشه‌ی گیاهان شدند ولی کیلیت آرچنین-آهن فقط در یکی از وارپته‌ها منجر به افزایش عملکرد شد. آنها بیان کردند که دلیل این امر احتمالاً تفاوت در تنوع ژنتیکی وارپته‌های مختلف گوجه فرنگی می‌باشد و همچنین ممکن است یک وارپته توانایی کمتری در جذب آهن به فرم کیلیت آرچنین-آهن داشته باشد (۱۵).

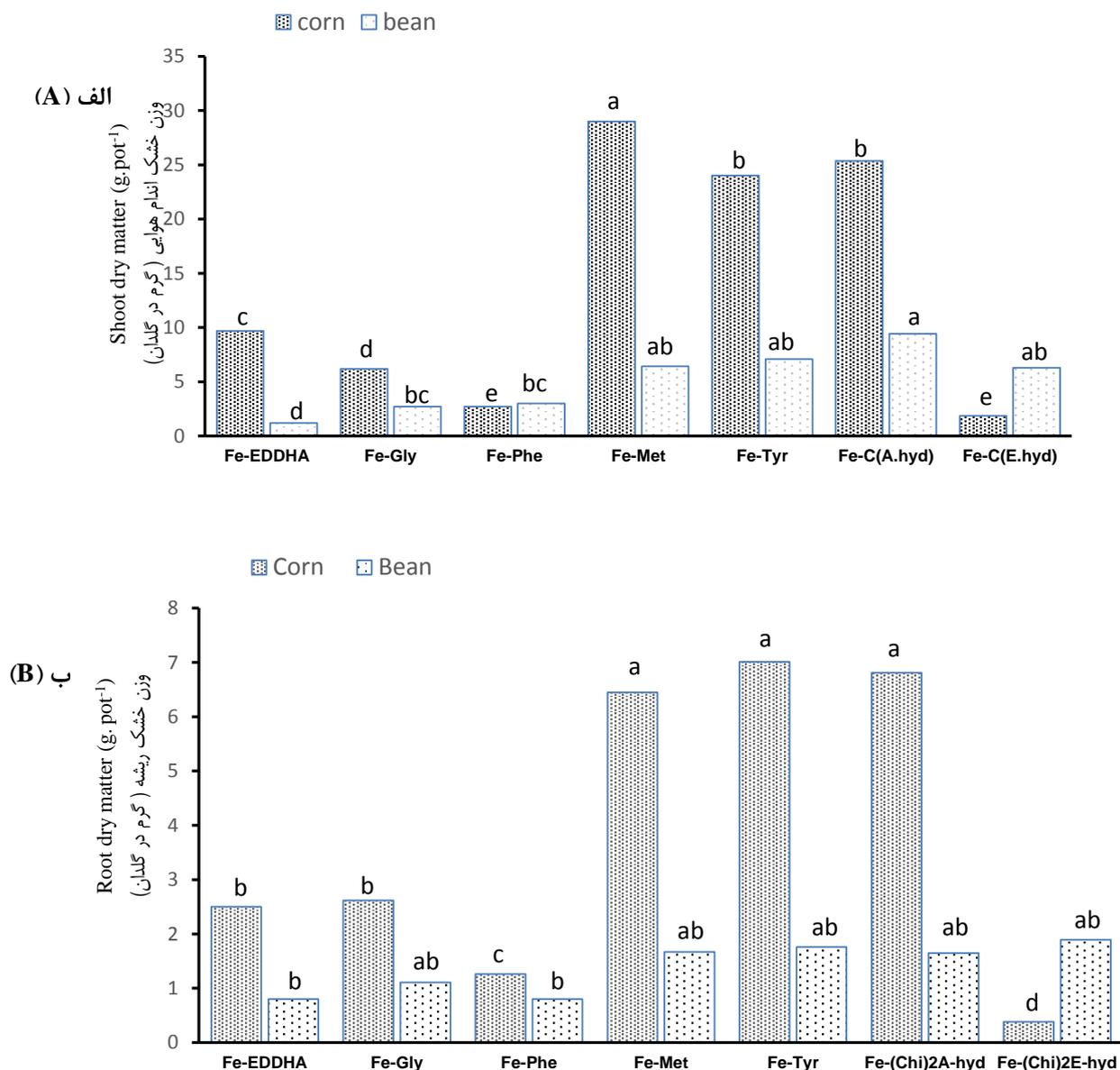
pH شروع رسوب در کیلیت‌های کیتوسان-آهن یا کیلیت‌های اسیدآمینه-آهن تفاوت زیادی نداشت. در کیلیت Fe-Tyr، pH شروع رسوب بیشترین بود، این امر نشان می‌دهد که تحمل به pH های بالا در این کیلیت بیشتر است ولی به طور کلی همه کیلیت‌های آلی آهن قادر به تحمل pH های بالا نبوده و رسوب می‌کنند. بعد از Fe-Tyr، [Fe-C(A.hyd)] در pH بالاتری نسبت به بقیه کیلیت‌ها شروع به رسوب کرد. نتایج نشان می‌دهند که کیلیت‌های سنتز شده‌ی آهن، شرایط اولیه را برای استفاده در امر تغذیه گیاه دارا هستند. هر چند مطالعات شیمیایی بیشتر مثل کریستالوگرافی و نمودارهای پایداری کیلیت‌ها می‌توانند اطلاعات دقیق‌تری را در اختیار قرار دهند.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۶) نشان می‌دهد که کاربرد کیلیت‌های آلی آهن بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه در هر دو گیاه لوبیا و ذرت معنی‌دار بود.

استفاده از برخی کیلیت‌های آلی آهن در شرایط آبکشت به طور معنی‌داری وزن خشک اندام هوایی را در دو گیاه ذرت و لوبیا در مقایسه با کیلیت Fe-EDDHA (شاهد) افزایش داد (شکل ۱-الف). اثر کیلیت‌های مختلف آهن روی رشد گیاه به نوع گیاه و نوع کیلیت بستگی داشت.

در هر دو گیاه ذرت و لوبیا کاربرد کیلیت آلی کیتوسان در فرم هیدرولیز شده‌ی اسیدی، [Fe-C(A.hyd)]، به ترتیب منجر به ۲/۶ و ۴/۷ برابر افزایش در وزن خشک اندام هوایی نسبت به Fe-EDDHA شد. در بین کیلیت‌های اسیدهای آمینه-آهن، کاربرد Fe-Met و Fe-Tyr در گیاه ذرت منجر به افزایش معنی‌داری در وزن خشک اندام هوایی نسبت به Fe-EDDHA گردید. در گیاه لوبیا کیلیت‌های اسیدهای آمینه-آهن نیز وزن خشک اندام هوایی را به طور معنی‌داری نسبت به Fe-EDDHA افزایش دادند ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای اسیدهای آمینه-آهن مشاهده نشد. شکل ۱-ب تغییرات وزن خشک ریشه را در گیاه ذرت و لوبیا در مقایسه با Fe-EDDHA نشان می‌دهد. وزن خشک ریشه گیاهان نیز تحت تاثیر کاربرد کیلیت‌های مختلف آهن بود. کاربرد کیلیت‌های آلی [Fe-C(A.hyd)، Fe-Met و Fe-Tyr] در گیاه ذرت به طور معنی‌داری وزن خشک ریشه را نسبت به Fe-EDDHA افزایش دادند. در گیاه لوبیا تفاوت معنی‌داری بین کیلیت‌های آلی آهن و Fe-EDDHA در افزایش وزن خشک ریشه‌ها مشاهده نشد. ترکیبات آلی ویژگی‌های منحصر به فردی دارند که آنها را برای کمک به افزایش عملکرد گیاهان ایده آل می‌کند. کیتوسان با داشتن گروه‌های عامل نیتروژنی و کربنی و همچنین خاصیت کیلیت‌کنندگی فلزات، یک ترکیب پایدار و موثر در تغذیه گیاهان می‌باشد (۴۳). فرم هیدرولیز شده‌ی کیتوسان سطوح واکنش‌پذیر بالاتری را ایجاد کرده و گروه‌های عامل آن با



شکل ۱- مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی (الف) و ریشه (ب) دو گیاه ذرت و لوبیا در محلول‌های غذایی مختلف آهن

(مقایسه میانگین‌ها برای دو گیاه به صورت جداگانه توسط آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شده است).

Figure 1- Comparison of means of shoot (A) and root (B) dry matter of corn and bean in different iron nutrient solution (mean comparison was down with Duncan test ($P < 0.05$) for each plant separately)

متیونین در خاک به دلیل افزایش میزان اکسین و اتیلن و همچنین تاثیر بر افزایش جمعیت میکروبی منجر به بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شود. همچنین اسیدهای آمینه منجر به سنتز mRNA، پروتئین‌ها و قندها در گیاه شده و کیفیت و عملکرد گیاه را افزایش می‌دهند (۳۶). مطالعات دیگر نیز نشان داده است که شدت جذب اسیدهای آمینه به گونه گیاهی و ویژگی‌های اسیدهای آمینه بستگی دارد. در ساختار

تاثیر اسیدهای آمینه روی افزایش رشد و عملکرد گیاه نیز به دلیل داشتن نیتروژن فراوان در ساختار مولکولی آن‌ها است. گزارش شده است که برخی از اسیدهای آمینه در ریزوسفر ریشه نیز فراوان هستند (۲۰) و نقش مهمی را تغذیه انسان و گیاهان دارند. مطالعات نشان داده است که پایداری کمپلکس‌های اسیدهای آمینه در آب نیز بالا می‌باشد. محمد و فرانکن برگر (۱۹۹۰) دریافتند که کاربرد تریپتوفان و

راحتی نمی‌توان تشخیص داد که افزایش رشد گیاه به دلیل جذب آهن بوده است یا فراهمی بیشتر نیتروژن به فرم اسیدهای آمینه و یا حتی به دلیل تاثیر هورمونی اسیدهای آمینه. مطالعات نشان داده است که با افزایش غلظت نیتروژن در محیط رشد گیاه غلظت آهن در اندام‌های هوایی گیاه نیز افزایش می‌یابد (۱). افزایش در مقدار آهن در اندام هوایی گیاهان با افزایش مقدار نیتروژن توسط کوتمن و همکاران (۲۰۱۰) نیز در گیاه گندم گزارش شده است (۲۷). دلیل این امر می‌تواند افزایش رشد به دلیل تاثیر نیتروژن باشد. تغذیه نیتروژنی همچنین می‌تواند تاثیرات مثبتی روی تجمع آهن در گیاهان داشته باشد. در این مطالعه مشاهده شد که میانگین افزایش نسبی در مقدار آهن در اندام‌های هوایی ذرت در کاربرد کی‌لیت‌های آلی نسبت به شاهد بین ۵/۲ تا ۳ برابر در کاربرد کی‌لیت‌های کیتوسان تا اسیدهای آمینه بود، در حالی که میانگین افزایش در وزن خشک اندام هوایی در کاربرد همین کی‌لیت‌ها نسبت به شاهد بین ۲/۳ تا ۲/۷ برابر مشاهده شد. ولی در گیاه لوبیا میانگین افزایش در مقدار آهن بین ۲/۶ تا ۱/۷ ولی میانگین افزایش در وزن خشک اندام هوایی بین ۴/۷ تا ۳ برابر مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که در گیاه ذرت افزایش در رشد دلیل اصلی افزایش مقدار آهن در اندام‌های گیاهان نیست و مکانیسم‌های دیگری در جذب توسط ریشه و انتقال از ریشه به اندام‌های هوایی درگیر هستند. مطالعات نشان داده است که مکانیسم‌هایی مثل تنظیم تعادل بار در گیاهان وجود دارد که فراهمی نیتروژن منجر به جذب بیشتر آهن و دیگر فلزات از ریشه گیاهان می‌شود. کوتمن و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که تحریک ریشه‌ها با نیتروژن منجر به افزایش و فعالیت ناقیلین پروتئینی و ترکیبات نیتروژنی مثل نیکوتین آمیدها نیز می‌شود که به جذب و انتقال بیشتر عناصر از ریشه‌ها کمک می‌کند. همچنین تغذیه‌ی نیتروژنی مناسب، فعالیت و فراوانی ناقیلین پروتئینی آهن مثل yellow stripe 1 (YS1) در غشاء سلول‌های ریشه را افزایش می‌دهد (۳۸). در گیاه لوبیا افزایش وزن خشک اندام هوایی متناسب با افزایش مقدار آهن در گیاه بود. دلیل تفاوت موجود در دو گیاه ممکن است به استراتژی‌های متفاوت جذب آهن در دو گیاه نیز مربوط باشد.

شکل ۳ مقدار آهن را در ریشه‌های دو گیاه ذرت و لوبیا نشان می‌دهد. در گیاه ذرت مقدار آهن در ریشه در کاربرد همه‌ی کی‌لیت‌های آلی آهن بیشتر از شاهد بود. بیشترین تجمع آهن در ریشه‌های در معرض Fe-Tyr و [Fe-C(E.hyd)] مشاهده شد که نسبت به Fe-EDDHA به ترتیب ۷/۲ و ۵/۵ برابر بیشتر بود. در گیاه لوبیا بیشترین مقدار آهن در ریشه‌ها با کاربرد کی‌لیت Fe-Met مشاهده شد که ۱/۷ برابر نسبت به کی‌لیت Fe-EDDHA بالاتر بود. در اینجا نیز تفاوت بین تیمارها را می‌توان به مدیریت تغذیه‌ی نیتروژن روی تعداد و فعالیت پروتئین‌های ناقل آهن در دیواره‌ی سلولی ریشه نسبت داد که منجر به افزایش جذب و انتقال آهن به

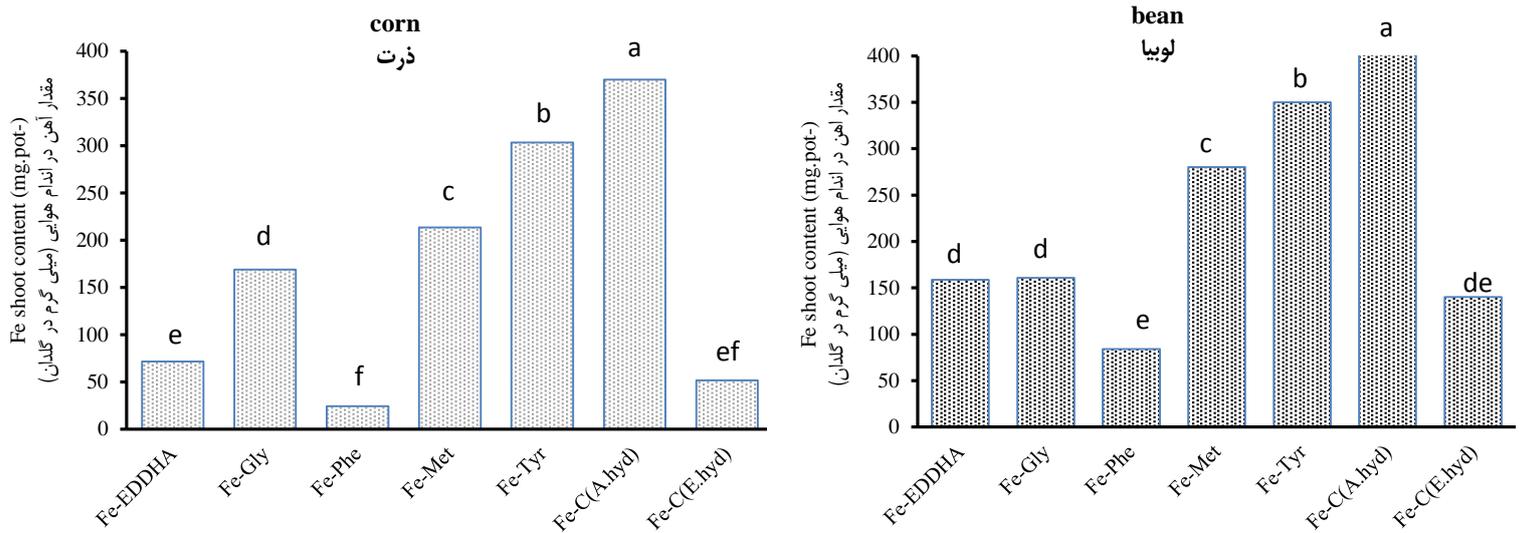
ترکیبات آلی گروه‌های آمین، کربوکسیل و فنولیک به طور قوی با فلز آهن باند می‌شوند و گروه‌های کربوکسیل و سولفونیک حلالیت بالایی را به ترکیبات می‌دهند در حالیکه H و متیل ویژگی‌های واکنش پذیری با گروه‌های قطبی را به آنها می‌دهند. هر یک از این ویژگی‌های خاص در توانایی آن اسید آمینه به عنوان یک کی‌لیت کننده تاثیر گذار است. افزایش رشد و عملکرد گیاه ذرت و لوبیا در کاربرد دو اسید آمینه‌ی متیونین و تیروزین نشان می‌دهد که پایداری این کی‌لیت‌ها در محلول‌های غذایی بیشتر است و همچنین این کی‌لیت‌ها می‌توانند با کارایی بهتری آهن را در محلول غذایی نگه‌داری کرده و در اختیار ریشه‌ی گیاه قرار دهند. اسید آمینه‌ی تیروزین به دلیل داشتن گروه‌های فنولیک قادر است با پایداری بالایی با فلز آهن تشکیل کمپلکس دهد و داشتن H در سطح کی‌لیت منجر به انسجام ساختار کمپلکس می‌شود و با توجه به اندازه مولکولی کوچک اسیدهای آمینه نسبت به روزنه‌های غشاء سلول‌های ریشه، این کی‌لیت‌ها به راحتی توسط گیاه جذب می‌شوند. همچنین pH شروع رسوب در کی‌لیت Fe-Tyr در محدوده‌ی pH محلول‌های غذایی است و این امر به پایدار ماندن کی‌لیت در محلول‌های غذایی و فرصت برای جذب بیشتر آن توسط گیاه کمک می‌کند. غیر قطبی بودن ترکیبات نیز یکی از عواملی است که به جذب راحت‌تر آنها از روزنه‌های ریشه کمک می‌کند، اسید آمینه‌ی متیونین به دلیل غیر قطبی بودن به راحتی از معابر سلول‌های ریشه با فرایند انتشار جذب می‌شود (۴) و از طرفی با داشتن دو گروه کربوکسیل و یک گروه آمین قابلیت پیوند با چندین اتم آهن را داشته و همزمان می‌تواند به ورود چندین اتم آهن به طور همزمان از غشاء سلول‌های ریشه کمک کند.

جذب و انتقال کی‌لیت‌های آهن

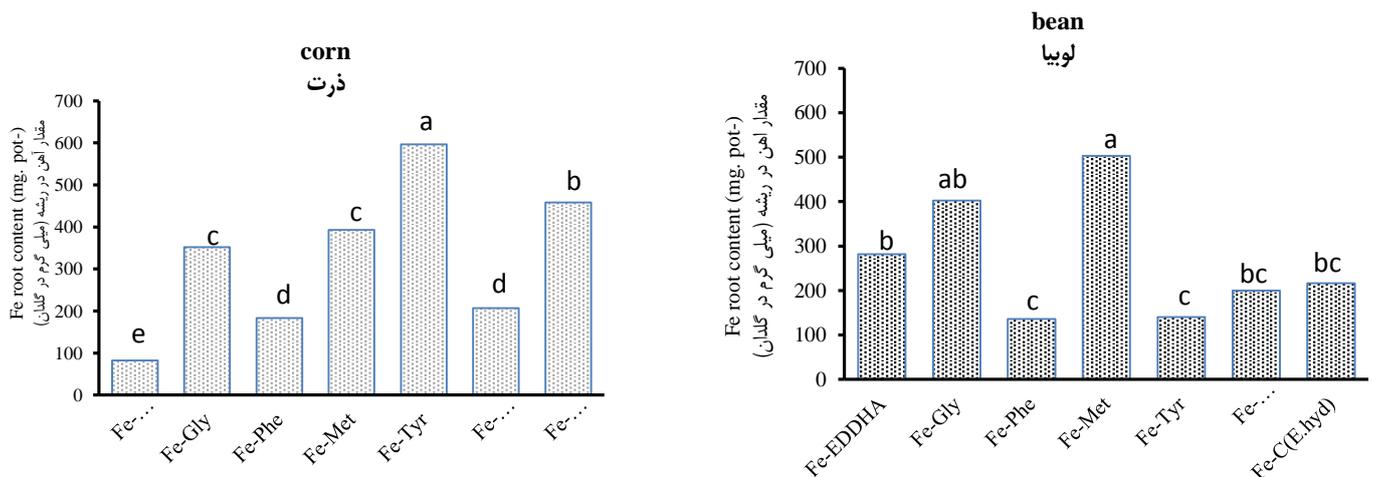
نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که کاربرد کی‌لیت‌های اسیدهای آمینه و کیتوسان در محلول‌های آبی می‌تواند منجر به افزایش غلظت آهن در اندام‌های گیاهان مورد آزمایش شود (شکل ۲). در هر دو گیاه ذرت و لوبیا کی‌لیت‌های [Fe-C(A.hyd)]، Fe-Tyr و Fe-Met به ترتیب منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار آهن گیاهان نسبت به Fe-EDDHA شدند. در گیاه ذرت کاربرد [Fe-C(A.hyd)]، Fe-Tyr، Fe-Met و Fe-Gly بترتیب ۳۰۰، ۲۴۰، ۱۴۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در گلدان، مقدار آهن اندام هوایی را نسبت به Fe-EDDHA افزایش دادند. در گیاه لوبیا این افزایش در کاربرد کی‌لیت‌های آلی [Fe-C(A.hyd)]، Fe-Tyr و Fe-Met به ترتیب ۲۶۰، ۲۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در گلدان در مقایسه با شاهد بود. در حقیقت بیشترین مقدار آهن در اندام هوایی، در نمونه‌هایی مشاهده شد که بالاترین عملکرد را نیز در کاربرد کی‌لیت‌های آلی نشان دادند. می‌توان نتیجه گرفت که در گیاهانی با عملکرد بیشتر، جذب آهن نیز بیشتر اتفاق افتاده است. از طرفی در میان اسیدهای آمینه‌ی به کار رفته در مطالعه حاضر به

نتایج نشان می‌دهند که با وجود اینکه کاربرد کی‌لیت‌هایی مثل Fe-C(E.hyd) در گیاه ذرت و Fe-Gly در لوبیا منجر به تجمع آهن در ریشه‌ها شد ولی مقدار آهن در اندام هوایی در گیاهانی که در معرض این کی‌لیت بوده اند، زیاد نبود. دلیل این امر می‌تواند عدم انتقال آهن از ریشه به اندام هوایی در کاربرد برخی کی‌لیت‌های آلی آهن باشد.

بافت‌های گیاهی می‌شود. تفاوت در جذب کی‌لیت‌های آهن توسط ریشه‌ها رابطه مستقیم با نوع ناقلین پروتئینی در غشاء سلول‌های ریشه دارد. مطالعات نشان داده است که گرچه گیاهان، نیتروژن را به فرم‌های آمونیومی و نیتراتی جذب می‌کنند ولی شواهدی وجود دارد که اسیدهای آمینه می‌توانند به طور مستقیم توسط گیاهان جذب شوند (۳۷).



شکل ۲- مقایسه میانگین مقدار آهن در اندام هوایی لوبیا و ذرت در محلول‌های غذایی مختلف آهن ($P < 0.05$)
 Figure 2- Comparison of means of Fe content in bean and corn shoot in different iron nutrient solution



شکل ۳- مقایسه میانگین مقدار آهن در ریشه‌ی لوبیا و ذرت در محلول‌های غذایی مختلف آهن ($P < 0.05$)
 Figure 3- Comparison of means of Fe content in bean and corn root in different iron nutrient solution

وسيله‌ی ترکیبات اسیدی بسیار مقرون به صرفه‌تر از ترکیبات آنزیمی می‌باشد. در گیاهان دارای استراتژی II ممکن است فیتوسایدروفورها بتوانند با Fe-Phe و Fe-C(E.hyd) رقابت کنند اما Fe-C(A.hyd) کارایی خوبی را در انتقال آهن به اندام‌های هوایی گیاهان نشان داد. نکته مهم دیگر در انتقال کی‌لیت‌های آلی در گیاهان این است که اسیدهای آمینه می‌توانند از طریق هر دو آوند چوبی و آبکش به اندام‌های هوایی انتقال یابند این انتقال اسیدهای آمینه در آوندهای چوبی و آبکش به چرخه نیتروژن بین ریشه و اندام‌های هوایی کمک و انتقال مجدد عناصر غذایی مخصوصا عناصر غیر متحرک مثل آهن و روی را در گیاهان تسهیل می‌کند (۱۲). در مورد فرایند انتقال کیتوسان و مشتقات آن هنوز تحقیقی انجام نشده است و شناخت این موضوع نیازمند روش‌های رادیو ایزوتوپی است.

به طور کلی می‌توان گفت که گیاهان به دنبال جذب کی‌لیت‌هایی هستند که کمترین مصرف انرژی را برای آن‌ها داشته باشد، کی‌لیت‌هایی که ساختاری ساده‌تر دارند مورد انتخاب گیاهان هستند. در تحقیقی روی جذب آهن توسط سردان و همکاران گزارش شد که جذب آهن از کی‌لیت‌های Fe-EDDHA در دو فرم مزو با پایداری کمتر و راسمیک با پایداری بیشتر اتفاق افتاد و گیاهان دارای استراتژی I بیشتر از استراتژی II آهن را جذب کردند و جذب کی‌لیت‌ها در فرم مزو بیشتر از راسمیک‌ها بود (۹).

تغییرات فعالیت آنزیم FCR برگ در طول زمان کشت

بر اساس نتایج بدست آمده از چندین مطالعه (۴۷ و ۵۴) مشخص شده‌است که شاخص‌های بیوشیمیایی مثل فعالیت آنزیم‌هایی که در متابولیسم‌های مربوط به جذب و انتقال آهن در گیاهان درگیر هستند، می‌توانند وضعیت تغذیه‌ای آهن را بهتر از اندازه‌گیری غلظت آهن در اندام‌های هوایی نشان دهند. اثر کی‌لیت‌های آلی اسیدهای آمینه و کیتوسان روی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ در دو گیاه ذرت و لوبیا در شکل ۵ نشان داده شده است.

میانگین کلی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ در گیاه دارای استراتژی I (لوبیا) بیشتر از استراتژی II (ذرت) بود ولی شدت تغییرات فعالیت‌های آنزیمی در گیاه ذرت بیشتر بود. به طوری که از روزهای ۱۵ ام تا ۴۵ ام دوره‌ی رشد گیاه افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در گیاه مشاهده شد. در هر دو گیاه، کاربرد Fe-Tyr و Fe-C(A.hyd) فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز را در برگ گیاه نسبت به Fe-EDDHA افزایش داد. اثر Fe-Met روی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ در گیاه ذرت مثبت بود و مقدار آن تا روز ۴۵ ام افزایش یافت اما در گیاه لوبیا فعالیت این آنزیم با گذشت زمان تغییر نکرد. افزایش کی‌لیت‌های Fe-Phe، Fe-Met و Fe-Gly روی فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در گیاه لوبیا تاثیری

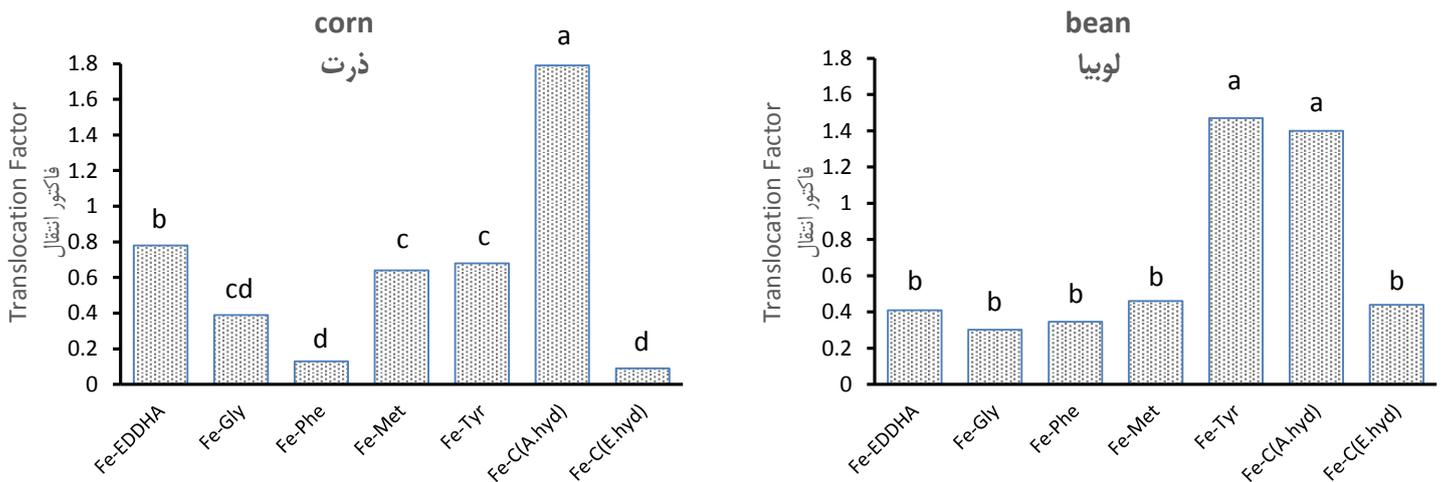
عناصری مثل آهن در آوندهای چوبی به شکل کمپلکس حرکت می‌کنند، در واقع آنها به فرم‌های محلول هستند که با پروتئین‌های کوچک پیوند برقرار کرده‌اند. تحقیقات نشان داده است که از ترکیباتی که در انتقال عنصر آهن در آوندهای چوبی نقش دارند، اسیدهای آمینه هستند. اینکه کمپلکس‌های آلی آهن در این تحقیق مستقیما جذب گیاه شده‌اند و به اندام هوایی انتقال یافته‌اند و یا اینکه عنصر آهن جدا شده و به همراه ترکیبات آلی دیگر به بخش‌های مختلف گیاه انتقال پیدا کرده‌است، نیاز به مطالعات ردیابی دارد. زانگ و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که اضافه کردن ترکیبات آلی مثل اسیدهای آمینه به محلول‌های غذایی جذب و انتقال عنصر آهن را از ریشه به اندام هوایی افزایش داد (۵۵). به منظور بررسی این عامل فاکتور انتقال آهن از ریشه به اندام هوایی در دو گیاه ذرت و لوبیا تعیین شد (شکل ۴). بیش از ۵۰ درصد آهن در کمپلکس با Fe-Tyr در گیاه لوبیا و در کمپلکس با Fe-Chi(A.hyd) در ذرت و لوبیا از ریشه به اندام‌های هوایی انتقال پیدا کردند. نتایج نشان دادند که در کاربرد Fe-Chi(A.hyd) و Fe-Tyr در محلول‌های غذایی، پایداری این ترکیبات تا ۹۰ درصد حفظ شد. پایداری بالا و اندازه مولکولی کوچک این ترکیبات (کوچکتر از ۵ نانومتر) می‌تواند در انتقال آسان آنها در آوندهای چوبی نقش داشته باشد (۳۳). اکاموتو و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که شدت جذب اسیدهای آمینه به نوع اسیدهای آمینه و گونه‌ی گیاهی بستگی دارد (۴۰). تفاوت‌های مشاهده شده در گیاهان استراتژی I و استراتژی II به دلیل مکانیسم‌های متفاوت جذب آهن برای هر گونه‌ی گیاهی می‌باشد. مکانیسم جبرانی برای کمبود آهن در گیاهان استراتژی I برای اساس کاهش Fe^{+3} و رهایی H^+ است که منجر به کارایی بهتر در جذب آهن در گیاهان دارای استراتژی I در محیط‌های آبی می‌شود. آزاد شدن H^+ منجر به برقراری تعادل در pH محلول شده و حلالیت کی‌لیت‌های آلی مخصوصا کیتوسان را افزایش می‌دهد. رامیرز و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که کیتوسان و مشتقات آن در محیط‌هایی با pH های اسیدی ضعیف تا خنثی بیشترین حلالیت را دارند و می‌توان گفت که استفاده از ترکیبات کیتوسان در گیاهان دارای استراتژی I کارایی بهتری خواهد داشت، به عبارتی گیاهان دارای استراتژی I انرژی کمتری را در جذب آهن برای کی‌لیت‌های کیتوسان نسبت به اسیدهای آمینه مصرف خواهند کرد (۴۴). در مقایسه بین دو گونه‌ی هیدرولیز شده کیتوسان نیز مشاهده می‌شود که آهن در کی‌لیت با کیتوسان هیدرولیز شده‌ی آنزیمی توسط ریشه گیاهان جذب شده است ولی انتقال آن به اندام هوایی با کارایی بالا اتفاق نیفتاده است. هیدرولیز ترکیبات منجر به شکسته شدن پیوندها و تولید ساختارهای ساده‌تر می‌شود. ولی نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیز اسیدی کیتوسان نسبت به هیدرولیز آنزیمی آن کارایی بالاتری در جذب توسط گیاهان دارد و از طرفی خرد کردن پیوندها به

فریک کیلیت رداکتاز به طور چشم‌گیری کاهش یافت (۱۲). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که در بین کی‌لیت‌های آلی مختلف به کار رفته در محیط رشد محلول گیاه، فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در کاربرد کی‌لیت‌هایی که فراهمی آهن را برای گیاه افزایش دادند، بیشترین مقدار بود. بنابراین فعالیت این آنزیم می‌تواند به عنوان یک شاخص برای بررسی وضعیت آهن در سلول‌های برگ در گیاهان استراتژی I و استراتژی II استفاده شود.

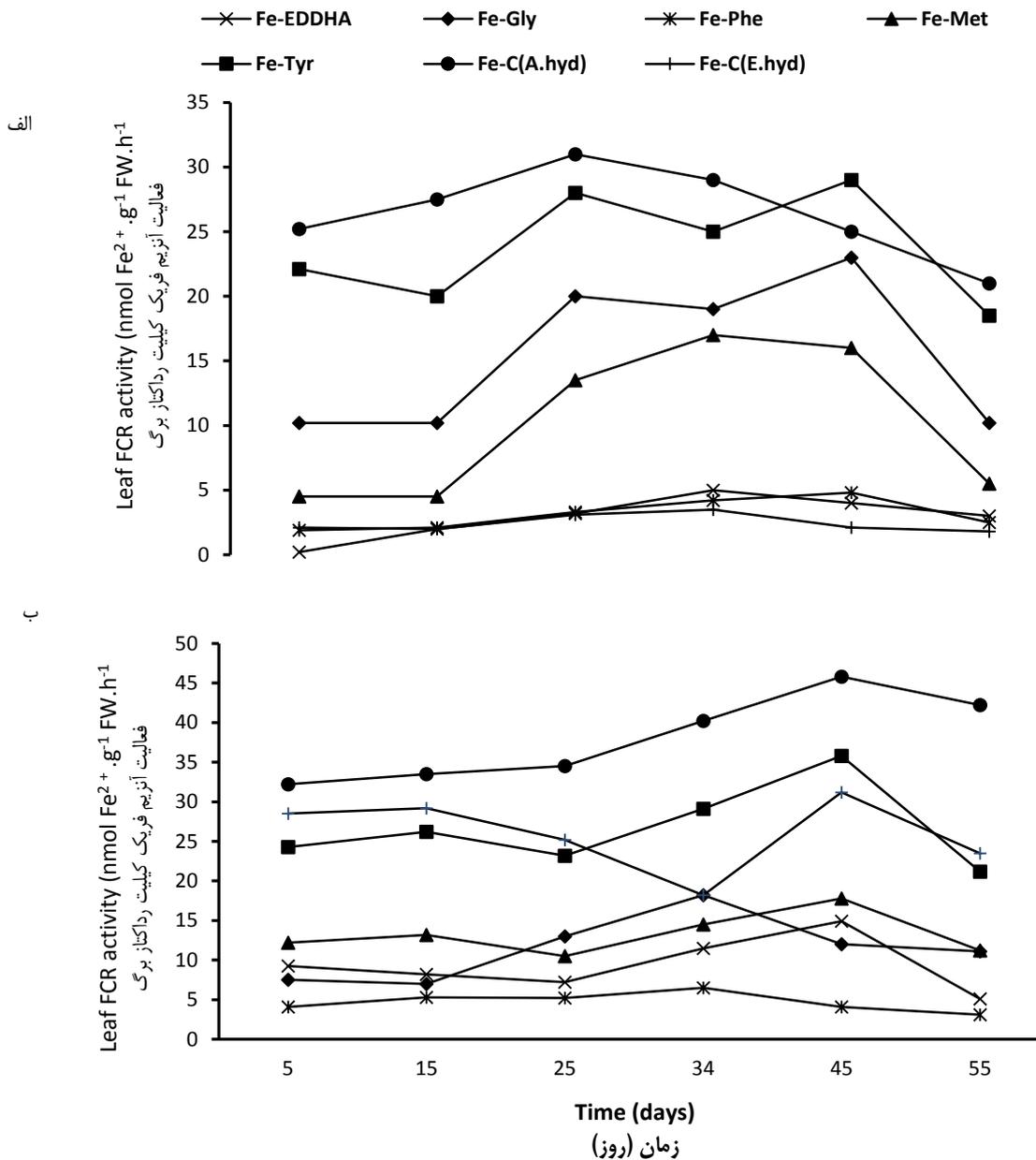
نتیجه‌گیری

کی‌لیت‌های آلی آهن در محلول غذایی سنتز شدند و ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی آنها با روش‌های آزمایشگاهی تعیین شد. تشکیل کمپلکس بین عنصر آهن و لیگاندهای آلی تایید شد و همه کی‌لیت‌های آلی آهن پایداری بالایی را در محلول غذایی در یک دوره زمانی مشخص نشان دادند. نتایج همچنین نشان دادند که استفاده از کی‌لیت‌های آلی آهن می‌تواند مقدار کافی از عنصر آهن را در مقایسه با Fe-EDDHA برای جذب گیاه فراهم کند و رشد ریشه و اندام هوایی گیاهان لوبیا (استراتژی I) و ذرت (استراتژی II) را بهبود ببخشد. کی‌لیت‌های Fe-C(A.hyd)، Fe-Tyr و Fe-Met در هر دو گیاه ذرت و لوبیا منجر به افزایش معنی‌داری در وزن خشک اندام هوایی نسبت به Fe-EDDHA شدند. در بین کی‌لیت‌های آلی آهن، کاربرد کی‌لیت‌های Fe-C(A.hyd) > Fe-Tyr > Fe-Met به ترتیب در هر دو گیاه ذرت و لوبیا منجر به بیشترین افزایش در مقدار آهن در اندام هوایی شدند.

نداشتند. کاهش در فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز از روز ۴۵ ام در همه تیمارها مشاهده شد. بررسی نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز برگ به غلظت آهن در گیاهان بستگی دارد و در گیاهانی که جذب آهن در آنها کمتر اتفاق افتاد فعالیت این آنزیم نیز کاهش یافت. می‌توان گفت که حضور آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در برگ‌های لوبیا و ذرت ممکن است یک نیاز برای کاهش Fe^{+3} به Fe^{+2} باشد قبل از اینکه شکل کاهش یافته آهن بتواند از پلاسما در سلول‌های برگ عبور نماید. نتایج بدست آمده توسط رومبولا نیز مشابه با نتایج این تحقیق بود (۴۶). گزارشات این محقق در گیاه کیوی و گیاه آفتابگردان نشان داد که فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در گیاهان دچار کمبود آهن نسبت به گیاهانی که مقدار کافی آهن دریافت کرده‌اند، کمتر بود. محققین دیگری نیز بیان کردند که برای تحریک فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در سلول‌های برگ، عنصر آهن مورد نیاز است. دو دلیل برای تایید این نتایج ذکر شده است، اول اینکه آهن به عنوان یک ترکیب در آنزیم‌های کاهنده مورد نیاز است، زیرا فریک کیلیت رداکتاز یک فلاووسیتوکروم می‌باشد و دوم اینکه وقتی فراهمی آهن برای رشد گیاهان ناکافی باشد آهن خودش به عنوان یک پیام برای فعال‌سازی مکانیسم‌های کاهشی آهن عمل می‌کند. در تحقیق دیگری، محققین نشان دادند که فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در گیاهانی که مقدار آهن در آنها در حد کفایت بود، بیشتر بود. آنها این بررسی را با اندازه‌گیری میزان کلروفیل در برگ‌های گیاهان بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مقدار کلروفیل با مقدار Fe^{+2} قابل دسترس در گیاهان رابطه مستقیم دارد و در گیاهانی که دچار کلروز ناشی از کمبود آهن شدند فعالیت آنزیم



شکل ۴- فاکتور انتقال (TF) در گیاه لوبیا (St.I) و ذرت (St.II) در محلول‌های غذایی مختلف آهن ($P < 0.05$)
 Figure 4- Translocation Factor in bean (St.II) and corn (St.I) in different iron nutrient solution



شکل ۵- اثر کی‌لیت‌های آهن در محلول غذایی روی فعالیت آنزیم کیلیت رداکتاز (FCR) در ذرت (الف) و لوبیا (ب) با گذشت زمان
 Figure 5- Effect of Fe chelates in nutrient solution on activity of ferric chelate reductase (FCR) in corn (A) and bean (B) by time

این کی‌لیت‌ها در رفع مشکلات تغذیه‌ای کمبود آهن در خاک‌ها نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

میانگین فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز (FCR) برگ در گیاهان دارای استراتژی I (لوبیا) بیشتر از گیاه استراتژی II (ذرت) بود. نتایج نشان دادند که گیاهانی که دارای آهن برگ‌های بیشتری بودند، فعالیت آنزیم فریک کیلیت رداکتاز در برگ آن‌ها بیشتر بود. بر طبق نتایج بدست آمده کی‌لیت‌های آلی کیتوسان و اسیدهای آمینه با آهن می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای کی‌لیت‌های سنتزی آهن در تغذیه گیاهان در محیط آبکشت استفاده شوند. برای بررسی توانایی

منابع

1. Aciksoz S.B., Atilla Y., and Levent O. 2011. "Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Journal Plant and Soil* 349(1-2): 215-225.
2. Águila-Almanza E., René S., Zully V.G., Edgar G.H., and Heriberto H.C. 2019. Enzymatic Depolymerization of Chitosan for the Preparation of Functional Membranes. 2019. *Journal of Chemistry*.
3. Albano Joseph P., and William B Miller. 2001. Photodegradation of FeDTPA in nutrient solutions. I. Effects of irradiance, wavelength, and temperature. *HortScience* 36 (2): 313-316.
4. Álvarez-Fernández A., García-Laviña P., Fidalgo C., Abadía J., and Abadía A. 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Journal Plant and Soil* 263(1): 5-15.
5. Belokon Yuri N., Vladimir I Bakhmutov., Nina I Chernoglazova., Konstantin A Kochetkov., Sergei V Vitt., Natalia S Garbalinskaya., and Vasili M %J Belikov, Perkin. 1988. General method for the asymmetric synthesis of α -amino acids via alkylation of the chiral nickel (II) Schiff base complexes of glycine and alanine. *Journal of the Chemical Society* (2): 305-312.
6. Bradford Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
7. Brüggemann W., Klaudia M.K., and Petra R. 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Journal Planta Moog* 190(2): 151-155.
8. Caiqin Q., Xiao L., Du Y., Shi X., and Chen J. 2002. A new cross-linked quaternized-chitosan resin as the support of borohydride reducing agent. *Reactive and Functional Polymers* 50(2):165-171.
9. Cerdán M., Antonio Sánchez-Sánchez, Margarita J., Juan J Sánchez-Andreu, Juana D Jordá., and Dolores B. 2007. Partial replacement of Fe (o ,o-EDDHA) by humic substances for Fe nutrition and fruit quality of citrus. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170(4): 474-478.
10. Chaney Rufus L., John C Brown., and Lee O Tiffin. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology* 50(2): 208-213.
11. Chapman Homer D., and FP Pratt. 1961. *Methods of analysis for soils, plants and waters*, Univ. of California Div." *Journal Agrculture Science* 168-169.
12. Chen L., Adriana O.L., Alan J., and Daniel R Bush. 2001. ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in Arabidopsis. *Plant Physiology* 125(4): 1813-1820.
13. El Bassiouny HMS., and HA Mostafa. 2008. "Physiological responses of wheat plant to foliar treatments with arginine or putrescine".
14. Garcia-Brugger A., Olivier L., Elodie V., Stéphane B., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., and Alain P. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(7): 711-724.
15. Ghasemi S., Khoshgoftarmanesh A.H., Hadadzadeh H., and Afyuni M. 2013. 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(2): 315-323.
16. 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(4): 498-508.
17. Hangarter Roger P., and Triant C Stasinopoulos. 1991. "Effect of Fe-catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant Physiology* 96(3): 843-847.
18. Hoell Ingunn A., Gustav V.K., and Vincent GH Eijsink. 2010. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 27(1): 331-366.
19. Hsu Hsin-Hung. 1986. *Chelates in Plant Nutritio*.
20. Jones D.L., Hodge A., and Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163(3): 459-480.
21. Jones DL., 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(9): 1331-1342.
22. Kang Seong I., and You Han Bae. 2003. A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase. *Journal of Controlled Release* 86(1): 115-121.
23. Kobayashi T., and Naoko K Nishizawa. 2012. "Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 131-152.

24. Kosegarten H., Hoffmann B., and Mengel K. 2001. The paramount influence of nitrate in increasing apoplastic pH of young sunflower leaves to induce Fe deficiency chlorosis, and the re-greening effect brought about by acidic foliar sprays. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164(2): 155-163.
25. Kulikov S.N., Svetlana A Lisovskaya., Pavel V Zelenikhin., Evgeniya A Bezrodnykh., Diana R Shakirova., Inesa V Blagodatskikh., and Vladimir E Tikhonov. 2014. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry* 74: 169-178.
26. Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Y., and Sergey Abramchuk. 2012. Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Carbohydrate Polymers* 87(1): 545-550.
27. Kutman U Baris., Yildiz B., Ozturk L., and Cakmak. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc through soil and foliar applications of nitrogen. *Ismail Journal Cereal Chemistry* 87(1): 1-9.
28. López M., Flor A., Michael A Grusak., Anunciación A., and Javier A. 2013. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science* 4:254.
29. Lucena Juan J. 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. 103-128. Springer.
30. Lucena Juan J., Agustín G., and Villén M. 2010. Stability in solution and reactivity with soils and soil components of iron and zinc complexes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173(6): 900-906.
31. Manthey JA., DL McCoy., and DE Crowley. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*.
32. Marschner H. 1995. Function of mineral nutrients: micronutrients. *Mineral nutrition of higher plants*.
33. Marschner H. 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*: Academic press.
34. 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(3): 379-388.
35. Mikami Y., Saito A., Miwa E., Higuchi K. 2011. Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(5): 513-519.
36. Muhammad A., WT Frankenberger Jr. 1990. Response of *Zea mays* and *Lycopersicon esculentum* to the ethylene precursors, smallcap γ -L-methionine and smallcap γ -L-ethionine applied to soil. *Plant and Soil* 122(2): 219-227.
37. Näsholm T., Kielland K., and Ganeteg U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182(1): 31-48.
38. Ngatia EM., Gathece LW., Macigo FG., Mulli TK., Mutara LN., and Wagaiyu LG. 2008. Nutritional and oral health status of an elderly population in Nairobi. *East African Medical Journal* 85(8): 378-385.
39. Nomiya K., and Yokoyama H., Transactions D. 2002. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of polymeric silver (I) complexes with three amino-acids [aspartic acid (H₂ asp), glycine (Hgly) and asparagine (Hasn)]. *Journal of the Chemical Society* (12): 2483-2490.
40. Okamoto M., and Okada K. 2004. Differential responses of growth and nitrogen uptake to organic nitrogen in four gramineous crops. *Journal of Experimental Botany* 55(402): 1577-1585.
41. Pantaleone D., and Yalpani M. 1992. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. *Carbohydrate Research Scollar* 237(1): 325-332.
42. Prabakaran M., and JF Mano. 2004. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery* 12(1): 41-57.
43. Ramírez MA., T Rodríguez A., Alfonso L., and Peniche C. 2010a. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Bioteconología Aplicada* 27(4): 270-276.
44. Ramírez MA., T Rodríguez A., Alfonso L., and Peniche C. 2010b. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Bioteconología Aplicada* 27(4): 270-276.
45. Rashad El-Sh M., El-Abagg HM., and Amin AA. 2003. Physiological effects of some bioregulators on growth and productivity of two broad bean cultivars. *Egypt Journal Appl Science* 18: 132-149.
46. Rombolà AD., Brüggemann W., Tagliavini M., Marangoni B., and Moog PR. 2000. Iron source affects iron reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *Journal of Plant Nutrition* 23(11-12): 1751-1765.
47. Ruiz Juan M., Baghour M., and Romero L. 2000. Efficiency of the different genotypes of tomato in relation to foliar content of Fe and the response of some bioindicators. *Journal of Plant Nutrition* 23(11-12): 1777-1786.
48. Sánchez A.S., Margarita J., Sánchez-Andreu J., Jordá J., and Bermúdez D. 2005. Use of humic substances and amino acids to enhance iron availability for tomato plants from applications of the chelate FeEDDHA. *Journal of Plant Nutrition* 28(11): 1877-1886.
49. Smith Brandon 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(4): 473-483.

50. Smith Robert M., and Arthur E Martell. 1987. Critical stability constants, enthalpies and entropies for the formation of metal complexes of aminopolycarboxylic acids and carboxylic acids. *Science of the Total Environment* 64(1-2): 125-147.
51. Svennerstam H., Ulrika G., and Näsholm T. 2008. Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist* 180(3): 620-630.
52. Vadas Timothy M., Zhang X., Ashley M Curran., and Beth A Ahner. 2007. Fate of DTPA, EDTA, and EDDS in hydroponic media and effects on plant mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition* 30(8): 1229-1246.
53. Villén M., Lucena J.J., Carmen Cartagena M., Raquel B., Josemaría García-M., and Ignacia Martín de la Hinojosa M. 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *Journal of Agricultura and Food Chemistry* 55(14): 5746-5753.
54. Yildiz Dasgan H., Levent O., Abak K., and Cakmak. 2003. Activities of Iron-Containing Enzymes in Leaves of Two Tomato Genotypes Differing in Their Resistance to Fe Chlorosis. *Journal of Plant Nutrition* 26(10-11): 1997-2007.
55. Zhang Y., Rongli Shi., Karim Md R., Fusuo Z., Chunqin Z. 2010. Iron and zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(23): 12268-12274.

Introducing Amino Acid and Chitosan Iron Chelates as Available Sources of Iron in Nutrient Solutions by Strategy I and II Plants

A. Mirbolook¹ - M.H. Rasouli Sadaghiani^{2*} - E. Sepehr³ - A. Lakzian⁴ - M. Hakimi⁵

Received: 23-12-2019

Accepted: 28-04-2020

Introduction: Iron (Fe) is an important micronutrient that plays a role in several crop physiological processes such as photosynthesis, respiration, and synthesis of heme proteins, DNA, RNA, and hormones. The most common Fe source used in agriculture is Fe-EDDHA. However, the usage of this chelate may be problematic for plant growth. In the recent years, organic chelates have gained attention as they increase the microelements solubility and prevent iron precipitation in nutrient solution. Organic chelates such as amino acids and polysaccharides have many physicochemical (reactive OH, COOH and NH₂ groups) and biological (biocompatible and biodegradable) properties that make these attractive materials usable for the agricultural practice. Biodegradability, low toxicity, immune system stimulation, the ability to coordinate metal, less sensitivity to photodegradation, and the effect on physical properties of rhizosphere and root growth dynamic are ideal properties of these components. The objective of this study was to evaluate Fe-organic-chelates efficiency as Fe sources for bean (Strategy I) and corn (Strategy II) growth in the hydroponic system.

Materials and Methods: In this research, we synthesized Fe-amino acid chelates including Fe-Glycine (Fe-Gly), Fe-Phenylalanine (Fe-Phe), Fe-Tyrosine (Fe-Tyr), Fe-Methionine (Fe-Met), and Fe chitosan chelates in two forms of acidic hydrolyzed chitosan [Fe-C(A.hyd)] and enzymatic hydrolyzed chitosan [Fe-C(E.hyd)] and characterized by FTIR and CHN analyzer. The efficiency of these iron sources for bean (Strategy II) and corn (Strategy I) in hydroponic system was then evaluated. Seeds of bean and corn were washed with distilled water and transplanted into special containers containing coco peat, perlite and vermicompost (1:1:1) at 25 °C for germination and initial growth. The seedlings were transferred to polyethylene plastic lids fitting tightly over 8-L polyethylene containers under controlled conditions in the greenhouse with a light period of 8 hours per day, the temperature of 20 to 25°C and relative humidity of 65 to 75%. The pots were stacked in black color to prevent light reaching the root of the plant and the solution. In each pot, one plant seedling was placed and the basic nutrient solution was prepared in deionized water. The plants were harvested after 8 weeks, their root and shoot were separated and dried after washing with distilled water in an oven at 75 °C. The dried samples were ground to fine powder to pass through a 20-mesh sieve. The analysis of Fe in samples was performed using atomic absorption spectrophotometer.

Result and Discussion: Application of organic chelates of amino acids and chitosan increased the shoot dry matter per plant compared to Fe-EDDHA. Fe content in shoot of corn and bean was highest using Fe-Tyr, Fe-Met and [Fe-C(A.hyd)]. Uptake and accumulation of Fe in roots were observed by using all chelates, but the highest translocation factor was found for the treatments including [Fe-C(A.hyd)] and Fe-Tyr. Translocation factor in bean plants was higher than corn, and around half of Fe in bean plants was translocated from root to shoot. The use of iron chelates in plant growth medium increased the activity of ferric chelates reductase enzymes in bean and corn compared to Fe-EDDHA. However, the mean of this enzyme activity in bean was higher than that in corn. Therefore, the activity of this enzyme can be used as an indicator for determining the iron availability in leaf cells in Strategy I and Strategy II plants. In general, the plants need less energy to absorb Fe when the chelates with a simpler structure are used.

Conclusion: The results indicated that using Fe organic chelates in the hydroponic system could supply sufficient amounts of iron for the plant uptake and also improve the root and the shoot growth of bean and corn. Overall, the effect of Fe organic chelates on Fe content of bean and corn shoots was in the following order: Fe-Chi(A.hyd) > Fe-Tyr > Fe-Met > Fe-Gly >. Activity of leaf ferric chelate reductase in bean was higher than that

1, 2 and 3- Ph.D. and Professors Soil Science, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: m.rsadaghiani@urmia.um.ac.ir)

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

5- Professor Chemistry, Chemistry Department, Payam Noor University of Mashhad, Iran

DOI: 10.22067/jsw.v34i5.84738

in corn.

Keywords: Amino acids, Bean, Chelate, Chitosan, Corn, Leaf ferric chelate reductase, Translocation factor