

بررسی اثرات نانوکود آهن بر رشد برگ، مقدار کربوهیدرات و آنتی‌اکسیدان‌های پریش

Catharanthus roseus

مه‌ری عسکری*، محمد رضا امیر جانی و طاهره صابری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴)

چکیده:

نانومواد به عنوان یکی از مهم‌ترین ابتکارات علم جدید در نظر گرفته می‌شوند. نانوذرات خیلی واکنش‌پذیر هستند. این خاصیت به میزان زیادی به اندازه (۱ تا ۱۰۰ نانومتر)، سطح بزرگ و محلولیت بالای آن‌ها وابسته است. در بین همه ریزمغذی‌ها، آهن بیشترین مقدار را در گیاهان دارد. آهن بخش کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیا است و برای سنتز کلروفیل مورد نیاز است. در این مطالعه، نانو اکسید آهن در ۶ سطح مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و محیط غذایی هوگلند کامل (محتوی کلات آهن) به عنوان شاهد به مدت ۷۰ روز به گیاه پریش داده شد. نتایج نشان می‌دهد نانوذرات اکسید آهن باعث افزایش معنی‌دار تمامی پارامترهای رشد برگ و مقدار کربوهیدرات برگ در مقایسه با گیاهان کنترل شده است ولی هیچ اثری بر مقدار پرولین و مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها و تراکم روزنه برگ نداشته است. بیشترین مقدار پارامترهای رشد برگ در سطح ۳۰ μl نانوذرات اکسید آهن بدست آمد و کمترین مقدار این پارامترها در سطح ۰ μl نانوذرات اکسید آهن بدست آمد. بیشترین مقدار پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در سطح صفر μl آهن سنجش گردید، از این جهت غلظت صفر μl آهن برای گیاه تنش محسوب می‌شود. بنابراین استفاده از کود نانوذرات اکسید آهن به دلیل کاهش اثرات مضر که کودهای شیمیایی در محیط دارند پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پارامترهای رشد، پریش، نانوذرات اکسید آهن

مقدمه:

۶/۳ کمبود شدید ریزمغذی‌ها مثل آهن را نشان می‌دهد

(Thomas et al., 2012).

انتخاب گیاه مناسب با تحمل بالا در خاک‌های قلیایی یکی از راه‌های کاهش کلروز برگ‌گی ناشی از کمبود آهن است. راه‌های دیگر شامل اسیدی کردن خاک (Whiting et al., 2011)، افزودن سولفات آهن II به خاک که سبب اسیدی‌شدن خاک شده و حلالیت آهن را افزایش می‌دهد، استفاده از کلات آهن (مثل کمپلکس آهن-اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستات Fe-EDTA) می‌باشد. استفاده

پریش یا پروانش *Catharanthus roseus* با نام انگلیسی Periwinkel or Vinca یکی از گیاهان زینتی و دارویی مهم مناطق معتدل و گرمسیری، متعلق به خانواده خرزهره، حاوی ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی (TIAs) alkaloids indole Terpenoid از جمله آجمالیسین، سرپنتین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین در برگ است (Aslam et al., 2010; Jaleel et al., 2006). گیاه پریش به PH خاک بسیار حساس بوده و در PH های بالاتر از

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: m-askary@araku.ac.ir

(Mazaherinia et al., 2010; Ranjbar and shams 2009). استفاده از نانوذرات اکسید آهن در افزایش غلظت آهن در گیاهان کارآمدتر از کودهای معمولی است. علت این امر، خصوصیات ذرات نانو، یعنی حلالیت بیشتر و سطح تماس بیشتر ذرات نانو با ریشه گیاهان است (Ranjbar and Shams, 2009).

یکی از مشکلات عمده‌ی خاک‌های قلیایی که بخش عمده‌ای از خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران را تشکیل می‌دهد، کمبود آهن قابل استفاده گیاه به دلیل pH بالای این خاک‌ها می‌باشد (Ksouri et al., 2007; Whiting et al., 2011). با افزایش یک واحد pH، حلالیت آهن ۱۰۰۰ برابر کاهش می‌یابد. در این خاک‌ها، کودهای معدنی مشکل کمبود آهن خاک را حل نمی‌کنند (Mazaherinia et al., 2010). از طرفی با توجه به نوظهور بودن فناوری نانو و روند رو به رشد تحقیقات در زمینه نانو کودها، گزارش‌های کمی درباره اثر این نانو کودها در افزایش کمی و کیفی رشد گیاهان موجود می‌باشد. این تحقیق اثرات نانو اکسید آهن بر رشد برگ و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه پرپوش که گیاهی دارویی و بسیار حساس به pH خاک و کمبود آهن می‌باشد، را به منظور جایگزینی نانوکود آهن به جای کودهای معمول جهت رفع مشکل کمبود آهن پرپوش کشت شده در خاک‌های ایران بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها:

کاشت بذر و نگهداری گیاه: گیاهک‌های ۳ روزه حاصل از جوانه‌زنی بذرهای ضدعفونی شده پرپوش به ۲۱ گلدان محتوی خاک و پرلیت (۱:۱) منتقل شدند. خاک استفاده شده، لومی-رسی با $pH=7/6$ ، میزان نیتروژن $0/03\%$ ، میزان فسفر قابل جذب ۴ ppm، میزان پتاسیم قابل جذب ۱۰۰ ppm و ریزمغذی‌های قابل دسترس آهن ۷/۶ ppm، روی ۱ ppm، مس ۰/۲ ppm و منگنز ۰/۶ ppm اندازه‌گیری شد. پس از پوشاندن روی دانه‌رست‌ها توسط خاک همان

گسترده از کودهای عمومی به خاک، سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد و تغییرات ناخواسته‌ای در اکوسیستم ایجاد می‌کند. در بین تمامی روش‌های استفاده شده، کلات آهن مصنوعی کارآمدتر است ولی اغلب این کلات‌ها هزینه زیادی دارند و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیستند، بنابراین احتیاج است که این کلات‌ها را با منابع ارزان که از نظر اقتصادی مهم باشند جایگزین شوند (Mazaherinia et al., 2010; Ranjbar and shams 2009). در ضمن افزودن آهن در فرم‌های غیرکلات به خاک‌ها مخصوصاً در خاک‌های آهکی تاثیر زیادی در فراهم آوردن آهن برای گیاه و میکروارگانیسم‌های خاک ندارد. چرا که آهن به سرعت هیدراته شده و به صورت هیدروکسیدهای آهن رسوب می‌کند و قابل استفاده نیست (Banaei et al., 2005).

انجمن رویال انگلستان، فناوری نانو را تحت عنوان طراحی، توصیف، تولید و کاربرد ساختارها، وسایل و سیستم‌هایی که دارای شکل و اندازه‌ای در مقیاس نانو (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) هستند، تعریف نموده است. در چنین مقیاسی قوانین طبیعی حاکم بر پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی صدق نمی‌کنند (Chinnamuthu and murugesu Boopathi, 2009). یکی از مهمترین کاربردهای فناوری نانو، استفاده از نانوکودها (Nano-fertilizer) برای تغذیه گیاهان می‌باشد. با استفاده از نانوذرات (nanoparticles)، ذراتی که در سه بعد در مقیاس نانو یعنی کوچکتر از ۱۰۰nm باشند، می‌توان کودهای کنترل شده یا کودهایی با تأخیر در انتشار تولید کرد. نانوذرات به علت سطوح ویژه و بیشتر، چگالی بیشتر، نواحی واکنشی زیاد بر سطوح ذره از واکنش پذیری زیادی برخوردار هستند. این ویژگی‌ها، جذب کودها و آفت‌کش‌هایی که در مقیاس نانو تولید شده را آسان می‌سازد (Wiswanathan, 2009). نانوکودها آسان جذب گیاهان می‌شوند و از کودهای شیمیایی کارآمدتر هستند، دوست محیط زیست هستند، آلودگی ندارند، شوری خاک را افزایش نمی‌دهند و کیفیت خاک را افزایش می‌دهند

(GPOX) به روش (Polle *et al.*, 1994) انجام شد. تراکم روزنه‌ها در دو سطح زیرین (abaxial) و زیرین (adaxial) اپیدرم برگ در مساحت 1 mm^2 شمارش گردید. همچنین اندازه گشودگی دهانه روزنه (برحسب میکرومتر) به وسیله گراتی کیول اندازه‌گیری گردید (Noori, 2002). کل آزمایشات در سه تکرار و در طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS16 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج:

نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که کاربرد نانوذرات اکسید آهن بر تمامی شاخص‌های مورد بررسی گیاهان ۷۰ روزه به استثنای تعداد برگ و تراکم روزنه اثر معنی‌داری داشته است (جدول ۱ و ۲). با افزایش میزان نانوذرات اکسید آهن سطح برگ گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد (هولگند کامل محتوی کلات آهن) در همه دوره‌های مورد بررسی افزایش یافت. بیشترین میزان سطح برگ (13 Cm^2) متعلق به گیاهان پرپوش ۷۰ روزه تحت تیمار غلظت $30 \mu\text{l}$ نانوذرات اکسید آهن با $30/52\%$ افزایش نسبت به شاهد و کمترین میزان سطح برگ ($8/57 \text{ Cm}^2$) در گیاهان پرپوش تحت غلظت صفر $0 \mu\text{l}$ نانوذرات اکسید آهن با $13/95\%$ کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد. در گیاهان پرپوش ۷۰ روزه به ترتیب افزایش $9/43$ ، $12/15$ ، $18/37$ و $29/51$ درصدی سطح برگ در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و $40 \mu\text{l}$ نانوذرات اکسید آهن نسبت به شاهد مشاهده شد. سطح برگ در گیاهان ۳۶ روزه (وسط دوره رشد) تحت غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و $40 \mu\text{l}$ نانوذرات اکسید آهن به ترتیب افزایش $26/41$ ، $31/60$ ، $33/87$ ، $53/97$ و $52/51$ درصدی را نسبت به شاهد نشان دادند. شکل ۱ روند تغییرات سطح برگ گیاهان پرپوش تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و $40 \mu\text{l}$) نسبت به

گلدان، آبیاری با 100 ml محلول هولگند کامل (محتوی کلات آهن برای گلدان‌های شاهد) و یا 100 ml محلول هولگند فاقد کلات آهن و محتوی سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومولار) (Adamski *et al.*, 2012; Dokhe *et al.*, 2013) انجام شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در درجه حرارت 25°C در روز و 20°C در شب و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. آبیاری هر هفته تا ۷۰ روز به میزان 100 ml محلول هولگند کامل (شاهد) یا محلول هولگند فاقد کلات آهن و محتوی سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن صورت گرفت. در صورت نیاز در طول هفته 50 ml از همان محلول‌ها به هر گلدان به طور یکسان افزوده گردید. صفر نانو در واقع هیچ آهنی (نه نانو و نه کلات آهن) در کل دوره ۷۰ روز دریافت نکرده است. **تهیه و نحوه اعمال تیمار نانوذرات اکسید آهن:** نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) که رنگ آن قرمز مایل به قهوه‌ای است، از شرکت پیشگامان نانو مواد مشهد تهیه شد. سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن طبق روش (Prasad *et al.*, 2012). آماده شدند.

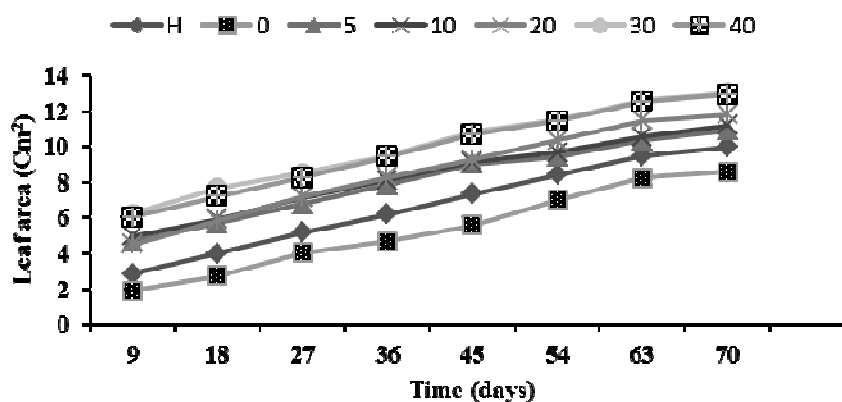
شاخص‌های مورد بررسی: از ابتدای کشت گیاهان، هر نه روز یکبار (روزهای ۱۸، ۲۷، ۳۶، ۴۵، ۵۴، ۶۳ و ۷۰)، سطح و تعداد برگ برای سه گیاه از هر تیمار اندازه‌گیری شد. در روز برداشت (روز ۷۰) وزن تر و خشک برگ سه گیاه از هر تیمار نیز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پرولین از روش (Bates *et al.*, 1973)، مقدار کربوهیدرات کل از روش فنل سولفوریک اسید (Dubois *et al.*, 1956) مقدار کمی آنتی‌اکسیدانت‌های کل 1% با آزمون مهار رادیکال آزاد ۱ و ادی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) توسط عصاره آنزیمی و IC_{50} به روش Abe و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD به روش (Giannopolitis and Ries, 1977)، کاتالاز CAT به روش (Cakmak and Marschner, 1992) و گایاکول پراکسیداز

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و هوگلند کامل (محتوی کلات آهن) به عنوان شاهد بر شاخص‌های رشد برگ، تراکم و دهانه روزنه در اپیدرم فوقانی (ad) و تحتانی (ab) برگ گیاه پرپوش ۷۰ روزه. مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

| منبع تغییر | تعداد برگ | سطح برگ Cm ² | وزن برگ | | تراکم روزنه | |
|--|--------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | | | تر خشک | دهانه روزنه (ad) | دهانه روزنه (ab) | تراکم روزنه (ab) |
| نانوآهن | ۰/۴۹ ^{ns} | ۴۷/۱۲ ^{**} | ۳۱/۹۸ ^{**} | ۵۰/۹۲ ^{**} | ۳/۰۲* | ۱۸/۷۱ ^{**} |
| ^{ns} : معنی دار نیست * : معنی دار در سطح ۵٪ ** : معنی دار در سطح ۱٪ | | | | | | |

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و هوگلند کامل (محتوی کلات آهن) به عنوان شاهد بر میزان پرولین، کربوهیدرات، IC50 درصد مهار رادیکال آزاد I% و فعالیت سوپراکسیددیسموتاز SOD، گایاکول پراکسیداز GPX و کاتالاز CAT پرپوش ۷۰ روزه. مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

| منبع تغییر | پرولین | کربوهیدرات | IC50 | I% | SOD | GPX | Catalase |
|--|--------|---------------------|-------|--------|-------|-------|---------------------|
| نانوآهن | ۶/۲۲* | ۹۱/۷۶ ^{**} | ۵/۴۹* | ۱۱/۶۵* | ۶/۲۰* | ۸/۳۴* | ۱۲/۰۱ ^{**} |
| ^{ns} : معنی دار نیست * : معنی دار در سطح ۵٪ ** : معنی دار در سطح ۱٪ | | | | | | | |



شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و محیط غذایی هوگلند کامل H به عنوان شاهد (محتوی کلات آهن Fe-EDTA بدون نانوذرات اکسید آهن) بر سطح برگ گیاهان پرپوش ۹ تا ۷۰ روزه نسبت به زمان. هر منحنی نشان‌دهنده تغییرات سطح برگ در یک غلظت خاص نانوذرات اکسید آهن یا هوگلند می‌باشد.

گرفته‌اند. در تمامی دوره‌های رشدی مورد بررسی کمترین مقدار سطح برگ مربوط به غلظت صفر μl نانوذرات اکسید آهن می‌باشد که هیچگونه ریزمغذی آهنی دریافت نکرده است. در تمامی دوره‌های رشدی، میزان سطح برگ گیاهان شاهد از تمامی تیمارهایی که نانوذرات اکسید آهن دریافت کرده‌اند کمتر است. یعنی حتی غلظت $5 \mu\text{l}$

گیاهان شاهد و طی دوره‌های مختلف رشدی (۹، ۱۸، ۲۷، ۳۶، ۴۵، ۵۴، ۶۳ و ۷۰ روزه) را نشان می‌دهد. سطح برگ در تمامی دوره‌های رشد در تمامی غلظت‌های نانوذرات و کلات آهن سیر صعودی دارد. بیشترین میزان سطح برگ در تمامی دوره‌ها به ترتیب مربوط به گیاهانی است که تحت تیمار غلظت $30 \mu\text{l}$ نانوذرات اکسید آهن قرار

غلظت $30 \mu\text{M}$ نانوذرات اکسید آهن و کمترین میزان کربوهیدرات ($1452/6 \mu\text{g/ml}$ وزن تر برگ) در گیاهانی که هیچ آهنی دریافت نکرده‌اند $0 \mu\text{M}$ مشاهده شد. در این گیاهان، مقدار کربوهیدرات برگ تنها $0/93$ مقدار کربوهیدرات برگ گیاه شاهد است. در گیاهان تحت غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و $40 \mu\text{M}$ نانوذرات اکسید آهن به ترتیب افزایش $1/08$ ، $1/11$ ، $1/18$ ، $1/25$ و $1/19$ برابری کربوهیدرات نسبت به شاهد ($1546 \mu\text{g/ml}$ وزن تر برگ) مشاهده شد (شکل ۳).

بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در گیاهانی که هیچ آهنی دریافت نکرده‌اند (غلظت صفر μM) با 60% افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از آزمون DPPH میزان IC_{50} (غلظتی از عصاره که 50% رادیکال‌های DPPH را مهار و تخریب می‌کند) هم مورد بررسی واقع شد. مقایسه میانگین‌های اثر نانوذرات اکسید آهن بر میزان IC_{50} بیانگر این است که کمترین میزان IC_{50} ($12/34 \text{ mg/ml}$) در گیاهانی که هیچ نوع ریزمغذی آهنی دریافت نکرده‌اند (غلظت صفر μM) با کاهش $31/11$ درصدی نسبت به شاهد وجود دارد. اما در گیاهانی که تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن قرار گرفته‌اند هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان IC_{50} و I\% نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد (جدول ۲). بیشترین میزان فعالیت SOD ($12/54 \text{ unit mg}^{-1} \text{ protein}$)، فعالیت GPOX ($9/68 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$) و فعالیت CAT ($3/06 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$) در گیاهانی که نانوذرات اکسید آهن دریافت نکرده‌اند مشاهده شد. در گیاهانی که هیچ نوع ریزمغذی آهن دریافت نکرده‌اند (صفر μM) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD، گایاکول پراکسیداز GPOX و کاتالاز CAT نسبت به گیاهان شاهد به ترتیب افزایش $35/63$ ، 51% و $42/32$ درصدی یافتند، اما در گیاهان تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن تغییر معنی‌داری در فعالیت این.

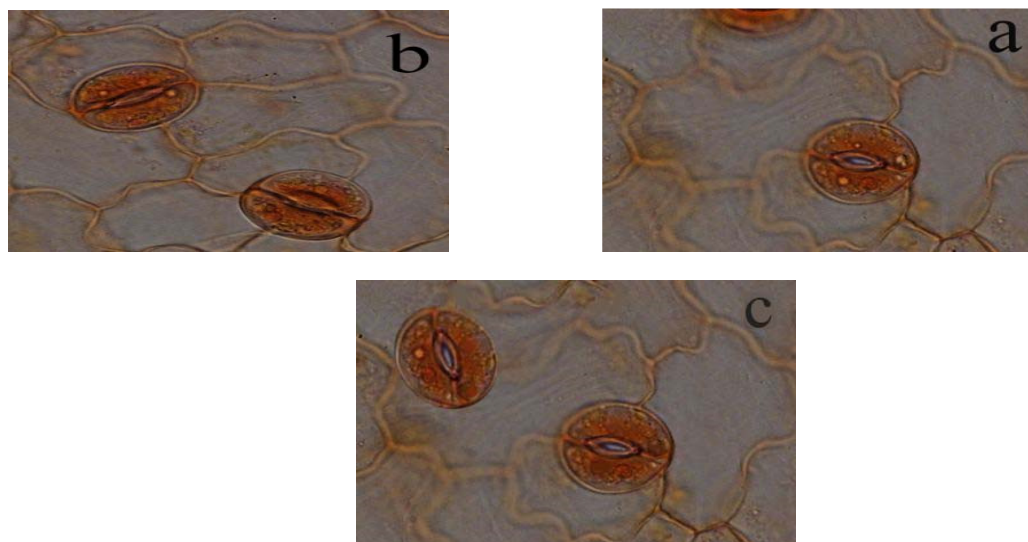
نانوذرات اکسید آهن از شاهد که کلات آهن دریافت نموده رشد بیشتری در تمام دوره مورد بررسی نشان داده است. بین غلظت $30 \mu\text{M}$ و $40 \mu\text{M}$ نانوذرات اکسید آهن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

وزن تر و خشک برگ با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن (از ۵ تا $30 \mu\text{M}$) افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد، به طوری که بیشترین وزن تر و خشک برگ در غلظت $30 \mu\text{M}$ نانوذرات اکسید آهن مشاهده گردید. بین وزن تر و خشک برگ گیاهان تحت تیمار $30 \mu\text{M}$ و $40 \mu\text{M}$ نانوذرات اکسید آهن تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. وزن تر برگ گیاهان تحت تیمار غلظت‌های ۲۰ و $30 \mu\text{M}$ نانو اکسید آهن به ترتیب $48/64\%$ و $108/11\%$ افزایش و وزن خشک برگ 80% و $137/14\%$ افزایش را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. کاهش وزن تر و خشک برگ گیاهان صفر μM به ترتیب $37/83\%$ و $31/42\%$ نسبت به گیاهان شاهد محاسبه شده است. گشودگی دهانه روزنه هم در اپیدرم فوقانی و هم در اپیدرم تحتانی گیاهانی که هیچ گونه ریزمغذی آهنی دریافت نکرده‌اند (صفر μM) نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری یافته است، به طوری که این کاهش در اپیدرم فوقانی $21/55$ درصد و در اپیدرم تحتانی $20/29$ درصد محاسبه شده است. اما گیاهان تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن تغییر معنی‌داری در گشودگی دهانه روزنه نسبت به گیاهان شاهد نشان نمی‌دهند (جدول ۳ و شکل ۲).

در برگ گیاهان تحت غلظت $0 \mu\text{M}$ آهن افزایش معنی‌دار $5/3$ برابر، در میزان پرولین نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. بین میزان پرولین برگ گیاهان تحت سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن نسبت به گیاهان شاهد تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳). با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن (از ۵ تا $30 \mu\text{M}$) میزان کربوهیدرات گیاه افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان کربوهیدرات ($1935 \mu\text{g/ml}$ وزن تر برگ) در گیاهان تحت

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و محیط هوگلند کامل (محتوی کلات آهن) به عنوان شاهد بر وزن تر برگ LFW و وزن خشک برگ LDW (گرم)، گشودگی دهانه روزنه SO (μm) در اپیدرم فوقانی ab و تحتانی ad برگ، توانایی مهار رادیکال آزاد I% و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل IC₅₀ (mg/ml) گیاهان پرپوش ۷۰ روزه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار \pm SE است. مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

| شاخص | غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن (میکرولیتر) | | | | | | شاهد |
|------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | ۴۰ | ۳۰ | ۲۰ | ۱۰ | ۵ | ۰ | |
| LFW | ۰/۷۲ ^a ±۰/۰۴ | ۰/۷۷ ^a ±۰/۰۶ | ۰/۵۶ ^b ±۰/۰۲ | ۰/۵۵ ^b ±۰/۰۱ | ۰/۴۶ ^{bc} ±۰/۰۴ | ۰/۲۳ ^d ±۰/۰۲ | ۰/۳۷ ^c ±۰/۰۵ |
| LDW | ۰/۰۸۱ ^a ±۰/۰۰۱ | ۰/۰۸۳ ^a ±۰/۰۰۴ | ۰/۰۶۵ ^b ±۰/۰۰۲ | ۰/۰۶۳ ^b ±۰/۰۰۱ | ۰/۰۵۱ ^c ±۰/۰۰۵ | ۰/۰۲۴ ^d ±۰/۰۰۲ | ۰/۰۳۵ ^d ±۰/۰۰۱ |
| SO (ab) | ۱۰/۵۷ ^a ±۰/۲۸ | ۱۰/۳۸ ^a ±۰/۶۸ | ۱۰/۳۵ ^a ±۰/۴۶ | ۱۰/۲۴ ^a ±۰/۶۴ | ۱۰/۳۹ ^a ±۰/۶۲ | ۷/۹۷ ^b ±۰/۲۳ | ۱۰/۱۶ ^a ±۰/۵۴ |
| SO (ab) | ۱۲/۰۸ ^a ±۰/۱۱ | ۱۱/۹۱ ^a ±۰/۳۱ | ۱۲/۰۰ ^a ±۰/۲۱ | ۱۱/۵۸ ^a ±۰/۱۶ | ۱۱/۷۸ ^a ±۰/۳۰ | ۹/۲۳ ^b ±۰/۱۰ | ۱۱/۸۶ ^a ±۰/۲۸ |
| I% | ۶/۸۱ ^b ±۰/۴۳ | ۶/۶۹ ^b ±۰/۳۹ | ۶/۷۷ ^b ±۰/۲۴ | ۶/۶۶ ^b ±۰/۱۴ | ۶/۷۳ ^b ±۰/۳۲ | ۱۰/۱۵ ^a ±۰/۱۹ | ۶/۵۶ ^b ±۰/۲۹ |
| IC ₅₀ | ۱۶/۸۰ ^a ±۰/۸۳ | ۱۶/۵۲ ^a ±۰/۲۹ | ۱۶/۷۱ ^a ±۰/۳۵ | ۱۶/۴۲ ^a ±۰/۶۱ | ۱۶/۹۱ ^a ±۰/۹۲ | ۱۲/۳۴ ^b ±۰/۸۰ | ۱۶/۱۸ ^a ±۰/۷۵ |



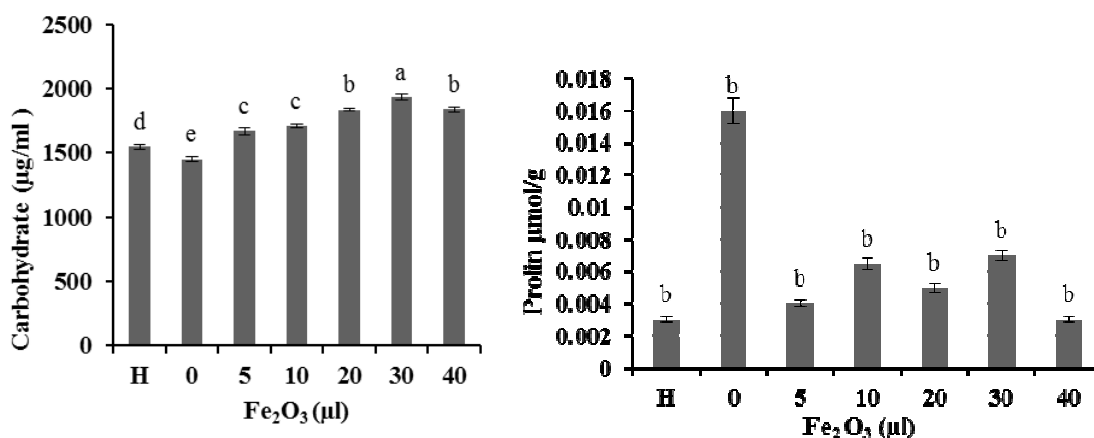
شکل ۲- تغییرات میزان گشودگی دهانه روزنه (ob: 100) در اپیدرم فوقانی در گیاه پرپوش ۷۰ روزه. (a) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه شاهد (هوگلند کامل محتوی کلات آهن)، (b) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه تحت غلظت ۵ μM نانوذرات اکسید آهن و (c) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه تحت غلظت ۳۰ μM نانوذرات اکسید آهن.

با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن از ۵ تا ۴۰ μM افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد برگ مشاهده گردید. بیشترین میزان افزایش متعلق به گیاهان تحت تیمار غلظت ۳۰ μM نانوآکسید آهن بود. نتایج مشابه توسط محققین مختلف گزارش شده است. در مطالعه‌ای که گیاه ریحان ۳۰ μM نانوآکسید آهن بود. نتایج مشابه توسط محققین

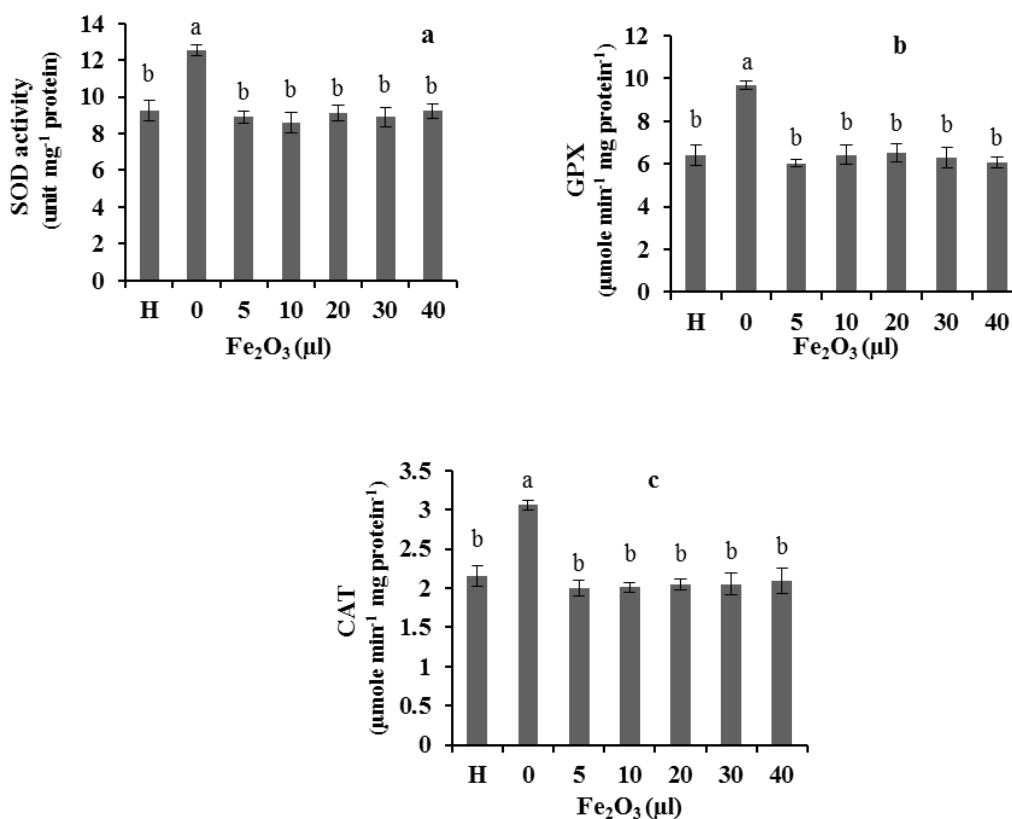
آنزیم‌ها نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشده است (شکل ۴)

بحث:

در این تحقیق کاربرد نانوذرات اکسید آهن تغییرات معنی‌داری بر شاخص‌های رشدی گیاه پرپوش ایجاد کرد.



شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و محیط غذایی هوگلند H کامل به عنوان شاهد (محتوی کلات آهن Fe-EDTA بدون نانوذرات اکسید آهن) بر میزان پروتئین و کربوهیدرات گیاه پرپوش ۷۰ روزه. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن (سطح ۰/۰۱) می‌باشد.



شکل ۴- تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر) و محیط غذایی هوگلند H کامل به عنوان شاهد (محتوی کلات آهن بدون نانوذرات اکسید آهن) بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاه پرپوش ۷۰ روزه. (a) سوپراکسید دیسموتاز، (b) گایاکول‌پراکسیداز و (c) کاتالاز. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن می‌باشد.

از غشاهای سلولی عبور می‌کنند (Krystofova et al., 2013). بنابراین ترکیبات نانوآهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا سریعتر توسط گیاهان جذب می‌شوند و کمبود مواد غذایی و نیازهای گیاهان را رفع می‌کنند. بنابراین در کاربرد این مواد معمولا افزایش رشد گیاه رخ می‌دهد (Mohamadipoor et al., 2013). بررسی نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که با افزایش غلظت نانوآهن از ۵ تا ۳۰ μl میزان جذب آهن توسط گیاه تا ۷۰٪ افزایش نسبت به شاهد صفر μl پیدا کرد و بیشترین میزان جذب آهن در غلظت ۳۰ μl نانوآهن مشاهده شد (صابری، ۱۳۹۲). استفاده از کودهای نانو منجر به افزایش کارایی عناصر، کاهش سمیت خاک، به حداقل رسیدن اثرات منفی ناشی از مصرف بیش از حد کودهای شیمیایی و کاهش دفعات کوددهی می‌شود (Mohamadipoor et al., 2013). محققین مطرح نمودند که کود نانوآهن به خاطر ثبات بالای آن و آزادسازی تدریجی آهن در یک محدوده وسیع pH (۳ تا ۱۱) می‌تواند به عنوان یک منبع غنی و قابل اعتماد از آهن دو ظرفیتی برای گیاه در نظر گرفته شود (Moghadam et al., 2012).

در این تحقیق، در گیاهانی که هیچ نوع ریزمغذی آهنی (صفر μl) دریافت نکردند کاهش معنی‌دار میزان پارامترهای رشد از جمله سطح برگ، وزن تر و خشک برگ مشاهده شد. کمبود آهن یک تنش غیرزیستی محسوب می‌شود که بسیاری از گیاهان را در مناطق جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد. این تنش اغلب در گیاهانی که در خاک‌های قلیایی و یا آهکی رشد می‌کنند، مشاهده می‌شود (Fernandez et al., 2008). کمبود آهن باعث می‌شود که کلروفیل در مقادیر کافی تولید نشود. کاهش کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز و کاهش تولید فتوسنتت‌های مورد نیاز برای رشد و نمو گیاه مثل کاهش رشد برگ می‌شود (Mohamadipoor et al., 2013).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گشودگی دهانه روزنه در هر دو سطح برگ گیاهان پرپوش که آهن

مختلف گزارش شده است. در مطالعه‌ای که گیاه ریحان *Ocimum basilicum* در معرض غلظت‌های مختلفی از کود کلات آهن (۱/۵، ۴/۵ و ۷/۵ $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) و نانوکود کلات آهن (۱، ۳ و ۵ $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) قرار گرفت، بررسی‌ها نشان داد که پارامترهای رشد گیاه در معرض کلات آهن $7/5\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ و نانوکود آهن $1\text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است. بیشترین میانگین وزن تر و خشک برگ‌ها در تیمار نانوکود کلات-آهن مشاهده شد. نتایج فوق نشان داد که جایگزینی کود آهن تهیه شده با فناوری نانو در مقایسه با کودهای آهن رایج در غلظت مناسب یا کمتر نسبت به کود آهن می‌تواند سبب افزایش رشد گیاه ریحان شود (Peyvandi et al., 2011b). بررسی اثرات نانو اکسید آهن (Fe_2O_3) بر روی شاخص‌های رشد گیاه بادام زمینی، افزایش تمامی شاخص‌های رشد در اثر کاربرد نانوکسید آهن را نشان دادند (Xiu-mei et al., 2005). در مطالعه‌ای اثر نانوکود آهن بر گیاه برنج، نتایج نشان داد که نانو آهن بر تمامی شاخص‌های رشدی گیاه به استثنای وزن هزار دانه اثر مثبت معنی‌داری داشته است (Baghaie et al., 2011). همچنین سطح برگ در گیاه اسفناج *Spinacia oleracea* در اثر به‌کارگیری کود نانوآهن نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (Moghadam et al., 2012). اسپری نانوآهن بر روی برگ‌های گیاه چغندر قند سبب افزایش وزن، طول و عرض برگ در تمامی مراحل رشد گیاه شد (Mazlomi-Mamyandi et al., 2012a,b). خواص فیزیکی ثابت و پایدار نانوذرات به اندازه‌ی آن‌ها (۱ nm تا ۱۰۰ nm)، سطح بزرگ و محلولیت بالای آن‌ها وابسته است (Krystofova et al., 2013; Sheykhbaglou et al., 2010). مواد نانو مخصوصا نانوذرات می‌توانند به مولکول‌های فعال بیولوژیکی مختلف متصل شوند که این اتصال می‌تواند به‌طور مستقیم به مکان‌های خاص درون بیومولکول‌ها شامل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و ساختارهای زیرسلولی صورت بگیرد و بدین طریق نانوذرات

معنی دار میزان پرولین گیاه را در اثر کمبود آهن نشان داد (Fisichella et al., 1998). در اکثر گیاهان میزان پرولین در تنش های زیستی و غیرزیستی افزایش می یابد (Tan et al., 2008). بنابراین کمبود آهن به عنوان یک تنش عمل کرده و سبب افزایش محتوای پرولین در گیاه شده است (Fisichella et al., 1998). در این مطالعه میزان پرولین در گیاهان تحت غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن تغییر معنی داری نسبت به گیاهان شاهد نداشت، از آنجا که گیاهان در مقابل تنش های اکسیداتیو، انواع آنتی اکسیدانت های آنزیمی و غیر آنزیمی مثل پرولین را تولید می کنند (Kosova et al., 2011)، بنابراین هیچ یک از سطوح نانو اکسید آهن که در این مطالعه استفاده شده برای پریش تنش نبوده است.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که با افزایش غلظت نانواکسید آهن (از ۵ تا ۳۰ μM) میزان کربوهیدرات گیاه نیز افزایش پیدا کرد و بیشترین میزان کربوهیدرات در غلظت ۳۰ μM نانواکسید آهن و کمترین میزان در گیاهانی که هیچ نوع آهنی دریافت نکردند مشاهده شد. در بررسی محتوای قندی گیاه چغندر قند در معرض کمبود آهن نیز کاهش ۴/۶ برابری مقدار سوکروز مشاهده شد (Lo pez-Millan et al., 2001). در مطالعه گیاه انگور *Vitis labruscan* در معرض کمبود آهن، کاهش محتوای کربوهیدرات کل گزارش شد. کاهش محتوای کربوهیدرات در این گیاه می تواند به کاهش میزان نشاسته و سوکروز برگردد. در شرایط کمبود آهن دیده شده که میزان سنتز نشاسته و سوکروز به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. کاهش در میزان این ترکیبات می تواند به علت کاهش محتوای کلروفیل و به دنبال آن کاهش میزان فتوسنتز باشد. همچنین نتایج بررسی میزان کربوهیدرات کل در گیاه انگور تحت غلظت های مختلف آهن (۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ μM) نشان داد که با افزایش غلظت آهن، مقدار کربوهیدرات افزایش معنی داری یافت (Chen et al., 2004). مطالعات مختلف نشان داده که کمبود آهن سبب برهم

دریافت نکرده اند (صفر μM) نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی داری یافت. اما گیاهان تحت غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن تغییر معنی داری در گشودگی دهانه روزنه نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند. یعنی تنها غلظت صفر μM آهن برای گیاه پریش تنش بوده است و سایر غلظت های نانو آهن برای گیاه تنش نبوده است. در مطالعه گیاه هلو (*Prunus persica*) تحت کمبود آهن نیز گشودگی دهانه روزنه ها نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی داری یافت (Fernandez et al., 2008). براساس گزارش Shimshi (۱۹۶۷) کمبود آهن القا شده در گیاه بادام زمینی سبب کاهش قابل توجه میزان گشودگی روزنه های برگ شد ولی تراکم روزنه تغییری نیافت. در کمبود آهن علاوه بر کاهش کلروفیل، میزان نفوذ پذیری برگ نیز کاهش می یابد که این موارد سبب ایجاد کلروز در برگ می شود. کلروز ناشی از کمبود آهن، نوعی تنش غیرزیستی برای گیاه محسوب می شود و سبب کاهش میزان گشودگی روزنه ها می شود. ولی مطالعات نشان داده که کاهش نفوذ پذیری برگ در تراکم روزنه اثری ندارد، به طوری که برگ های کلروزه معمولا تراکم روزنه ای یکسانی نسبت به برگ های شاهد دارند (Eichert et al., 2009; Shimshi, 1967). در هنگام مواجه با اغلب تنش ها، در گیاهان با ترشح ترکیباتی مانند هورمون آبسزیک اسید، کاهش گشودگی دهانه روزنه ها رخ می دهد. آبسزیک اسید با اثر بر روی پمپ H^+ باعث کاهش فعالیت آنزیم فسفوانول پیرووات می شود و در نتیجه باعث کاهش فشار تورگور سلول های نگهبان روزنه، کاهش گشودگی دهانه روزنه و در نهایت بسته شدن دهانه روزنه ها می گردد (Zhang et al., 2001).

نتایج مطالعه حاضر افزایش معنی دار (۴ برابری) میزان پرولین گیاهان تحت غلظت صفر μM نانو اکسید آهن را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در مطالعه اثر کمبود آهن بر روی گیاه نارنج *Citrus aurantium*، نتایج افزایش

پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها، روی بسیاری از جنبه‌های عملکردی سلول‌ها اثر می‌گذارند (Foyer and Noctor, 2005).

گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی، سازوکارهای متعدد دفاعی دارند. تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه ابزاری جهت غلبه به تنش، تحمل تنش و سازش به شرایط تنشی محیط و بنابراین بقاء گیاه در برابر تنش است (Vasconsuelo and Boland 2007). متابولیت‌های ثانویه مثل انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها نقش اصلی را در سازش گیاهان به تغییرات محیطی و تنش‌ها فراهم می‌کنند. سیستم دفاعی گیاهان در برابر ROS ها تولید انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌باشد (Liu, et al., 2006; Kosova et al., 2011). در این مطالعه بیشترین مقدار فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت یعنی سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان پریشی که هیچ آهنی دریافت نکردند (غلظت صفر) مشاهده شد و مقدار فعالیت هر سه آنزیم فوق در گیاهانی که تحت غلظت‌های مختلف نانوآکسید آهن قرار گرفتند کمتر از غلظت صفر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف کود کلات-آهن (۱/۵، ۴/۵ و $7/5 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) و نانوآکسید آهن (۱، ۳ و $5 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) بر ریحان *Ocimum basilicum* نیز کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز و پراکسیداز را در گیاهانی که تحت تیمار نانوآکسید آهن قرار گرفتند در مقایسه با شاهد نشان داد (Peyvandi et al., 2011 b). در همین سطوح کلات آهن و نانوآکسید آهن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به شاهد در گیاه *Satureja hortensis* گزارش شده است که با افزایش غلظت کود آهن و نانوآهن از میزان فعالیت آنزیم‌ها کاسته شده است (Peyvandi et al., 2011 a). محققین معتقدند که ترکیبات نانوآهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا سریعتر توسط گیاهان جذب می‌شوند و کمبودهای مواد غذایی و نیازهای گیاهان را برطرف می‌کنند. بنابراین با کاربرد این مواد شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد می‌شود و از ایجاد

خوردن تعادل غذایی و تغییر میزان عناصر موجود در گیاه می‌شود و اختلال در رشد گیاه را ایجاد می‌کند (Pestana et al., 2004; 2005) این اثرات در نهایت سبب تخلیه کربوهیدرات و ذخایر آهن و ایجاد تنش برای گیاه می‌شوند (Alvarez-Fernandez et al. 2006). محتوای کربوهیدرات در گیاه چغندر قند ۸۰ روزه که تحت تیمار اسپری غلظت‌های مختلف نانوآهن (۱، ۲، و 3 g/l) قرار گرفتند، نشان داد که میزان کربوهیدرات در غلظت‌های ۱ و 2 g/l نانوآهن افزایش یافت ولی در غلظت 3 g/l کاهش معنی‌داری را نشان داد (Mazlomi-Mamyandi et al., 2012a). محققین مطرح نمودند که مقادیر بالا و سمی آهن با افزایش تنفس نوری و متابولیسم گیاه برای مقابله با تولید رادیکال‌های آزاد همراه است که همین علت کاهش قندها در هنگام تنش سمیت آهن است (Kampfenkel and Montagu 1995). بنابراین هیچ یک از سطوح نانوآکسید آهن استفاده شده در این تحقیق در حد سمیت نبوده است زیرا در هیچ یک از سطوح نانو آکسید آهن مورد استفاده، مقدار کربوهیدرات‌های گیاه پریشی کاهش را نشان نمی‌دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان توانایی مهار رادیکال آزاد $I\%$ و کمترین میزان IC_{50} ، غلظتی از عصاره که 50% رادیکال‌های DPPH را مهار و تخریب کند، مربوط به گیاهانی است که هیچ آهنی (غلظت صفر μl) دریافت نکرده‌اند. این نشان‌دهنده‌ی این است که گیاهانی که هیچ آهنی (کلات آهن یا نانوآهن) دریافت نکرده‌اند (غلظت صفر μl) تحت شرایط تنشی قرار گرفته‌اند. بررسی فعالیت تخریب رادیکال‌های آزاد در گیاه توت‌فرنگی در معرض کمبود آهن نیز کاهش معنی‌دار میزان IC_{50} را نسبت به شاهد نشان داد. کاهش در میزان IC_{50} نشان‌دهنده‌ی افزایش مقدار و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در این گیاه می‌باشد (Pestana et al., 2010). به طور کلی میزان تولید گونه‌های فعال و واکنش‌گر اکسیژن ROS تحت شرایط نامساعد محیطی و تنش‌های مختلف افزایش می‌یابد. ROS ها با تخریب نوکلئیک اسیدها، اکسیداسیون

(Adamski *et al.*, 2012; Walker and Connolly, 2008) بنابراین هیچ یک از غلظت‌های مورد استفاده نانو آهن در این تحقیق برای پریش سمی نیست.

نتیجه‌گیری کلی:

این نتایج نشان می‌دهد که کود آهن تهیه شده با فناوری نانو حتی در غلظت‌های کم (۵µl) هم می‌تواند سبب افزایش رشد گیاه پریش شود و هیچ یک از غلظت‌های نانو اکسید آهن استفاده شده در این تحقیق (۵ تا ۴۰ میکرولیتر) برای گیاه پریش سمی نیست.

هرگونه شرایط تنشی در گیاه جلوگیری می‌شود (Mohamadipoor *et al.*, 2013). در این مطالعه، گیاهانی که تحت غلظت‌های مختلف نانو اکسید آهن قرار گرفتند تغییر معنی‌داری در میزان %I، IC₅₀ و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند. با توجه به اینکه هم کمبود و هم تجمع و انباشت زیاد آهن (سمیت آهن) با بالا رفتن واکنش‌های فنتون همراه است که منجر به تولید مقادیر بالایی از رادیکال سمی هیدروکسیل و دیگر اشکال گونه‌های واکنشگر اکسیژن ROS آزاد می‌شود، یعنی غلظت‌های سمی آهن نیز مانند کمبود آن در گیاهان تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند

منابع:

- صابری، ط. (۱۳۹۲) مطالعه تاثیر نانو ذرات اکسید آهن بر رشد و فیزیولوژی گیاه پریش *Catharanthus roseus*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
- Abe, N., Murata, T. and Hirota, A. (1998) Novel 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62: 61-662.
- Adamski, J. M., Danieloski, R., Deuner, S., Braga, E. J. B., De Castro, L. A. S. and Peters, J. A. (2012) Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1827-1836.
- Alvarez-Fernandez, A., Abadia, J., Abadia, A. (2006) Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. In: Iron nutrition in plants and rizospheric microorganisms. *Developments in plant and soil sciences.* (eds. Barton, L. L. and Abadia, J.) Pp. 437-448. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Aslam, J., Haque Khan, S. and Siddiqui, ZH. (2010) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production, *Pharmacie Globale, India.* 4: 1-16.
- Baghaie, N., Keshavarz, N., Nazaran, M. H. (2011) 1th National Conference on new topics in agriculture, 8-10 November, University of Saveh, Iran, Saveh.
- Banaei, M. H, Moameni, A, Baybordi, M. and Malakouti, M. I (2005) The Soils of Iran, new achievements in perception. *Managements and use.* Sana publication, Tehran. Iran.
- Bates, L. S., Waldron, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studied. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Cakmak, I. and Marschner, H. (1992); Manesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology, USA.* 98:1222-1227.
- Chen, L., Smith, B. R. and Cheng, L. (2004) CO₂ assimilation, photosynthetic enzymes and carbohydrates of 'Concord Grape Leaves in response to Iron Supply. *American Society for Horticulture Science* 129: 738-744.
- Chinnamuthu, C. R. and Murugesu Boopathi, P. (2009) Nanotechnology and Agroecosystem. *Madras Agricultural journal* 96: 17-31.
- Dokhe, S. A., Mahajan, P., Kamble, R. and Khanna, A. (2013) Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. *Nanotechnology Development* 3: 1-5.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356.
- Eichert, T., Peguero-Pina, J. J., Gil-Pelegrin, E. and Fernandez, V. (2009) Effects of Fe-chlorosis on the stomatal behaviour and water relations of field-grown peach leaves. *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI.* paper 1335 (XVI International Plant Nutrition Colloquium, Sacramento).

- efficiency on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. *World Applied Sciences* 7: 36-40.
- Mazlomi-Mamyandi, M., Pirzad, A. and Zardoshti, M. R. (2012a) Allocation ratio of photosynthate to different parts of sugar beet plant affected by nano-iron foliar application at varying growth stages. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 2: 121-130.
- Mazlomi-Mamyandi, M., Pirzad, A. and Zardoshti, M. R. (2012b) Effect of Nano-iron spraying at varying growth stage of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) on the size of different plant parts. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4: 740-745.
- Moghadam, A., Vattani, H. Baghaei, N. and Keshavarz, N. (2012) Effect of different levels of fertilizer nano_iron chelates on growth and yield characteristics of two varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.): Varamin 88 and Viroflay. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology* 4: 4813-4818.
- Mohamadipoor, R., Sedaghatoor, S. Mahboub-Khomami, A. (2013) Effect of application of iron fertilizers in two methods 'foliar and soil application' on growth characteristics of *Spathyphyllum illusion*. *European Journal of Experimental Biology* 3: 232-240.
- Noori, M. (2002) Characterization of the Iranian species of Shophorea and Ammodendron (Leguminosea: Sophorea). PhD thesis, University of London and Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- Pestana, M., Gama, F., Saavedra, T., Correia P. J., Dandlen, S. and Miguel, M. G. (2010) Evaluation of Fe deficiency on strawberry fruit quality. *Acta Horticulturae* 868: 423-8.
- Pestana, M., Beja, P., Correia, P. J., de Varennes, A. and Faria, E. A. (2005) Relationships between floral nutrients and fruit quality in orange trees grown in a calcareous soil. *Tree Physiology* 24:761-7.
- Pestana, M., de Varennes, A., Goss, M. J., Abadía, J., Faria, E. A. (2004) Floral analysis as a tool to diagnose iron chlorosis in orange trees. *Plant and Soil* 259:287-95.
- Peyvandi, M., Mirza, M., Kamali Jamakani, Z. (2011a) The effect of nano Fe chelate and Fe chelate on the growth and activity of some antioxidant. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2: 25-32.
- Peyvandi, M., Parande, H. and Mirza, M. (2011b) Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Ocimum basilicum*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 1: 89-98.
- Fernandez, V., Eichert, T., Del Rio, V., Lopez-Casado, G., Heredia-Guerrero, J. A., Abadía, A., Heredia, A. and Abadía, J. (2008) Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications. *Plant and Soil* 311: 161-172.
- Fisichella, G., Santoro, A., Benintende, P. G., Longo, A. and Ruscica, S. (1998) Effects of single and associated deficiencies on free proline content in citrus leaves. *Tecnica Agricola* 51: 3-8.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005) Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Jaleel, C. A. Gopi, R., Alagu Lakshmanan, G. M. and Panneerselvam, R. (2006) Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Plant Science*. 171: 271-276.
- Kampfenkel, K. and Van Montagu, M. and Inze, D. (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225:165-7.
- Kosovaa, K., Vitamvasa, P., Prasila, I. T. and Renautb, J. (2011) Plant proteome changes under abiotic stress — contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Proteomics* 74: 1301-1322.
- Krystofova, O., Sochor, J., Zitka, O., Babula, P., Kudrle, V., Adam, V. and Kizek, R. (2013) Effect of Magnetic Nanoparticles on Tobacco BY-2 Cell Suspension Culture. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 47-71.
- Ksouri, R., Debez, A., Mahmoudi, H., Ouerghi, Z., Gharsalli, M. and Lachaa, M. (2007) Genotypic variability within Tunisian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) facing bicarbonate-induced iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 315-322.
- Liu, N., Peng, C., Lin, Z., Lin, G., Zhang, L. and Pan, X. (2006) Changes in photosystem ii activity and leaf reflectance features of several subtropical woody plants under simulated SO₂ treatment. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 1274-1286.
- Lopez-Millan, A. F., Morales, F., Abadía, A. and Abadía, J. (2001) Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *Physiologia Plantarum* 112: 31-38.
- Mazaherinia, S., Astaraei, A. R., Fotovat, A. and Monshi, A. (2010) Nano Iron Oxide particles

- production of Vinca. The university of Georgia cooperative extension service. 1-30. Available on line in: http://www.caes.uga.edu/applications/publications/files/pdf/B%201219_3. Accessed 29 February.
- Vasconsuelo, A. and Boland, R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172: 861-875.
- Walker, E. and Connolly, E. (2008) Time to pump iron: iron –deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *plant biology* 11:530-535
- Whiting, D., Card, A. Wilson, C., and Reeder, J. (2011) Soil pH. Colorado Master Gardener notes.222:1-4.retrieved from <http://www.cmg.colostate.edu/gardennotes/222.pdf>.
- Wiswanathan, B. (2009) Nanomaterials. Alpha science international limited. London. 250p
- Xiu-Mei, L. Fu-Dao, Z., Zhao-Bin, F., Shu-qing, Z., Xu-sheng, H., Ru-Fang, W. and Yu-Jun, W. (2005) Effects of nano-ferric oxide on the growth and nutrients absorption of peanut. *Plant nutrition and Fertilizer Science* 11: 551-555.
- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D. W., Song, C. P. (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 126: 1438-1448.
- Polle, A., Otter, T. and Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106, USA: 53-56.
- Prasad, T., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Rajareddy, k., Sreeprasad, T. S., Sajanla, P. R. and Pradeep, T. (2012) Effect of nano scalezink oxid particle on the germination growth and yield of peanut. *journal of plant Nutrition*.35:905-927
- Ranjbar, M. and shams G.A. 2009. Using of nanotechnology. *Journal Environment Green* 3: 29-34. Brumbarova, T.and Bauer, P. (2005) Iron-mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato. *Plant Physiology* 137: 1018–1026.
- Sheykhbaglou, R., Sedghi, M., Tajbakhsh-Shishevan, M. Seyed-Sharifi, R. (2010) Effects of Nano-Iron Oxide Particles on Agronomic Traits of Soybean. *Notulae Scientia Biologicae* 2: 112-113.
- Shimshi, D. (1967) Leaf chlorosis and stomatal aperture. *New Phytologist* 66: 455-461.
- Tan, J., Zhao, H., Hoang, J., Han, Y., Li, H. and Zhao, W. (2008) Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat Seedlings subjected to osmotic stress. *Agricultural Sciences* 4: 307-313.
- Thomas, P., Woodward, J., Stegelin, F., and Pennisi, B. (2012) A guide for commercial