Nova Biologica Reperta 6(1): 116-123 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۱۱۶ الی ۱۲۳ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی تأثیرات فری‌اکسامین B بر رشد و محتوای کلروفیل نخود در مطالعه درشیشه

سولماز خسروی[۱]، پریسا کوباز[۲]، داوود نادری[۳]، نرگس مجتهدی[۴] و اکرم صادقی[۵]

[۱]گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ [۲]گروه پژوهشی فیزیولوژی مولکولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ [۳]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران؛ [۴]گروه پژوهشی کشت بافت و سلول، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ [۵]گروه پژوهشی بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
مسئول مکاتبات: اکرم صادقی، aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده. در دسترس بودن آهن برای ریشه‌ها به عنوان یک عامل مهم در تولیدات گیاهی اثبات شده است. اضافه کردن کلات‌های شیمیایی آهن به خاک با آنکه از نظر اقتصادی مقرون به صرف نیست روشی معمول است. علاوه بر این، استفاده از کودهای شیمیایی آهن مشکلات زیادی مانند آلودگی مواد غذایی و محیط زیست را در پی دارد. توسعه کلاتورهای آهن طبیعی میکروبی از خانواده سیدروفورهای هیدروکساماتی مانند دسفری‌اکسامین B برای تولید یک منبع آهن ایمن و موثر ممکن است بهترین روش برای مقابله با کمبود آهن گیاه و جلوگیری از آلودگی عوامل شیمیایی باشد. در این مطالعه قابلیت فری‌اکسامین B برای استفاده به عنوان یک منبع آهن جایگزین در کشت بافت گیاه نخود بررسی شد. بدین منظور جنین بذرهای نخود پس از ضد عفونی سطحی در محیط کشت MS و MS ۱/۲ حاوی ۳ درصد سوکروز و ۰/۸ درصد آگار همراه با فری‌اکسامین B و یا Fe–EDTA کشت شد. طول ریشه و ساقه، وزن خشک ریشه و ساقه، وزن تر و خشک گیاهچه و کلروفیل a و b اندازه‌گیری شد. بنا بر نتایج حاصل، فری‌اکسامین B در مقایسه با Fe-EDTA موجب افزایش کلروفیل a و b نشد. اگر چه ریشه زایی (۲۲ درصد)، وزن خشک گیاهچه (۳۸ درصد)، وزن خشک ریشه (۷۵ درصد) و ساقه (۲۲ درصد) در MS حاوی فری‌اکسامین B در مقایسه با Fe-EDTA به طور معنی دار ($p\leq0.05$) افزایش پیدا کرد. بنابراین نتایج فری‌اکسامین B به عنوان یک منبع آهن مقرون به صرفه و کارآمد برای کاهش کمبود آهن گیاهان در شرایط در شیشه معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی. سیدروفور، کشت بافت، کلات آهن، کمبود آهن، کود شیمیایی

In vitro studies on effects of Ferrioxamine B on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth and chlorophyll content

Solmaz Khosravi[1], Parisa Koobaz[2], Davood Naderi[3], Narges Mojtahedi[4] & Akram Sadeghi[5]*
[1]Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; [2]Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; [3]Young Researchers Club, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran; [4]Department of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; [5]Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Correspondent author: Akram Sadeghi, aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract. The availability of iron for roots has been demonstrated as a critical factor in plant production. The addition of synthetic iron chelates to soil is a common practice in agriculture, which is not economically beneficial. Besides, chemical iron fertilizers cause many problems such as food contamination and environmental pollution. Development of natural Ferrioxamine B as an efficient and safe iron source may be the best strategy to overcome plant iron deficiency and prevention of synthetic agent pollution. The present study investigates the ability of a hydroxamate type siderophores

Received 13.08.2017/ Revised 11.10.2018/ Accepted 15.10.2018/ Published 01.05.2019
دریافت ۱۳۹۶/۰۵/۲۲/اصلاح ۱۳۹۷/۰۷/۱۹/پذیرش ۱۳۹۷/۰۷/۲۳/انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

(Ferrioxamine B) as a substitute Fe source during tissue culture of chickpea plants. For this purpose, embryo axes from chickpea seeds were surface sterilized and cultured in 1/2MS and MS culture media including 3% sucrose and 0.8% agar with Ferrioxamine B or Fe–EDTA. The root and shoot length, shoot and root dry weight, total fresh and dry weight, as well as chlorophylls a and b were analysed. Results indicated that Ferrioxamine B did not increase chlorophylls a and b in comparison with Fe-EDTA. However, rooting (22%), total dry weight (38%) and root (75%) and shoot (22%) dry weight significantly ($p \leq 0.05$) increased in MS containing Ferrioxamine B in comparison with Fe-EDTA. Consequently, Ferrioxamine B is introduced as a cost-effective and applicable Fe source to favour iron deficiency *in vitro*.

Keywords. chemical fertilizer, iron chelate, iron deficiency, siderophore, tissue culture

مقدمه

آهن یکی از عناصر ضروری برای بسیاری از عملکردهای زیستی گیاهان است (Guerinot & Yi, 1994). گیاهان بر اساس نحوه جذب آهن به دو گروه تقسیم می‌شوند. در تعدادی از گیاهان گروه اول در پاسخ به کمبود آهن سیستم انتقال آهن با جذب بالا فعال می‌شود که به واسطه آن می‌توانند از عوامل کلات کننده آهن میکروبی که سیدروفور نامیده می‌شوند استفاده کنند (Romheld & Marschner, 1986). سیدروفورها آهن را از محیط جدا کرده و به وسیله سیستم‌های برداشت وابسته به انرژی (انتقال فعال) آن را به داخل سلول منتقل می‌کنند. این ترکیبات که در شرایط کمبود آهن توسط میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شوند به همراه مولکول‌های رسپتور نقش اصلی را در سیستم انتقال آهن به عهده دارند. چنین سیستم‌هایی برای رفع احتیاجات سلول باکتری در شرایط کمبود آهن ضروری هستند (Kraemer, 2004).گیاهان دو لپه قادر به جذب Fe^{+} از سیدروفورهای میکروبی هستند (Crowley *et al*., 1991). حضور سیدروفورهای هیدروکساماتی در خاک در مقادیر قابل توجه ($۱۰^{-۷}$ تا $۱۰^{-۸}$ مول) گزارش شده است (Powell *et al*., 1980). سیدروفورهای هیدروکساماتی شامل سه گروه ثانویه هیدروکسامات هستند (C(=0)N-(OH)-R)که R یک اسید آمینه و یا مشتقی از آن است. هر گروه هیدروکسامات دو اکسیژن دارد که یک لیگاند دو باندی جهت اتصال با آهن تشکیل می‌دهد. بنابراین هر مولکول سیدروفور هیدروکساماتی یک کمپلکس اکتاهدرال شش باندی با آهن سه ظرفیتی تشکیل می‌دهد (Mawji *et al*., 2008). همچنین گزارش شده که سیدروفورهای هیدروکساماتی بویژه دسفری‌اکسامین B (Desferrioxamine B, $C_{25}H_{45}N_6O_8$) عمده‌ترین نوع سیدروفور موجود در خاک است (Crowley *et al*., 1988). دسفری‌اکسامین B برای تهیه داروی دسفرال استفاده می‌شود. دسفرال با اتصال به آهن موجود در خون بیماران بتاتالاسمی، که بر اثر تزریق پی در پی خون تجمع پیدا کرده کمپلکس فری‌اکسامین B (Ferrioxamine B, $C_{25}H_{45}FeN_6O_8$) را تشکیل می‌دهد. دفع این کمپلکس از طریق ادرار از رسوب آهن در بافت‌های بدن بیماران و عوارض آن جلوگیری می‌کند (Mobarra *et al*., 2016). استفاده مستقیم از سیدروفورهای میکروبی به عنوان منبع آهن بررسی شده و تاثیر آن در ممانعت از تنش کمبود آهن و افزایش محصول گزارش گزارش شده است (Wang *et al*., 1993). از طرف دیگر سیدروفور یکی از ترکیباتی است که سیستم ایمنی گیاه را در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی تحریک می‌کند (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). گونه‌هایی از جنس باکتری استرپتومایسس توانایی تولید سیدروفور را دارند (Muller & Roymond, 1984; Neilands, 1981). با وجود آن‌که بعضی از گونه‌های نوکاردیاها، میکرومنوسپوراها، آرتروباکترها، کروموباکتریوم‌ها و سودمونوس‌ها توانایی تولید دسفری اکسامین‌ها را دارند اما منابعی که نسبت به سایرین ارجحیت دارند کشت سویه‌هایی از جنس استرپتومایسس است. این باکتری‌ها هر ده نوع دسفری‌اکسامین-A G منجمله نوع B را بعنوان مهمترین نوع تولید می‌کنند (Neilands, 1981). در حال حاضر استفاده مستقیم از کلاتورهای آهن شیمیایی مانند Fe-EDTA در کشاورزی معمول است (Barton & Abadía, 2006). اغلب این کلاتورهای شیمیایی در خاک‌های قلیایی کارایی خوبی ندارند (Hashemimajd & Jamaati-e-Somarin, 2011) و علاوه بر آن از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیستند (Barton & Abadía, 2006). از طرف دیگر آلودگی‌های محیطی ناشی از مصرف بیش از حد کودهای شیمیایی نیز مسئله دیگری است که باید به آن توجه شود. یکی دیگر از مشکلات استفاده از کودهای شیمیایی آهن جذب مستقیم ترکیب کامل آهن-کلاتور (کلات آهن) توسط گیاه است. تجمع EDDHA که یکی از کلاتورهای آهن است در میوه گزارش شده است (Bienfait *et al*., 2004). بنابراین تحقیق و توسعه بر

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

روی کلاتورهای طبیعی آهن مانند دسفری‌اکسامین B برای تولید منبع آهن طبیعی و کارآمد جهت برطرف کردن کمبود آهن گیاهان و همچنین اجتناب از آلودگی با عوامل شیمیایی ضروری است. در این مطالعه قابلیت فری‌اکسامین B برای استفاده به عنوان یک منبع آهن جایگزین در کشت بافت گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) بررسی شد. تأثیر این کلات آهن طبیعی بر شاخص‌های رشد، محتوای کلروفیل و سلامت گیاه در شرایط نرمال (مقادیر استاندارد آهن) و کمبود آهن بررسی و با یک کلات آهن شیمیایی (Fe-EDTA) مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جنین رسیده

بذرهای نخود (*Cicer arietinum* L.) تیپ سفید یا کابلی با نام بیونیج از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور در مراغهتهیه شد. بذرهای رسیده با استفاده از اتانل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، محلول سفید کننده تجاری ۵۰ درصد (حاوی ۵/۲۵ درصد هیپوکلرید سدیم) به مدت ۱۵ دقیقه (همراه با همزدن روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) و به دنبال آن چهار بار آبشویی با آب مقطر استریل ضدعفونی سطحی شد. پس از ضدعفونی بذرها یک شب در آب مقطر استریل قرار داده شد. سپس محور جنینی هر بذر در محیط استریل خارج شد.

محیط و شرایط کشت جنین رسیده

جنین‌های جدا شده بر روی محیط MS و MS ۱/۲ حاوی ۳ درصد سوکروز و ۰/۸ درصد آگار کشت شد. فری‌اکسامین B (Desferal, Novartis Pharmaceuticals Corporation) و یا Fe–EDTA (Sigma) با غلظت‌های متفاوت (مطابق جدول ۱) به عنوان منبع آهن به محیط کشت اضافه شد. اسیدیته (pH) تمام تیمارها پس از افزودن منبع آهن روی ۵/۸ تنظیم شد. محیط کشت آماده شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر ضد عفونی شد. هر تیمار دارای ۱۰ تکرار و هر تکرار حاوی یک شیشه مربا با ۴ جنین بود. این آزمایش دو بار تکرار شد. نمونه‌ها در فیتوترون در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. گیاهچه‌ها هر ۳ هفته به محیط تازه منتقل شد. پس از ۷ هفته، گیاهچه‌ها در شرایط استریل جمع-آوری شد.

بررسی مورفولوژی گیاهچه

ریشه‌ها برای کاهش آلودگی و بر طرف نمودن باقیمانده‌های محیط کشت و آگار با آب مقطر استریل شسته شد. طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک گیاهچه و وزن خشک ساقه و ریشه به تفکیک اندازه‌گیری شد. همچنین مورفولوژی و سلامت گیاهچه بر اساس ضخامت ساقه و شاخه‌ها و زردی و سر سوختگی ساقه بررسی و به صورت کیفی سنجش شد.

اندازه‌گیری کلروفیل a و b

برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b و محتوای کلروفیل کل از برگ‌های تازه گیاهچه استفاده شد. رنگدانه‌های کلروفیل با استفاده از ساییدن برگ‌ها در استون ۸۰ درصد (نسبت ماده به حلال ۱:۵۰) در دمای اتاق و تاریکی استخراج شد. جذب هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Carry 300) در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد. مقدار کمی کلروفیل a و b و مجموع آن‌ها بر اساس روش آرون (1949) و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{Chl a (mg g}^{-1}\text{ tissue)} = (12.25\ A_{663} - 2.79\ A_{645}) \times V/1000W$$

$$\text{Chl b (mg g}^{-1}\text{ tissue)} = (21.50\ A_{645} - 5.10\ A_{663}) \times V/1000W$$

$$\text{Chl a+b (mg g}^{-1}\text{ tissue)} = (7.15\ A_{663} + 18.71\ A_{645}) \times V/1000W$$

که در این رابطه Chl a مقدار کلروفیل a، Chl b مقدار کلروفیل b، V حجم نهایی عصاره در استون ۸۰ درصد و W وزن بافت تازه بر حسب گرم است.

تحلیل آماری

این آزمایش به صورت طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیهٔ واریانس داده‌ها نرم‌افزار MSTATC (Bricker, 1991) انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج

بررسی‌های مورفولوژیکی

علایم کمبود آهن به دو صورت زردی برگ‌ها (پس از ۱۰ روز) و سر سوختگی (نکروز) نوک ساقه (پس از ۳۰ روز) در محیط MS بدون آهن ظاهر شد. این علایم زمانی که غلظت مواد تشکیل دهنده محیط کشت به نصف کاهش یافت (MS ۱/۲) نیز مشاهده شد. گیاهچه‌های کشت شده در محیط حاوی آهن در مقادیر استاندارد (۳۷/۵ میلی‌گرم/لیتر) از هر دو نوع فری‌اکسامین B و یا

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

Fe–EDTA رشد طبیعی داشته و علایم زردی و یا نکروز در نوک ساقه آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۲). استفاده از محیط کشت MS کامل موجب تشکیل طوقه‌های کلفت در مقایسه با محیط کشت MS ۱/۲ شد. طوقه‌های گیاهچه‌های کشت شده در MS ۱/۲ باریک و شاخه‌ها علفی شکل بود (شکل ۱). در هر سه تیمار آهن اعمال شده در محیط MS ۱/۲ تمامی جنین‌ها (۱۰۰ درصد) ریشه دار شد. در صورتی که درصد ریشه زایی جنین‌های رسیده در سه تیمار آهن محیط MS شامل بدون آهن، Fe–EDTA و فری‌اکسامین B به ترتیب ۴۵، ۷۸ و ۹۵ درصد بود.

محتوای کلروفیل برگ

تحلیل واریانس نشان داد که افزودن آهن به محیط کشت تأثیر معنی داری ($p\leq0.05$) بر محتوای کلروفیل برگ داشت. بر طبق نتایج حاصل کلروفیل a و b و محتوای کلروفیل کل در تیمارهای حاوی Fe-EDTA بیشتر از سایر تیمارها بود. اگر چه مقادیر

جدول ۱- تیمارهای مختلف آهن اضافه شده به محیط محیط کشت MS.

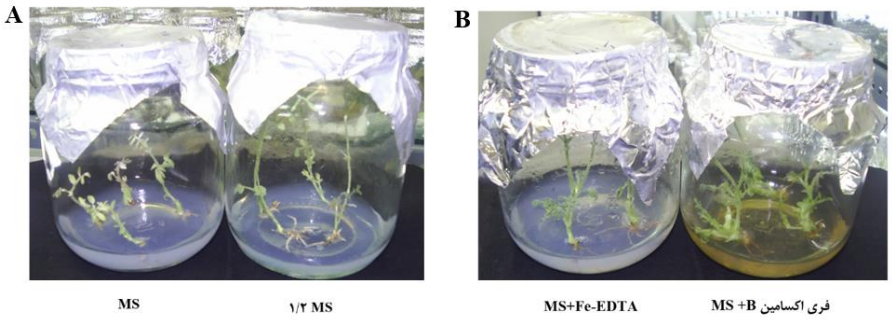
Table 1. Different iron treatments applied in MS medium.

محیط کشت	تیمار آهن
MS	بدون آهن
	Fe- EDTA
	فری‌اکسامین B
۱/۲MS	بدون آهن
	۱/۲Fe- EDTA
	فری‌اکسامین ۱/۲ B

جدول ۲- مورفولوژی ساقه، درصد ریشه زایی، زردی و سرسوختگی نخود در تیمارهای مختلف آهن.

Table 2. Shoot morphology, rooting percentage, chlorosis and necrosis of chickpea in different iron treatments.

تیمارها و محیط کشت	فرم ساقه و طوقه	ریشه زایی درصد	زردی	سر سوختگی ساقه
MS (بدون آهن)	طوقه ضخیم و ساقه طبیعی	۴۵	+	+
MS+Fe- EDTA	طوقه ضخیم و ساقه طبیعی	۷۸	-	-
فری‌اکسامین MS+ B	طوقه ضخیم و ساقه طبیعی	۹۵	-	-
MS ۱/۲ (بدون آهن)	طوقه نازک و ساقه علفی	۱۰۰	+	+
۱/۲MS+ ۱/۲ Fe- EDTA	طوقه نازک و ساقه علفی	۱۰۰	-	-
فری‌اکسامین B ۱/۲ +۱/۲MS	طوقه نازک و ساقه علفی	۱۰۰	-	-



شکل ۱- تأثیر محیط کشت و تیمار آهن بر مورفولوژی گیاهچه نخود. **A.** تأثیر غلظت محیط کشت MS. **B.** تأثیر منبع آهن.

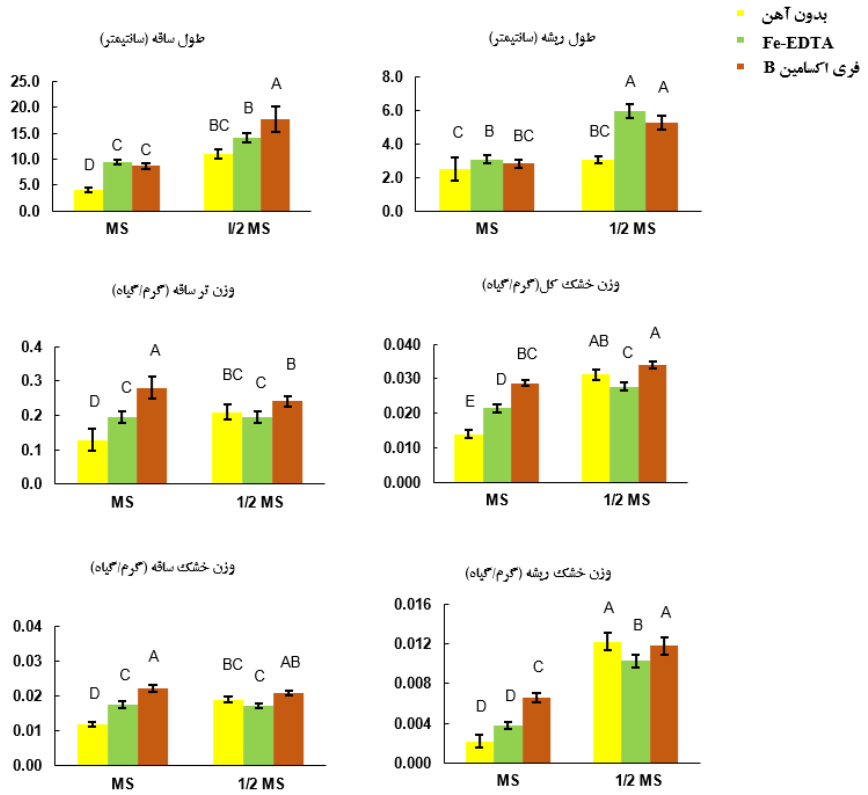
Fig. 1. Effect of different treatments of iron and culture media on chickpea seedling morphology. **A**. Effect of culture media concentration. **B**. Effect of iron source.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

جدول ۳- محتوای کلروفیل (chl) نخود در تیمارهای مختلف آهن و محیط کشت.

Table 3. Chlorophyll content of chickpea in different treatments of iron and culture media.

Chl a/b	Chl a+b (mg/g)	Chl b (mg/g)	Chl a (mg/g)	تیمارها و محیط کشت
4.7 ± 0.41^{a}	32.3 ± 3.96^{d}	5.6 ± 0.52^{d}	26.6 ± 3.55^{d}	MS (بدون آهن)
3.6 ± 0.23^{b}	158.0 ± 13.38^{ab}	34.4 ± 2.95^{a}	123.7 ± 10.98^{ab}	MS+Fe- EDTA
4.0 ± 0.35^{ab}	90.8 ± 11.71^{c}	18.6 ± 3.42^{bc}	72.2 ± 8.74^{c}	MS+ B فری‌اکسامین
5.1 ± 1.12^{ab}	87.3 ± 7.19^{c}	17.5 ± 4.26^{c}	69.9 ± 3.09^{c}	۱/۲MS (بدون آهن)
4.1 ± 0.21^{ab}	173.6 ± 11.30^{a}	34.6 ± 3.19^{a}	139.1 ± 8.34^{a}	۱/۲MS+ ۱/۲ Fe- EDTA
4.3 ± 0.29^{ab}	142.5 ± 8.70^{b}	27.0 ± 1.88^{ab}	115.4 ± 7.41^{b}	۱/۲MS+ ۱/۲ B فری‌اکسامین



شکل ۲- تأثیر محیط کشت و تیمارهای آهن بر شاخص‌های رشد گیاهچه نخود.

Fig. 2. Influence of culture media and iron treatments on chickpea seedling growth parameters.

کلروفیل a و b استخراج شده از برگ گیاهچه‌های کشت شده در محیط حاوی فری‌اکسامین B کمتر از گیاهچه‌های کشت شده در حضور Fe-EDTA بود اما نسبت کلروفیل a/b در این دو تیمار تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۳). در تیمارهای MS ۱/۲ با و یا بدون آهن مقادیر کلروفیل a و b و محتوای کلروفیل کل بیشتر از MS کامل بود. کاهش غلظت نمک‌های معدنی محیط کشت بدون آهن (iron free MS) به نصف (iron free 1/2MS) موجب افزایش محتوای کلروفیل کل به میزان ۱۶۰ درصد شد. افزایش منابع آهن Fe-EDTA و فری‌اکسامین B به این محیط به ترتیب موجب افزایش ۹ و ۵۷ درصدی محتوای کلروفیل کل شد.

شاخص‌های رشد گیاه

کاهش غلظت نمک‌های MS به نصف، طول ساقه را از ۴ به ۱۱ سانتی‌متر افزایش داد. در تیمارهای مختلف آهن نیز این افزایش طول دیده شد. طول ساقه در محیط کشت ۱/۲MS همراه با فری‌اکسامین B، ۱۷/۷ سانتی‌متر و به‌طور معنی‌دار نسبت به بقیهٔ تیمارها بیشتر بود. درحالی‌که تفاوت طول گیاهچه‌های کشت‌شده در محیط ۱/۲MS حاوی Fe-EDTA (۱۴/۱ سانتی‌متر) و بدون آهن (۱۱ سانتی‌متر) معنی‌دار نبود (شکل ۲). طول ریشه در محیط 1/2MS حاوی Fe-EDTA و فری‌اکسامین B به ترتیب ۵/۹۹ و ۵/۳۰ سانتی‌متر و بیشتر از سایر تیمارها بود. تفاوت طول ریشه در

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

نمونه‌های دو منبع مختلف آهن معنی‌دار نبود. اگرچه کاهش غلظت نمک‌های MS به تنهایی موجب افزایش طول ریشه نشد، منابع آهن Fe-EDTA و فری‌اکسامین B به‌ترتیب موجب افزایش ۱۳۸ و ۱۱۰ درصدی طول ریشه در ۱/۲MS شدند (شکل ۲). بیشترین وزن خشک گیاهچه‌ها در محیط ۱/۲MS بدون آهن و یا با منبع آهن فری‌اکسامین B و همچنین محیط MS حاوی فری‌اکسامین B و به‌ترتیب برابر با ۰/۰۳۱، ۰/۰۳۴ و ۰/۰۲۹ گرم بود. تأثیر کاهش غلظت نمک‌های MS بر افزایش وزن خشک گیاهچه در هر سه تیمار آهن معنی‌دار بود. افزودن فری‌اکسامین B به محیط MS کامل به جای Fe-EDTA وزن خشک کل را ۳۸ درصد افزایش داد. این میزان افزایش در ۱/۲MS کمتر (۲۱ درصد) بود (شکل ۲). افزودن Fe-EDTA به MS کامل موجب افزایش وزن خشک ریشه نشد. در صورتیکه فری‌اکسامین B موجب افزایش ۲۵۰ درصدی وزن خشک ریشه شد. در محیط 1/2MS وزن خشک ریشه محیط بدون آهن و حاوی فری‌اکسامین B برابر و ۲۰ درصد بیشتر از محیط حاوی Fe-EDTA بود (شکل ۲). تأثیر غلظت نمک‌های MS و منابع آهن بر وزن خشک اندام‌های هوایی شامل ساقه و برگ‌ها کاملا مشابه نتایج بدست آمده برای ریشه بود. منبع آهن بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی تأثیر معنی‌داری داشت. بیشترین وزن خشک اندام هوایی مربوط به محیط 1/2MS و یا MS حاوی فری‌اکسامین B و به ترتیب برابر با ۰/۰۲۱ و ۰/۰۲۲ گرم بود. بیشترین وزن تر اندام هوایی مربوط به تیمار MS حاوی فری‌اکسامین B، برابر با ۰/۲۸۰ گرم و ۴۳ درصد بیشتر از MS حاوی Fe-EDTA بود (شکل ۲).

بحث

تأثیر کمبود آهن به علت نقش مهمی که در فعالیت آنزیم‌های مسئول بیوسنتز پیش سازهای کلروفیل وابسته به آهن دارد به صورت زردی برگ دیده می‌شود (Spiller *et al*., 1982; Tottey *et al*., 2003). چنانچه در زمان مناسب به گیاه تحت تنش آهن مورد نیاز نرسد زردی به نکروز (سوختگی) تبدیل شده و خزان زود هنگام اتفاق خواهد افتاد (Barton & Abadía, 2006). در این مطالعه نیز گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین جدا شده از منبع غذایی ذخیره‌ای بذر در محیط بدون آهن ابتدا علایم زردی (۱۰ روز پس از کشت) و سپس (۳۰ روز پس از کشت) نکروز را نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر همسو با گزارش‌های این محققان نشان داد که استفاده از منبع آهن برای رشد نخود حیاتی است و با نقش فعالی که در جذب سایر ریز مغذی‌ها دارد رشد گیاه را توسعه می‌دهد (Abo-Rady, 1988). کشاورزان به طور معمول زردی ناشی از کمبود آهن را با استفاده از کلات‌های شیمیایی آهن پیشگیری و یا درمان می‌کنند (Lucena, 2003; Fernández & Ebert, 2005). در سال‌های اخیر، جهت کاهش مصرف کلات‌های شیمیایی آهن و افزایش آهن محلول و قابل استفاده توسط گیاه روش‌های مختلفی مانند استفاده از تکنولوژی کاهش اندازه ذرات آهن در مقیاس نانومتر (نانوتکنولوژی) همراه با حامل‌های مختلف مانند پلی اتیلن گلایکول (PEG) طراحی و مطالعه شده است (Duran *et al*., 2018). اگرچه مقدار مصرف مواد شیمیایی برای تهیه این نوع محصولات بسیار کمتر است اما در صورت عدم استفاده صحیح و به اندازه موجب تجمع ذرات آهن با ضریب نفوذ پذیری بالا در کلیه بافت‌های زیستی و بروز خطراتی برای محیط زیست و انسان می‌شوند (Wang *et al*., 2016). استفاده از کلات‌های طبیعی آهن به عنوان یک ناقل جهت انتقال آهن از خاک به ریشه‌های گیاه مطالعه و گزارش شده است (Lindsay, 1995; Lucen, 2003). پژوهشگران استفاده مستقیم و اختصاصی از فری‌اکسامین B را توسط خیار گزارش کرده‌اند (Wang *et al*., 1993). همچنین گزارش شده که جو دو سر در مقایسه با سایر سیدروفورهای هیدروکساماتی ترجیحاً فری‌اکسامین B را جذب می‌کند (Crowley *et al*., 1988). استفاده از این کلات طبیعی آهن توسط گیاهان زراعی مانند آفتاب گردان و سورگوم توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (Cline *et al*., 1984). افزایش گره‌های ریشه نخود، تثبیت نیتروژن در هر گره و همچنین وزن خشک گیاه در تیمار با یک سویه باکتری رایزوبیومی که بر اثر جهش مقادیر بیشتری سیدروفور تولید می‌کرد در مقایسه با سویه والد گزارش شده است (Raychaudhuri *et al*., 2005). افزایش زیست توده (بیومس) گیاهی توسط فری‌اکسامین B گزارش شده است. همچنین استفاده ترجیحی از آن برای ساخت مجدد کلروفیل در آزمایش‌های مدت دار در مقایسه با کلات آهن شیمیایی Fe-EDTA نشان داده شده است (Wang *et al*., 1993). در این مطالعه برای اولین بار کاربرد مستقیم فری‌اکسامین B به عنوان منبع آهن برای گیاه زراعی نخود گزارش شده است. همچنین تأثیر معنی دار فری‌اکسامین بر وزن تر

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

و خشک گیاهچه نخود بویژه زمانی‌که نمونه‌ها با تنش کمبود عناصر غذایی ماکرو و میکرو (1/2 MS) مواجه بودند نشان داده شد. این نتایج کارآیی بیشتر فری‌اکسامین را در مقایسه با Fe-EDTA برای افزایش توانایی گیاه در جذب مواد غذایی بیان می‌کند. بر اساس نتایج این مطالعه تامین آهن مورد نیاز از طریق فری‌اکسامین B همراه با کاهش مواد مغذی تا ۱/۲، حجم ریشه را بدون تغییر در وزن اندام‌های فتوسنتز کننده افزایش داد. این یافته زمانی اهمیت دارد که گسترش ریشه گیاهچه برای استقرار در خاک در شرایط کمبود آب (تنش خشکی) ضروری است. تنظیم آهن درون سلولی بر تحمل استرس اکسیداتیو موثر است و می‌تواند پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی را تحت تأثیر قرار دهد. سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی سلولی همراه با تنظیم دقیق مقادیر آهن سلولی می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را که در تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی افزایش پیدا می‌کنند کاهش دهد (Parveen *et al*., 2016). استفاده از فری‌اکسامین B به عنوان کود آهن ممکن است در تنش خشکی و یا کمبود مواد غذایی ناخواسته و یا با هدف کاهش استفاده از کودهای شیمیایی نسبت به کلات‌های آهن شیمیایی مانند Fe-EDTA یک مزیت باشد. استفاده از استرپتومایسس‌های محرک رشد تولید کننده سیدروفور در افزایش رشد چغندر قند (Sadeghi *et al*., 2009)، گندم تحت تنش شوری (Sadeghi *et al*., 2012) و ذرت درشرایط تنش کم آبی (Mahrokh *et al*., 2011) گزارش شده است. طراحی پژوهش‌های جدید برای توسعه استخراج فری‌اکسامین B از این باکتری‌ها و یا استفاده مستقیم از آن‌ها جهت افزایش رشد و تخفیف اثرات منفی تنش خشکی گیاهان زراعی به ویژه نخود از برنامه‌های آینده نویسندگان این مقاله است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، جهت تامین اعتبار مالی این پژوهش قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Abo-Rady, M.D.K. 1988. Effect of iron deficiency on growth, micronutrient status and chlorophyll content of *vinca rosea* grown in calcareous soils. – Arid. Land. Res. Manag. 2: 275 -283.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. – Plant. Physiol. 24: 1-150.

Barton, L.L. and Abadía, J. 2006. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. – Springer, Netherlands pp: 103-128.

Bienfait, H.F., Garcia-Mina, J. and Zamareno, A.M. 2004. Distribution and secondary effects of EDDHA in some vegetable species. – J. Soil. Sci. Plant. Nut. 50: 1103-1110.

Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. – Curr. Opin. Plant. Biol. 4: 343-350.

Bricker, B. 1991. MSTATC: A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. – Crop and Science Department, MSU, East Lansing MI 48824, USA.

Cline, G.R., Reid, C.P., Powell, P.E. and Szaniszlo, P.J. 1984. Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. – Plant. Physiol. 76: 36-39.

Crowley, D.E., Patrick reid, C.P. and Szaniszlo, P.J. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. – Plant Physiol. 87: 680-685.

Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P. and Szaniszlo, P.J. 1991 Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. – Plant Soil 130: 179-198.

Duran, N.M., Medina-Llamas, M., Cassanji, J.G.B., de Lima, R.G., de Almeida, E., Macedo, W.R., Mattia, D. and Pereira de Carvalho, H.W. 2018. Bean seedling growth enhancement using magnetite nanoparticles. – J. Agr. Food. Chem. 66: 5746-5755.

Fernández, V. and Ebert, G. 2005. Foliar iron fertilization—a critical review. – J. Plant Nutr. 28: 2113-2124.

Guerinot, M.L. and Yi, Y. 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. – Plant Physiol. 104: 815-820.

Hashemimajd, K. and Jamaati-e-Somarin, S. 2011. Investigating the effect of iron and zinc enriched vermicompost on growth and nutritional status of peach trees. – Sci. Res. Essays. 6: 5004-5007.

Kraemer, S. M. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. – Aquat. Sci. 66: 3-18.

Lindsay, W.L. 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach, In J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 7-14.

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

Mahrokh, A., Azizi, F., Sadeghi, A. and Karimi, A. 2011. Effect of application of *Streptomyces bacterium* on

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]

on grain yield and its components of maize cv. KSC260 under drought stress conditions. – Seed. Plant. Prod. J. 27: 165-181.

Mawji, E., Gledhill, M., Milton, J.A., Tarran, G.A., Ussher, S., Thompson, A., Wolff, G.A., Worsfold, P.J. and Achterberg, E.P. 2008. Hydroxamate siderophores: Occurrence and importance in the Atlantic Ocean. – Environ. Sci. Technol. 42: 8675-8680.

Mobarra, N., Shanaki, M., Ehteram, H., Nasiri, H., Sahmani, M., Saeidi, M., Goudarzi, M., Pourkarim, H. and Azad, M. 2016. A Review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes. – Int. J. Hematol. Oncol. Stem. Cell. Res. 10: 239-247.

Muller, G. and Roymond, K.N. 1984. Specificity and mechanism of Ferrioxamine mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. – J. Bacteriol. 160: 304-312.

Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. – Annu. Rev. Biochem. 50: 715-731.

Parveen, S., Gupta, D.B., Dass, S., Kumar, A., Pandey, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. 2016. Chickpea ferritin cafer1 participates in oxidative stress response, and promotes growth and development. – Sci. Rep. 6: 312-18.

Powell, P.E., Cline, E.R., Reid, C.P.P. and Szaniszlo, P.J. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. – Nature 287: 833-834.

Raychaudhuri, N., Das, S.K. and Chakrabartty, P.K. 2005. Symbiotic effectiveness of a siderophore overproducing mutant of *Mesorhizobium cicero*. – Pol. J. Microbiol. 54: 37-41.

Romheld, V., and Marschner, H. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. – Adv. Plant. Nutr. 2: 155-204.

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, M.G., Dalvand, Y. and Askari, H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. – World. J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1503-1509.

Sadeghi, A., Hesan, A.R., Askari, H., Naderi Qomi, D., Farsi, M. and Majidi Hervan, E. 2009. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. – Biocontrol. Sci. Techn.19: 985-991.

Spiller, S., Castlefranco, A. and Castlefranco, P. 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. In vivo observations on iron and oxygen-deficient plants. – Plant. Physiol. 69: 107–111.

Tottey, S., Block, M., Allen, M., Westergren, T., Albrieux, C., Scheller, H., Merchant, S. and Jensen, P. 2003. Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. – Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 16119-16124.

Wang, Y., Brown, H.N., Crowley, D.E. and Szaniszlo, P.J. 1993. Evidence for direct utilization of a Siderophore, Ferrioxamine B in axenically grown cucumber. – Plant. Cell Environ. 16: 579-585.

Wang, Y., Deng, L., Caballero-Guzman, A. and Nowack, B. 2016. Are engineered nano iron oxide particles safe? an environmental risk assessment by probabilistic exposure, effects and risk modeling. – Nanotoxicol. 10: 1545-1554.

*****

How to cite this article:

Khosravi, S., Koobaz, P. Naderi, D., Mojtahedi, N. and Sadeghi, A. 2019. *In vitro* studies on effects of Ferrioxamine B on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth and chlorophyll content – Nova Biol. Reperta 6: 116-123.

خسروی، س.، کوباز، پ.، نادری، د.، مجتهدی، ن. و صادقی، ا. ۱۳۹۸. بررسی تأثیر فری‌اکسامین B بر رشد و محتوای کلروفیل نخود در مطالعه در شیشه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۱۲۳-۱۱۶.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.11.6]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.116]