نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۸ شماره ۴ صفحه‌های ۱۰۹ تا ۱۲۵ / سال ۱۳۹۷

تأثیر روش کاربرد اسید هیومیک بر زیست‌فراهمی آهن در گیاه کلزا

طالب نظری[۱]، مجتبی بارانی مطلق[۲*]، اسماعیل دردی پور[۳]، رضا قربانی نصرآبادی[۴]، سمیه سفیدگر شاهکلایی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۲

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲ و ۳ - دانشیاران گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۵- دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:mbarani2002@yahoo.com

چکیده

برای بررسی تأثیر کاربرد خاکی، محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری (کودآبیاری) اسید هیومیک بر فراهمی آهن در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ٤ تکرار به‌اجرا درآمد که تیمارها شامل مصرف خاکی اسید هیومیک در سه سطح (۱، ۲ و ٤ گرم بر کیلوگرم خاک)، محلول‌پاشی اسید هیومیک در سه سطح (۰/۱، ۰/۲ و ۰/٤ درصد) و همراه با آب آبیاری در سه سطح (۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد (بدون اسید هیومیک) بود. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت آهن کل در ساقه و آهن فعال به‌ترتیب با میانگین ۸۵ و ٤٤/۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مصرف اسید هیومیک همراه با آب آبیاری و کمترین مقدار به‌ترتیب با میانگین ٥٤/٦ و ۲۰/٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین آهن قابل استخراج خاک گلدان‌ها پس از برداشت، توسط عصاره‌گیرهای مختلف به‌ترتیب اگزالات آمونیوم سریع> هیدروکسیل آمین هیدروکلراید >AC-EDTA< DTPA< AB-DTPA < EDTA کاهش یافت. براساس نتایج به‌دست آمده آهن استخراج شده به‌وسیله بیشتر عصاره‌گیرها با شاخص کلروفیل همبستگی معنی‌دار داشتند. از بین عصاره‌گیرها تنها آهن استخراج شده به وسیله DTPA با آهن کل ساقه (r=۰/٦۹*) و آهن فعال (r=۰/۷۹*) معنی‌دار شدند و بین آهن عصاره‌گیری شده توسط این عصاره‌گیر و غلظت کل آهن برگ همبستگی ضعیف و غیرمعنی‌دار ($r=۰/۳۵^{ns}$) مشاهده گردید. در این تحقیق مشاهده شد اندازه‌گیری آهن فعال می‌تواند یک روش مناسب برای تشخیص کمبود آهن در گیاه کلزا باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید هیومیک، آهن فعال، آهن قابل استفاده، عصاره‌گیرهای آهن، کلزا

Effect of Humic Acid Application Method on Bioavailability of Iron in Canola

T Nazari[1], M Barani Motlagh[2*], E Dordipour[3], R Ghorbani Nasrabadi[4], S Sefidgar Shahkolaie[5]

Received: 7 December 2017 Accepted: 2 June 2018
[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan Uni. of Agri. Sci.and Natural Res. Iran.
[2,3] Assoc. Prof, Dept. of Soil Science, Gorgan Uni. of Agri. Sci.and Natural Res. Iran.
[4] Assist. Prof, Dept. of Soil Science, Gorgan Uni. of Agri. Sci.and Natural Res. Iran.
[5] Phd. Students, Dept. of Soil Science, Gorgan Uni. of Agri. Sci.and Natural Res. Iran.
* Corresponding Author, Email: mbarani2002@yahoo.com

Abstract

In order to investigate the effect of acid humic application method including soil application, spraying and fertigation on iron (Fe) supplying in rapeseed, an expriment was caried out consisting of 10 treatments and 4 replications. Treatments included humic acid soil application in three levels (1, 2 and 4 g kg^{-1} soil), spraying at three levels (0.1, 0.2 and 0.4%) and with fertigation at three levels (1000, 2000 and 4000 mg L^{-1}) and control treatment (without humic acid)**.** The results showed that the highest total iron and active iron concentration in stalk was 85 and 44.9 mg kg^{-1}, respectively, in the treatment of 2000 mg L^{-1} of humic acid with fertigation, and the lowest value, respectively, with an average of 54.62 and 20.40 mg kg^{-1} for control treatment. Also, the ordre of significance for extractable- Fe from the pot soil by various extractants was as follows: rapid ammonium oxalate > hydroxylamine hydrochloride >AC-EDTA> DTPA> AB-DTPA >EDTA. The results obtained in present study showed that extracted iron was significantly correlated with chlorophyll content by most of the extractants. Among extractants, only extracted Fe with DTPA correlated positively and significantly with total Fe ($r=0.69^{*}$) and active Fe ($r=0.79^{*}$) while, total iron of leaf had weak and non-signifcant correlation (r= 0.35) with DTPA. Based on the results of this study, active iron measurements can be a suitable method for predicting iron deficiency in canola plants.

Keywords: Active iron, Available iron, Canola, Extractants, Humic acid.

مقدمه

اغلب خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک آهکی بوده و واکنش‌های قلیایی و فقر موادآلی موجب شده بسیاری از گیاهان زراعی در این خاک‌ها با کمبود عناصرغذایی کم‌مصرف، به‌ویژه آهن و روی روبرو شوند (ابراهیمی و همکاران ۱۳۸٤). خاک‌های آهکی بیش از ۳۱ درصد سطح خشکی‌های زمین را می‌پوشانند (چن و باراک ۱۹۸۲). کلروز ناشی از کمبود آهن در خاک‌های آهکی بسیار شایع است. آهن در سوخت و ساز آنزیم‌ها (به

عنوان فعال کننده آن‌ها) و در متابولیسم پروتئین‌ها (سیتوکروم اکسیداز، لگ‌هموگلوبین، پروتئین‌های Fe-S، فردوکسین) و همچنین آنزیم‌های حاوی آهن مانند نیتروژناز و سوپراکسید دسیموتاز، در ساخت کلروفیل، تکامل کلروپلاست، فتوسنتز، تنفس گیاه، واکنش‌های اکسایش و کاهش و سوخت و ساز اسیدهای آلی (مانند اگزالیک، استیک، مالیک) نقش دارد (هاولین و همکاران ۱۹۹۹، فاجریا ۲۰۱۰، مارشنر ۲۰۱۳). در بین عناصر غذایی کم‌مصرف آهن و روی می‌توانند در کشور ایران بیشترین خسارت را به محصولات کشاورزی وارد کنند؛ به‌طوری که بیش از ۱۱ درصد خاک‌های زراعی ایران کمتر از ٤/٥ میلی‌گرم برکیلوگرم آهن قابل استفاده دارند (شهبازی و بشارتی ۲۰۱۳). کمترین حل-پذیری ترکیب‌های آهن در خاک بین pHهای ۸/٥ -۷/٤ پدید می‌آید. از آنجایی که pH خاک‌های آهکی در این محدوده قرار دارد یکی از علل شیوع کمبود آهن در خاک‌های آهکی را می‌توان همین ویژگی دانست. آهکی بودن خاک‌ها، کاشت گونه‌های حساس، غلظت بالای بی-کربنات و نیترات در خاک و آب آبیاری، حل‌پذیری پایین آهن که عمدتاً به شکل اکسیدهای فریک‌اند، افزایش تراکم کشت محصولات زراعی، کمبود مواد آلی، استفاده بی‌رویه و گسترده از کودهای فسفر و عدم استفاده از کودهای آهن باعث کاهش عملکرد محصول و بروز نشانه‌های کمبود آهن شده است (بنیتز و همکاران ۲۰۰۲، باسیا ۲۰۰۷). میزان آهن کل خاک در بیشتر بررسی‌ها بسیار فراوان‌تر از نیاز گیاه بوده، اما به‌دلیل حل‌پذیری کم ترکیب‌های آهن‌دار در بسیاری از خاک‌ها، جذب آن به خوبی انجام نمی‌شود و سبب آشکار شدن نشانه‌های کمبود آهن در گیاه می‌گردد (لیندسی ۱۹۸٤). اسید هیومیک در اثر تجزیه مواد آلی، به‌ویژه مواد با منشاء گیاهی به‌وجود می‌آید و در خاک، زغال سنگ و پیت یافت می‌شود، اسید هیومیک با جرم مولی ۳۰ تا ۳۰۰ کیلو دالتون باعث تشکیل کمپلکس پایدار محلول و نامحلول با عناصر غذایی کم‌مصرف می‌شود (مکوویک و همکاران ۲۰۰۱). اسیدهای هیومیک جزو شاخه اصلی مواد هیومیکی و از فعال‌ترین اجزای مواد آلی خاک محسوب می‌شوند. از مزایای مهم اسید هیومیک می‌توان به‌توان کی‌لیت کنندگی عناصر غذایی مختلف مانند پتاسیم، منیزیم، روی، کلسیم، آهن، مس و غیره درجهت غلبه بر کمبود آن‌ها اشاره کرد (آیکن و همکاران ۱۹۸٥). کاربرد اسید هیومیک کلروز گیاهان را بهبود می‌بخشد که احتمالاً به‌دلیل توانایی اسید هیومیک در نگهداری آهن خاک به‌شکل قابل جذب می‌باشد. این پدیده می-تواند در خاک‌های قلیایی و آهکی مؤثر باشد که معمولاً کمبود آهن قابل جذب و مواد آلی را دارند (رحی و همکاران ۱۳۹۱). مواد هیومیکی خاک به‌وسیله جلوگیری از ته‌نشینی و رسوب آهن به شکل اکسیدهای آهن، با تشکیل کمپلکس محلول و به‌وسیله افزایش پخشیدگی آهن به سمت ریشه می‌تواند به افزایش فراهمی آهن گیاه کمک نماید (دسانتیاگو و دلگادو ۲۰۰۷). از دیگر مزایای اسید هیومیک می‌توان به افزایش رشد اندام‌های هوایی و محتوای نیتروژن، رفع کلروز برگ‌ها، بهبود جذب عناصرغذایی و سهولت جذب عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، افزایش فعالیت‌های شبه‌هورمونی و افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی اشاره کرد (جهان و همکاران ۱۳۹٤). به روش‌های مختلفی می‌توان به وضعیت تغذیه‌ای آهن در خاک پی‌برد که این روش‌ها شامل اندازه‌گیری غلظت آهن قابل استفاده در خاک و دیگری اندازه‌گیری شاخص‌های گیاهی مثل آهن فعال و آهن کل می‌باشد. هدف اولیه هر عصاره‌گیر شیمیایی ارزیابی مقدار قابل استفاده یک عنصر غذایی برای گیاه است. بنابراین، تعیین عصاره‌گیر مناسب برای خاک‌های مختلف ضروری است. عصاره‌گیرهای متداول آهن در دنیا عبارت هستند: DTPA، AB-DTPA، ۰/٤۳ HNO_3

مولار، EDTA ۰/۰۵ مولار در۷ =pH، H_2SO_4 ۰/۰۱۲۵ مولار + HCl ۰/۰۵ مولار، NH_4OAC ۱ مولار در۴/۸ =pH. پژوهش‌گران مختلف بسته به محل پژوهش، عصاره‌گیرهای متفاوتی را برای استخراج آهن قابل-استفاده گیاه پیشنهاد کرده‌اند. لیندسی و نورول (۱۹۷۸) عصاره‌گیر DTPA را برای استخراج آهن از خاک روش مناسبی اعلام کردند. این عصاره‌گیر با هدف جلوگیری از انحلال زیاد کربنات‌کلسیم و آزاد شدن عناصر غذایی کم‌مصرف محبوس شده یا آمیخته‌شده که به‌طور طبیعی برای جذب توسط گیاه قابل‌دسترس نیست ارائه شده است. دلیل استفاده از DTPA توانایی تشکیل کی‌لیت و تشکیل کمپلکس پایدار با Fe، Zn، Cu و Mn به-طور همزمان است. روش عصاره‌گیری DTPA–NH_4HCO_3 دارای شیمی مناسبی برای عصاره‌گیری همزمان کاتیون‌ها و آنیون‌ها است. سلطان‌پور و شواب (۱۹۷۷) عصاره‌گیر AB-DTPA را برای عصاره‌گیری در خاک‌های قلیایی معرفی کردند. پایداری کمپلکس آهن با DTPA در روش عصاره‌گیری با AB-DTPA در مقایسه با DTPA (لیندسی و نورول ۱۹۷۸) بالاتر است، اگرچه پ‌هاش AB-DTPA به حدود ۸/۵ می‌رسد. روش اگزالات‌آمونیوم به‌صورت گسترده‌ای برای تخمین مقدار Fe، Al در خاک استفاده شده است (شوارتمن ۱۹٦٤، پارفیت و چیلیدز ۱۹۸۸). اما در برخی دیگر از مطالعات از اگزالات‌آمونیوم به‌صورت تنظیم شده در ۳ =pH، برای تعیین آهن قابل‌استفاده گیاه استفاده شده است (دسانتیاگو و دلگادو ۲۰۰٦). در خاک‌های با آهک بالا، اگزالات‌آمونیوم به‌دلیل pH تنظیم‌شده ممکن است آهن بیشتری را عصاره‌گیری کند که دلیل آن افزایش حل-پذیری کربنات‌ها است (دی سانتیاگو و دلگادو ۲۰۰٦). اگزالات‌آمونیوم علاوه بر اکسیدهای کریستالی ضعیف، آهن موجود در کمپلکس‌های آلی را نیز عصاره‌گیری می‌کند (جانسن و همکاران ۲۰۱۱). عصاره‌گیر اگزالات‌آمونیوم سریع طبق نظر بنیتز و همکاران (۲۰۰۲) شاخص آهن قابل‌دسترس مفید در خاک‌های آهکی تلقی می‌شود (به نقل از دی‌سانتیاگو و دلگادو ۲۰۰٦). طبق گزارش دسانتیاگو و دلگادو (۲۰۰٦) و دلکامپیلو و تورنت (۱۹۹۲) اکسیدهای آهن کریستالی ضعیف مانند فری‌هایدرایت، منابع غالب آهن برای گیاهانی هستند که در خاک‌های آهکی رشد می‌کنند. در منابع روش‌های عصاره‌گیری متعددی در رابطه با عناصر غذایی کم-مصرف معرفی شده‌اند، اما تاکنون روش مناسبی که بتواند برای تمام خاک‌ها به ویژه برای عنصر آهن نتایج خوبی ارائه کند، معرفی نشده است. دلیل این امر را می-توان شیمی پیچیده آهن در خاک از جمله شکل‌های متفاوت آهن خاک، ویژگی‌های متفاوت خاک به ویژه کانی‌شناسی و ویژگی‌های متفاوت گیاهان زراعی دانست. به همین دلیل هدف از این تحقیق اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسید هیومیک بر فراهمی آهن در خاک با استفاده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری آهن و مقایسه این عصاره‌گیرها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دراین پژوهش، تأثیر کاربرد خاکی، محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری (کودآبیاری) اسید هیومیک بر فراهمی آهن در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) (رقم هایولا ۳۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و در ٤ تکرار به‌صورت گلدانی به اجرا درآمد. تیمارها شامل کاربرد خاکی اسید هیومیک در۳ سطح (۱، ۲ و ٤ گرم بر کیلوگرم خاک)، محلول‌پاشی اسید هیومیک در ۳ سطح (۰/۱، ۰/۲ و ۰/٤ درصد) و همراه با آب آبیاری در ۳ سطح (۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد (بدون اسید هیومیک) بود. کاربرد خاکی به‌صورت پودر اسید هیومیک و در زمان کشت بر

اساس وزن خاک گلدان‌ها و برای محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری، هریک از سطوح به سه قسمت مساوی تقسیم و در سه مرحله (استقرار گیاه، به ساقه رفتن، شروع گلدهی) مورد استفاده قرار گرفتند. محلول‌پاشی در زمان عصر و برای مؤثرتر بودن آن از چند قطره مویان (شرکت مزرعه پایدار پارسیان ایران) جهت خیس‌خوردگی بیشتر برگ‌ها استفاده شد. اسید هیومیک مورد استفاده در این آزمایش اسید هیومیک ۸۰ درصد (شرکت J.H.BIOTECH، آمریکا) با نام تجاری هیومکس (Humax-95WSG) بود (جدول۱). خاک مورد استفاده از عمق۳۰-۰ سانتی‌متری روستای حاجی‌غراوی در ۳۰ کیلومتری گنبدکاووس برداشته شد. پس از هوا خشک شدن، از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شده و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر بافت خاک (جی و بودر ۱۹۸٦)، کربنات کلسیم معادل به روش خنثی‌سازی با اسید (پیچ و همکاران ۱۹۸۲)، کربنات کلسیم فعال (ACCE) با اگزالات آمونیوم ۹ =pH (دروینیا ۱۹٤۲) pH در عصاره ۱:۲ (جکسون ۱۹۷۳)، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع، ماده آلی (والکی بلاک ۱۹۳٤)، ظرفیت تبادل کاتیونی (چاپمن و پرات ۱۹٦۵)، نیتروژن کل به روش کجلدال (مالوانی و برمنر ۱۹۸۲)، فسفر قابل‌استفاده (اولسن و همکاران ۱۹۵٤)، پتاسیم قابل‌استفاده با استفاده از استات‌آمونیوم (برگ و گاردنر ۱۹۷۸)، اندازه‌گیری شدند (جدول ۲). بر اساس آزمون خاک عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم از منبع‌های اوره (۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن، معادل ۳۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار)، سوپرفسفات‌تریپل (٤۰ کیلوگرم در هکتار فسفر معادل ۱۵۰ کیلوگرم سوپرفسفات تریپل) و سولفات‌پتاسیم (٤۰ کیلوگرم پتاسم در هکتار معادل ۹۰ کیلوگرم سولفات پتاسیم) و عناصر غذایی کم‌مصرف روی (۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سولفات روی) و مس(۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سولفات مس) از منابع سولفات تأمین شدند. مصرف کود پتاسیم و فسفر و عناصر غذایی کم‌مصرف در زمان کاشت گیاه ولی کود نیتروژن در سه قسمت مساوی و در سه مرحله کاشت، به ساقه رفتن و گلدهی به گلدان‌ها اضافه شد. سپس تعداد ۱۰ عدد بذر در هر گلدان در عمق ۲ سانتی‌متری خاک کاشته شد و پس از سبز شدن و گذشت دو هفته، تعداد بوته‌ها به چهار عدد در هر گلدان تقلیل یافت. برای حذف اثرات محیطی در طول دوره رشد جای گلدان‌ها دو بار در هفته به‌صورت تصادفی تغییر داده شد. عملیات آبیاری و وجین علف‌های هرز با دست انجام گرفت. رطوبت خاک گلدان‌ها در طول دوره رشد گیاه در حدود ظرفیت مزرعه به روش وزنی تأمین شد. آنگاه پس از پایان دوره رشد (به مدت ۱۳۹ روز) گیاهان برداشت شدند و شاخساره گیاه به تفکیک اندام (ساقه و برگ) با آب شهری سپس با آب مقطر شسته و روی تورهای پلاستیکی پخش شد تا آب اضافی موجود در سطح آنها حذف شود. سپس نمونه‌ها داخل آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت قرار گرفتند و بعد از آن وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری گردید. هضم نمونه‌های گیاهی با روش خشک سوزانی انجام گرفت (جونز و کیس ۱۹۹۰). غلظت آهن در نمونه‌ها با دستگاه جذب اتمی (AAS-Unicam-919) تعیین شد. شاخص کلروفیل برگ دقیقاً قبل از برداشت در برگ پایینی، برگ میانی و برگ بالایی با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (Hansatech، مدلCL-01) و آهن فعال در برگ‌های تازه گیاه به روش ارتوفنانترولین ۱/۵ درصد (کاتیال و شارما ۱۹۸۰) اندازه‌گیری شدند. برای استخراج آهن از خاک از ٦ روش عصاره‌گیری استفاده شد که در جدول ۳ ارائه شده‌اند. آنالیز آماری مقایسه بین تیمارهای مختلف با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و برای ترسیم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

جدول۱- ویژگی‌های اسیدهیومیک مورد استفاده در پژوهش.

نام تجاری	اسیدفولیک (٪)	K_2O (٪)	اسیدهیومیک (٪)
Humax-95WSG	۱۵	۵	۸۰

جدول۲- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش.

کلاس بافت خاک	کربنات کلسیم فعال (٪)	کربنات کلسیم معادل (٪)	کربن آلی (٪)	آهن قابل استفاده ($mg\ kg^{-1}$)	pH -	هدایت الکتریکی (dSm^{-1})	پتاسیم قابل جذب ($mg\ kg^{-1}$)	فسفر قابل جذب ($mg\ kg^{-1}$)	نیتروژن کل (٪)
سیلتی لوم	۵/۵	۱۵/۵	۱/۰۳	۱/٤٤	۷/۲۳	۱/۱۵	۲۱۹	۱۰/٤۲	۰/۰۵٦

جدول۳- عصاره‌گیرهای آهن مورد استفاده در این مطالعه.

عصاره	ترکیب عصاره‌گیر	نسبت خاک به عصاره‌گیر	زمان به تعادل رسیدن	منابع
DTPA	0.005M DTPA + 0.01 M $CaCl_2$ + 0.1 M TEA (pH=7.3)	۱:۲	۲ساعت	Lindsay and Norvell (1978)
AB-DTPA	0.005 M DTPA + 1 M NH_4HCO_3 (pH=7.6)	۱:۲	۱۵دقیقه	Soltanpour and Schwab (1977)
AC-EDTA	0.01 M EDTA + 1 M $(NH_4)_2CO_3$ (pH=8.6)	۱:۲	۳۰دقیقه	Trierweiler and Lindsay (1969)
EDTA	0.05 M EDTA (pH=7)	۱:۱۰	۱ساعت	Brown and Quick (1971)
اگزالات آمونیوم سریع	$(NH_4)_2\ C_2O_4.H_2O$ (pH=3)	۱:۲۰۰	۲ساعت	Del Campillo and Torrent (1992)
هیدروکسیل آمین	$(NH_2OH*HCl)$	۱:۲۰	۱۷ساعت	Derek and Phillips (1987)

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر کاربرد اسید هیومیک بر آهن قابل استخراج با عصاره‌گیرهای مختلف در جدول ٤ ارائه شده است. مطابق با جدول تجزیه واریانس اثر کاربرد اسید هیومیک بر آهن قابل‌استخراج تمام عصاره‌گیرها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند (جدول ٤). مقایسه میانگین‌های مقدار آهن عصاره‌گیری شده با عصاره‌گیر DTPA[1] نشان داد که بیشترین مقدار مربوط به مصرف اسید هیومیک همراه با آب آبیاری با سطح ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ٦/۳۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کمترین مقدار آن ۳/۳۷ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۵). مطابق با جدول تجزیه واریانس، مقدار آهن استخراج شده توسط عصاره‌گیرهای EDTA[2] و AC-EDTA[3] در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ٤). نتایج مقایسه میانگین‌های مقدار آهن عصاره‌گیری شده با EDTA نشان داد بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده با میانگین ۱۳۰/٦۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به مصرف خاکی با سطح ٤ گرم برکیلوگرم اسید هیومیک و کمترین مقدار با میانگین ۵۰/۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین نتایج مقایسه

1-Diethylene triamine pentaacetic acid

2-Ethylene diamine tetraacetic acid

3-Ammonium carbonate-ethylene diamine tetraacetic acid

میانگین مقدار آهن عصاره‌گیری شده AC-EDTA نشان داد بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده با میانگین ٦/٦٨ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به مصرف خاکی با سطح ٤ گرم برکیلوگرم اسید هیومیک و کمترین مقدار با میانگین ۲/۳۱ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ٥). پژوهش‌گران مختلف بسته به محل پژوهش، عصاره‌گیرهای متفاوتی را برای استخراج آهن قابل‌استفاده گیاه پیشنهاد کرده‌اند. درواقع عصاره‌گیرها فعالیت Fe^{2+} و Fe^{3+} را در خاک‌ها افزایش نمی‌دهند بلکه فقط غلظت آهن کی‌لیت‌شده را زیاد می‌کنند. کی‌لیت‌ها اهمیت زیادی دارند چرا که به دلیل پایداریشان، شیب پخشیدگی زیادی برای کمک به حمل آهن به ریشه ایجاد می‌کنند (امامی و دردی‌پور ۱۳۹۱). نتایج مقایسه میانگین‌های مقدار آهن عصاره‌گیری شده AB-DTPA[٤] نشان داد بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده با میانگین ۱۷/۰۳ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به مصرف خاکی با سطح ٤ گرم برکیلوگرم اسید هیومیک و کمترین مقدار با میانگین ۹/۸۰ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ٥). نتایج مقایسه میانگین‌های مقدار آهن عصاره‌گیری شده با هیدروکسیل آمین هیدروکلراید نشان داد بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده با میانگین ١٤٠/٨٥ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به مصرف خاکی با سطح ٤ گرم برکیلوگرم اسید هیومیک و کمترین مقدار با میانگین ۱۲۱ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین بیشترین میانگین مقدار آهن عصاره‌گیری شده توسط عصاره‌گیر اگزالات آمونیوم سریع مربوط به تیمار مصرف خاکی اسید هیومیک با سطح ٤ گرم برکیلوگرم با میانگین ٨٠٤/٣٧ میلی‌گرم برکیلوگرم و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ٥٣٨/١ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول ٥). در هر سه روش استفاده اسید هیومیک همراه با آب آبیاری، مصرف خاکی و محلول‌پاشی بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده مربوط اگزالات آمونیوم سریع و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره‌گیر AC-EDTA است (جدول ٥). میزان آهن استخراج‌شده توسط عصاره‌گیرهای مختلف به‌ترتیب زیر کاهش یافت: اگزالات آمونیوم سریع> هیدروکسیل آمین هیدروکلراید> AB-DTPA> EDTA > AC-EDTA> DTPA

امامی و دردی‌پور (۱۳۹۱) با بررسی وضعیت آهن در برخی از خاک‌های استان گلستان و ارزیابی عصاره گیرهای رایج برای استخراج آهن قابل‌استفاده درختان هلو از این خاک‌ها دریافتند که روش عصاره‌گیری هیدروکسیل آمین هیدروکلراید بیش‌ترین توانایی را در استخراج آهن از خاک داشت و میزان آهن استخراج شده توسط روش‌های عصاره‌گیرهای مختلف به‌صورت زیر بود: هیدروکسیل آمین هیدروکلراید > AB-DTPA > DTPA > مهلیخ

خلخال و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که روش AC-EDTA کمترین مقدار و اگزالات آمونیوم سریع بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده در خاک‌های آذربایجان شرقی بود و ترتیب مقدار آهن عصاره‌گیری شده به‌صورت زیر بود:

اگزالات آمونیوم سریع>اگزالات آمونیوم مرجع>هیدروکسیل آمین هیدروکلراید >AB-DTPA> AC-EDTA <DTPA

المصطفی و همکاران (۲۰۰۱) در ارزیابی ٥ عصاره گیر در خاک‌های آهکی عربستان سعودی (٤٢ نمونه خاک) برای گیاه سورگوم مقدار آهن قابل عصاره‌گیری را به‌ترتیب زیر گزارش کردند:

AB-DTPA < DTPA < EDTA < NH_4OAc < NH_4OAC+ ۰/۰۲ % هیدروکینون

4-Ammonium bicarbonate diethylene triamine pentaacetic acid

دلیل برتر بودن یک عصاره‌گیر نسبت به دیگر عصاره-گیرها شاید مربوط به سازوکار عصاره‌گیری و همچنین عصاره‌گیری شکل‌های متفاوت آهن توسط این عصاره-گیرها باشد. لیندسی و نورول (۱۹۷۸) بیان داشتند آهن عصاره‌گیری شده با DTPA شامل آهن محلول، تبادلی، پیوند یافته با مواد آلی و بخشی از آهن موجود در ساختمان کانی است.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر کاربرد اسیدهیومیک بر آهن قابل‌استخراج با عصاره‌گیرهای مختلف.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین			مربعات		
		DTPA	EDTA	AC-EDTA	AB-DTPA	هیدروکسیل آمین هیدروکلراید	اگزالات آمونیوم سریع
تیمار	۹	۳/۸٦**	۲٥۰٤/۳**	۷/۷۱۱**	۲۰/٦۲**	۱۳٦/٥٥**	٤۳۳۲۱/۳**
خطا	۳۰	۰/۰۷۰	٥/۸۸	۰/۰٥	۰/۱۷۹	۲/٦۸	۱/۳۰۲
ضریب تغییرات		٥/۷۲	۲/٤۲	٥/٤۲	۳/۲۳	۱/۲٤	۰/۱۷

*، ** و ns به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های آهن قابل‌استخراج با عصاره‌گیرهای مختلف برای اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسیدهیومیک.

عامل آزمایش	DTPA (mg kg^{-1})	EDTA (mg kg^{-1})	AC-EDTA (mg kg^{-1})	AB-DTPA (mg kg^{-1})	هیدروکسیل آمین هیدروکلراید (mg kg^{-1})	اگزالات آمونیوم سریع (mg kg^{-1})
شاهد	۳/۳۷^{f}	٥۰/٥^{e}	۲/۳۱^{g}	۹/۸^{g}	۱۲۱^{e}	٥۳۸/۱۲^{j}
مصرف خاکی						
۱ گرم بر کیلوگرم	٤/۳۸^{d}	٦۰/٤۷^{d}	٤/۰۷^{de}	۱۳/٤٥^{d}	۱۳٦/۲٥^{b}	۷٥۱/۲٥^{d}
۲ گرم بر کیلوگرم	٤/٦٥^{d}	۷۲/٤۲^{c}	٥/۰۳^{c}	۱٤/٦٦^{c}	۱۳۷/٤^{b}	۷۷٥^{b}
٤ گرم بر کیلوگرم	٥/۳٥^{c}	۱۳۰/٦۲^{a}	٦/۸٦^{a}	۱۷/۰۳^{a}	۱٤۰/۸٥^{a}	۸۰٤/۳۷^{a}
مصرف با آبیاری						
۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	٤/٤۷^{d}	٥۷/۱۲^{d}	۳/۹۲^{e}	۱۲/٤۱^{e}	۱۲۸/۲٥^{d}	٦۸۰^{f}
۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	٥/۹٥^{b}	٦۹/۱٥^{d}	٤/۳۰^{d}	۱٤/۳۱^{c}	۱۲۸/٥^{d}	۷۰۰/٦۲^{e}
٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	٦/۳۸^{a}	۸۹/۷٥^{b}	٥/۷۳^{b}	۱٥/٤۲^{b}	۱۳۷^{b}	۷٥۹/۳۷^{c}
محلول‌پاشی						
۰/۱ درصد	۳/۸۰^{e}	٥۱/۲۷^{e}	۳/۰٤^{f}	۱۱^{f}	۱۲۹/٥^{cd}	٥٤۸/۱۲^{i}
۰/۲ درصد	۳/۹۰^{e}	٥۲/۳٥^{e}	۳/۱۱^{f}	۱۱/۳۷^{f}	۱۳۰^{cd}	٥٦٥/٦۲^{h}
۰/٤ درصد	۳/۹٤^{e}	٥۳^{e}	۳/۸^{f}	۱۱/٤۱^{f}	۱۳۱/٥^{c}	٥۷۱/۸۷^{g}

در هر ستون برای هر عامل، حروف لاتین مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشد.

DTPA و AB-DTPA هر دو از دسته کلات کننده‌ها هستند و با سازوکار مشابه‌ای آهن را از خاک استخراج می‌کنند. پایاپرز و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که عصاره‌گیر EDTA توانایی استخراج عناصر غذایی کم‌مصرف پیوند شده با مواد آلی، اکسیدها و بخش هایی از عناصر موجود در کانی‌های رسی را دارد. همر

و کلر (۲۰۰۲) گزارش کردند که عصاره‌گیر EDTA بدون توجه به ویژگی‌های خاک به‌دلیل داشتن pH کمتر نسبت به عصاره گیر DTPA مقدار بیشتری از عناصر غذایی کم‌مصرف خاک را عصاره‌گیری می‌کند. هیدروکسیل آمین هیدروکلراید اکسید آهن آمورف را با سازوکار احیاء استخراج می‌کند. دسانتیاگو و دلگادو (۲۰۰٦) بیان داشتند که یکی از دلایل این‌که روش‌های اگزالات آمونیوم سریع، اگزالات آمونیوم مرجع و هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، آهن بیشتری را عصاره‌گیری می‌کنند به pH اسیدی این عصاره‌گیرها مربوط می‌باشد. در خاک‌های آهکی، ممکن است اگزالات آمونیوم به‌دلیل pH اسیدی آن، با انحلال کربنات‌ها آهن بیشتری را عصاره‌گیری کند. شاهانده و همکاران (۱۹۹٤) گزارش کردند که اگزالات آمونیوم بیشترین مقدار آهن را عصاره‌گیری کرد چون خاک‌های مورد استفاده آنان دارای مقادیر زیادی (حدود ٦۰ درصد) اکسیدهای آهن بلورین ناقص بودند که مؤثرترین شکل آهن قابل عصاره‌گیری است. طبق گزارش دی‌سانتیاگو و همکاران (۲۰۰۸) و دلکامپیلو و تورنت (۱۹۹۲) اکسیدهای آهن بلورین ناقص مانند فری‌هایدرایت، منابع غالب آهن برای گیاهانی هستند که در خاک‌های آهکی رشد می‌کنند (المصطفی و همکاران ۲۰۰۱).

نتایج تجزیه واریانس اثر کاربرد اسید هیومیک بر شاخص کلروفیل (SPAD)، آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال در گیاه کلزا در جدول ٦ ارائه شده است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد سطوح مختلف اسید هیومیک شاخص کلروفیل (SPAD) برگ پایینی، برگ میانی و برگ بالایی را به طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۱$) افزایش داد (جدول ٦).

جدول۶- تجزیه واریانس اثر کاربرد اسید هیومیک بر شاخص کلروفیل، آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین			مربعات		
		شاخص کلروفیل برگ پایینی	شاخص کلروفیل برگ میانی	شاخص کلروفیل برگ بالایی	مقدار آهن برگ	مقدار آهن ساقه	آهن فعال
تیمار	۹	٦۳/۹۰**	۲۲/۲۰**	۱٤/۹۰**	٤۳۹۰/۸**	۳۱٦/۷۷**	۲۱٤/٦٤**
خطا	۳۰	٦/٤۹۷	٥/۲۸۸	۲/۹۲	۰/۳۳۹	۳/۰۳۷	۰/۸
ضریب تغییرات		۹/۰۹	٦/۷٦	٤/٤۸	۰/۳۰۲	۲/٥۱	۲/٤٦

*، ** و ns به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد و عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

بیشترین شاخص کلروفیل (SPAD) برگ پایینی مربوط به تیمار مصرف همراه با آب آبیاری با سطح ٤۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۳٦/٤٥ و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۲۳/۳٥ بود. بین تیمار شاهد با تیمار ۱ گرم بر کیلوگرم مصرف خاکی و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسید هیومیک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۷). کلروفیل رنگدانه اصلی جذب نور و فتوسنتز است. موادی نظیر فسفر، نیتروژن، پتاسیم و آهن در تشکیل کلروفیل استفاده می‌شوند که مصرف اسید هیومیک موجب فراهمی بیشتر این عناصر برای گیاه می‌گردد (خرم قهفرخی و همکاران ۱۳۹٤). اسیدهیومیک از طریق قدرت کی‌لیت‌کنندگی عناصر غذایی و با کاهش تبخیر و تعرق و در نتیجه قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب‌تر در اختیار گیاه می‌تواند ساخت رنگیزه‌ها را افزایش دهد و انتقال مواد فتوسنتزی را در گیاه راحت‌تر کند (ناسوتی میاندواب و همکاران ۱۳۸۹). اسکارف و همکاران (۲۰۰٦) نشان دادند که از مقادیر شاخص کلروفیل می‌توان برای تعیین غلظت آهن و همچنین قابلیت دسترسی به آهن در

گیاه سویا استفاده نمود. نتایج مقایسه میانگین شاخص کلروفیل (SPAD) برگ میانی نشان داد که بیشترین مقدار با میانگین ۳۸/۰۷ مربوط به تیمار ٤۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مصرف همراه با آب آبیاری بود هرچند که با تیمارهای ٤ گرم برکیلوگرم مصرف خاکی و ۰/٤ درصد محلول‌پاشی اسید هیومیک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار با میانگین ۳۰/۸۲ مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین شاخص کلروفیل (SPAD) برگ بالایی نشان داد که بیشترین مقدار با میانگین ٤۰/۹۷ مربوط به تیمار ٤ گرم برکیلوگرم مصرف خاکی اسید هیومیک که با تیمارهای ۲ گرم برکیلوگرم مصرف خاکی و ٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسید هیومیک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار با میانگین ۳۵/۸۲ مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۷). تأثیرات مثبت اسید هیومیک بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و افزایش مقدار رنگیزه‌های کلروفیل تأیید شده است. اسید هیومیک با قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب‌تر در اختیار گیاه ساخت کلروفیل را افزایش می‌دهد و انتقال مواد فتوسنتزی را راحت‌تر می‌کند (دلفاین و همکاران ۲۰۰۵). سلمان و ابوحسین (۲۰۰۵) نیز بیان داشتند که مواد هیومیکی در فرآیندهای بیولوژیکی گیاه مانند فتوسنتز و مقدار کلروفیل کل مؤثر هستند. ابوعلی و مادی (۲۰۰۹) گزارش کردند که در اثر کاربرد اسید هیومیک در گیاه گندم کلروفیل a ۳۳ تا ۳۸/٦ درصد و کلروفیل b ۱۰/۵۳ تا ۲۷/۸ درصد افزایش یافت. سبزواری و خزاعی (۱۳۸۷) نشان دادند که اسید هیومیک باعث افزایش معنی‌داری در عدد کلروفیل‌متر در سطح احتمال ٥ درصد در گیاهان گندم شد. در آزمایش دیگری، محلول‌پاشی اسید هیومیک موجب افزایش کلروفیل در برگ‌های گندم شده است (زودان ۱۹۸٦). ال‌بسیونی و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که محلول‌پاشی اسید هیومیک در لوبیا سبب افزایش پروتئین و کلروفیل در گیاه از طریق افزایش سرعت و میزان جذب موادغذایی شد. ناردی و همکاران (۲۰۰۲) دریافتند که اسید هیومیک باعث زیاد شدن غلظت کلروفیل برگ، آغازش ریشه‌های جانبی بیشتر، بهبود جذب عناصر غذایی کم‌مصرف شد. در مطالعه‌ای که بر روی اثرات مواد هومیکی بر جذب عناصر توسط خیار انجام شد، معلوم شد که مواد هومیکی سبب افزایش جذب آهن، روی، مس و منگنز می‌شود که می‌توان گفت که افزایش جذب آهن و منگنز سبب افزایش کلروفیل می‌شود (راتان و اسنیتزر ۱۹۸٦). آستارایی و ایوانی (۲۰۰۸) افزایش مقدار سطح برگ و تولید مقدار کلروفیل بیشتر دربرگ‌های گیاه لوبیا را در طی استفاده از تیمار اسید هیومیک گزارش کردند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که روش کاربرد و سطوح مختلف اسید هیومیک، غلظت آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال را به طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۱) نسبت به شاهد افزایش داد (جدول٦). بیشترین مقدار آهن برگ در تیمار ۰/٤ درصد با میانگین ۲٤٥/٤٦ میلی-گرم برکیلوگرم مربوط به روش محلول‌پاشی اسید هیومیک و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۱۲۰/۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بود. همچنین بیشترین مقدار آهن ساقه در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۸۵ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به روش مصرف همراه با آب آبیاری اسید هیومیک و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ٥٤/٦۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول۷). کاربرد اسید هیومیک کلروز گیاهان را بهبود می‌بخشد که احتمالا نتیجه‌ای است از توانایی اسید هیومیک برای نگهداری آهن خاک به فرمی که قابل جذب و سوخت وساز باشد. این پدیده می‌تواند در خاک‌های قلیایی وآهکی مؤثر باشد که معمولاً کمبود آهن قابل جذب و مواد آلی را دارند (رحی و همکاران

۲۰۱۲). آنتونیو و همکاران (۲۰۰٦) بهبود جذب آهن را به‌وسیله افزودن مواد هیومیکی گزارش کردند. آنها نشان دادند کاربرد همزمان ترکیب‌های آلی و کلات سکوسترین، تغذیه آهن را در گیاه انگور به خوبی بهبود می‌بخشد. رفعتی (۱۳۸۳) اثر مثبت برهمکنش آهن و ماده آلی بر غلظت آهن در گیاه سورگوم را گزارش کرده است. وطن خواه و همکاران (۱۳۹٤) گزارش کردند که افزایش انباشت آهن توسط ترکیبات هیومیکی را می‌توان ناشی از آزاد کردن مواد فنولی در ریزوسفر ریشه و بهبود احیاء و جذب بیشتر آهن در اثر کاربرد این مواد دانست. مصرف اسید هیومیک در خاک فعالیت آنزیمی و فتوسنتز را تحریک می‌کند و تحریک زردی یا کلروز را در گیاه با بهبود بخشیدن به جذب منیزیم و آهن توسط گیاهان به تأخیر می‌اندازد (سنجری میجانی و همکاران ۱۳۹٤).

بیشترین مقدار آهن فعال در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ٤٤/۸٦ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به روش مصرف همراه با آب آبیاری اسید هیومیک و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۲۰/٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول ۷). آهن فعال جزئی از آهن کل برگ است که به‌وسیله اسید کلریدریک یک نرمال از پودر برگ خشک قابل‌استخراج باشد، تعریف می‌شود، زیرا تمام آهن جذب شده به‌وسیله گیاهان انتقال داده نمی‌شود، به‌علاوه تمامی آهن انتقال‌یافته به ترکیبات آلی تبدیل نشده و به‌وسیله سلول‌های برگ جذب نمی‌شود، بنابراین در برخی موارد آهن کل گیاه معیاری از حالت تغذیه‌ای گیاه نیست (جامز ۱۹۸٤). حتی گاهی برگ‌های کلروزه غلظت آهن بیشتری در مقایسه با برگ‌های سبز دارند (ماتوکا و پنینگتون ۱۹۸۲). گیاهانی که دچار زرد برگی آهن هستند چون قادر به تولید کلروفیل کافی نیستند زردی مشخصی روی برگ‌های جوان آن‌ها ظاهر می‌شود. این گیاهان به دلیل نداشتن کلروفیل کافی عمل فتوسنتز را به‌طور کامل انجام نداده و در نتیجه رشد و عملکرد آنها کاهش می‌یابد (میلر و همکاران ۱۹۸٤). آهن فعال در ساخت پروتوپورفیرین آی‌ایکس مادهٔ سازنده کلروفیل است، نقش اساسی دارد و مشخص شده Fe^{2+} مسئول تشکیل کلروفیل است (فوی و همکاران ۱۹۸۱، بارآکیوا ۱۹۸٦). اثرات مفید مواد هومیکی با قابلیت‌های آن‌ها به‌وسیله فعالیت‌هایی نظیر آزادسازی الکترون‌ها و مداخله در زنجیره تنفسی سلول و نیز افزایش منبع انرژی برای سلول‌ها توجیه می‌شود. این تبدیل ظرفیت برای جذب آهن مفید می‌باشد. زیرا گیاهان در شرایط نبود سبزینگی، از خود به طور مداوم مواد فنولی را ترشح می‌کنند تا Fe^{3+} به Fe^{2+} محلول تبدیل شود. غلظت ترکیبات فنولی اکسیژن‌دار در مواد هیومیکی از ۵۷۰-۲۱۰ میلی‌اکی‌والان در یک صد گرم برای اسید هیومیک متغیر می‌باشد (سانچز سانچز ۲۰۰۲). مواد هومیکی خاک به‌وسیله جلوگیری از ته‌نشینی و رسوب آهن به شکل اکسیدهای آهن، با تشکیل کمپلکس محلول و به‌وسیله افزایش پخشیدگی آهن به سمت ریشه می‌تواند به افزایش فراهمی آهن گیاه کمک می‌نماید (دسانتیاگو و دلگادو ۲۰۰۷). دلیل اینکه فراهمی عناصر کم مصرف با افزایش ماده آلی افزایش می‌یابد این است که ماده آلی باعث بهبود تهویه خاک، بروز شرایط احیاء، تولید اسیدها و عرضه عوامل کی‌لیت کننده می‌شود(مهاشهابد و پاتهل ۲۰۱۲، لیندسی ۱۹۹۱) اما مهمترین تأثیری که مواد آلی روی انحلال پذیری آهن دارد در توانایی احیاء است. تجزیه مواد آلی باعث احیای مکانهای ریز خاک و در نتیجه افزایش فراهمی آهن برای گیاهان می‌شود (لیندسی ۱۹۹۱). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ترکیب-های آلی نقش مهمی در فراهمی آهن گیاه دارند، مواد هیومیکی با تشکیل کمپلکس‌های آلی محلول از رسوب

اکسیدهای آهن جلوگیری کرده و موجب افزایش پخشیدگی آهن به سمت ریشه گیاه می‌شوند. کمبود عناصری مثل آهن، روی و مس در خاک‌های قلیایی بسیار شایع است که دلیل آن تشکیل کمپلکس‌های نامحلول این عناصر در چنین شرایطی می‌باشد. اسید هیومیک علاوه بر اینکه خود منبع غنی از عناصر غذایی کم‌مصرف است، به آزاد سازی و جذب بهتر عناصر تثبیت شده نیز کمک می‌کند (هاکان و همکاران ۲۰۱۱). درسن و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که مواد هیومیک از طریق اثرات بیوشیمیایی و شبه‌هورمونی که دارند باعث افزایش جذب ریزمغذی‌ها توسط گیاهان می‌شوند. بسیاری از محققان (شارما و همکاران ۲۰۰٤، آماری و منگل ۲۰۰٦، وانگ و همکاران ۲۰۰۹) ارتباط بین فراهمی عناصر غذایی کم‌مصرف ویژگی‌های اصلی خاک را مطالعه و نتیجه گرفتند که pH و ماده آلی مهمترین ویژگی‌های کنترل کننده فراهمی عناصر غذایی کم‌مصرف هستند.

جدول ۷- مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ و آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال برای اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسیدهیومیک.

عامل آزمایش	شاخص کلروفیل برگ پایینی	شاخص کلروفیل برگ میانی	شاخص کلروفیل برگ بالایی	آهن کل برگ ($mg\ kg^{-1}$)	آهن کل ساقه ($mg\ kg^{-1}$)	آهن فعال ($mg\ kg^{-1}$)
شاهد	۲۳/۳٥^{e}	۳۰/۸۲^{d}	۳٥/۸۲^{d}	۱۲۰/٥۰^{J}	٥٤/٦۲^{f}	۲۰/٤۰^{i}
مصرف خاکی						
۱ گرم بر کیلوگرم	۲۳/٤۰^{e}	۳۲/٥۲^{cd}	۳۷/۰۷^{cd}	۱۷٥/٥۲^{i}	٦۳/۲٥^{e}	۳۰/٤۰^{h}
۲ گرم بر کیلوگرم	۲۸/۱٥^{dc}	۳٤/٥۷^{cb}	٤۰/۸۲^{a}	۱۸۰/٥4^{h}	۷۳/۱۲^{c}	۳۲/۱۷^{g}
٤ گرم بر کیلوگرم	۳۲/٤٥^{b}	۳٦/۷۰^{ab}	٤۰/۹۷^{a}	۱۹۲/۳۱^{f}	۷۸/۲٥^{b}	۳۸/٥۸^{d}
مصرف با آبیاری						
۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۲٥/۲۰^{de}	۳۰/۸۲^{d}	۳٥/۸۲^{d}	۱۸٥/۰۷^{g}	٦۲/۷٥^{e}	۳٦/٤۳^{e}
۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۲۷/٥۰^{dc}	۳۳/٥۰^{cd}	۳۷/۰۷^{cd}	۲۰٤/٦۱^{c}	۸٥^{a}	٤٤/۸٦^{a}
٤۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۳٦/٤٥^{a}	۳۸/۰۷^{a}	٤۰/۳٥^{ab}	۱۹۳/٥۰^{e}	٦۸/۰٤^{d}	٤۳^{b}
محلول‌پاشی						
۰/۱ درصد	۲۷/۱٥^{dc}	۳۳/۰٥^{cd}	۳۷/۷۷^{cd}	۲۰۱/٤۹^{d}	٦۳/۱۲^{e}	۳٤/٦٥^{f}
۰/۲ درصد	۲۷/٦۷^{dc}	۳٤/۷۰^{cb}	۳۸/۳۲^{cb}	۲۲٦/٦۲^{b}	٦۹/٥۳^{d}	٤۰/۳۲^{c}
۰/٤ درصد	۲۷/۱٥^{dc}	۳۳/۰٥^{cd}	۳۷/۷۷^{cd}	۲٤٥/٤٦^{a}	٦۳/۱۲^{e}	۳٤/٦٥^{f}

در هر ستون برای هر عامل، حروف لاتین مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشد.

همبستگی آهن استخراج شده به‌وسیله عصاره‌گیرها مختلف و شاخص‌های گیاهی

ایجاد ارتباط بین یک عنصرغذایی که به‌وسیله یک محلول عصاره‌گیر از خاک استخراج می‌شود، با مقدار جذب آن عنصر به‌وسیله گیاه، یکی از مراحل اصلی آزمون خاک بوده و همبستگی نامیده می‌شود. ارزش هر عصاره‌گیر بستگی به همبستگی بین مقدار عنصر عصاره‌گیری شده با مقدار عنصر جذب شده توسط گیاه دارد، درواقع عصاره‌گیر مناسب، محلولی است که بالاترین ضریب همبستگی را با آهن جذب شده توسط گیاه و سایر پاسخ‌های گیاهی نشان دهد. نتایج مربوط

به همبستگی بین آهن استخراج شده توسط عصاره-گیرهای مختلف با شاخص کلروفیل برگ، آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال در جدول‌های ۸ و ۹ آورده شده است. نتایج نشان داد که بین آهن استخراج شده توسط عصاره‌گیر DTPA با عصاره‌گیرهای AB-DTPA و EDTA با r = ۰/۸۳ و AC- EDTA با r = ۰/۷۷ همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح یک درصد و همچنین با هیدروکسیل آمین هیدروکلراید و اگزالات آمونیوم با r = ۰/۷٤ همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد داشت (جدول ۸). آل مصطفی و همکاران (۲۰۰۱) در خاک‌های آهکی عربستان، امامی و دردی پور (۱۳۹۱) در خاک‌های گلستان و خلخال و همکاران (۱۳۹۵) در خاک‌های آذربایجان شرقی بین DTPA و AB-DTPAهمبستگی معنی‌داری گزارش کردند. در واقع این دو عصاره‌گیر که هر دو از دسته کی‌لیت کننده‌ها هستند با مکانیزم مشابه‌ای آهن را از خاک استخراج می‌کنند. آبادیها و همکاران (۱۹۸۰) نشان دادند که اگرچه AB-DTPA مقادیر بیشتری آهن را عصاره‌گیری می‌کند اما در همین حال با DTPA همبستگی خوبی دارد. همچنین در مطالعه ومپاتی و لوئپرت (۱۹۸۸) بین میزان آهن استخراج شده با روش DTPA و مقدار آهن استخراج شده با روش اگزالات آمونیوم (احیاکننده آهن آمورف) همبستگی بالایی مشاهده شد. آن‌ها نتیجه گرفتند اکسیدهای آهن آمورف منابع غالب آهن لابایل استخراج شده توسط DTPA از خاک‌های تگزاس هستند بین مقدار آهن استخراج شده توسط عصاره‌گیر EDTA با تمام عصاره‌گیرها همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهد شد و بیشترین همبستگی را با عصاره‌گیر AC- EDTA با r = ۰/۹۵ داشت (جدول ۸). بین مقدار آهن استخراج شده توسط عصاره‌گیر AC-EDTA با تمام عصاره‌گیرها همبستگی مثبت و معنی-داری در سطح یک درصد مشاهد شد و بیشترین همبستگی را با عصاره‌گیر AB-DTPA با r = ۰/۹٦ داشت (جدول ۸). بین مقدار آهن استخراج شده توسط عصاره‌گیر هیدروکسیل آمین هیدروکلرید با تمام عصاره‌گیرها همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهد شد و بیشترین همبستگی را با عصاره-گیر اگزالات آمونیوم با r = ۰/۹۳ داشت (جدول ۸). دی سانتیاگو و دلگادو (۲۰۰٦) نیز همبستگی معنی‌دار بالایی بین روش اگزالات آمونیوم سریع با روش اگزالات آمونیوم مرجع و DTPA گزارش کردند. از آنجایی که از آهن عصاره‌گیری شده با اگزالات آمونیوم به عنوان معیاری برای برآورد اکسیدهای آهن بی‌شکل استفاده می‌شود، احتمالاً اکسیدهای آهن بی‌شکل منبع عمده آهن عصاره‌گیری شده به‌وسیله DTPA از خاک ها می‌باشند

جدول۸ – همبستگی بین مقادیر آهن عصاره گیری شده با عصاره گیرهای مختلف.

	عصاره گیرها	۱	۲	۳	٤	٥	٦
۱	DTPA	۱					
۲	EDTA	۰/۸۳**	۱				
۳	AC- EDTA	۰/۷۷**	۰/۹٥**	۱			
٤	AB- DTPA	۰/۸۳**	۰/۹٤**	۰/۹٦**	۱		
٥	هیدروکسیل آمین	۰/۷٤*	۰/۸۰**	۰/۸٦**	۰/۸۲**	۱	
٦	اگزالات آمونیوم	۰/۷٤*	۰/۸٤**	۰/۸۷**	۰/۹۳**	۰/۸۰**	۱

*، ** و ns به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

(بارانی مطلق و توفیقی ۱۳۸۹). آهن عصاره‌گیری شده توسط AB-DTPA، DTPA و EDTA درخاک‌های آهکی عربستان دارای همبستگی معنی‌داری با آهن بی‌شکل، آهن کریستالی ضعیف بود، به عبارت دیگر در آن خاک‌ها این سه عصاره‌گیر غالباً آهن را از اکسیدهای آهن کریستالی ضعیف و اکسیدهای آهن بی‌شکل عصاره‌گیری کرده‌اند که طبق گزارش دی‌سانتیاگو و همکاران (۲۰۰۸) و دلکامپیلو و تورنت (۱۹۹۲) اکسیدهای آهن کریستالی ضعیف مانند فری‌هایدرایت، منابع غالب آهن برای گیاهانی هستند که در خاک‌های آهکی رشد می‌کنند (المصطفی و همکاران ۲۰۰۱).

جدول۹ – همبستگی بین مقادیر آهن عصاره‌گیری شده با شاخص کلروفیل برگ و آهن کل برگ و ساقه و آهن فعال.

عصاره‌گیرها	شاخص کلروفیل برگ پایینی	شاخص کلروفیل برگ میانی	شاخص کلروفیل برگ بالایی	آهن کل برگ	آهن کل ساقه	آهن فعال
DTPA	۰/۷۵*	۰/۶۸*	۰/۴۹ns	۰/۳۵ns	۰/۶۹*	۰/۷۹**
EDTA	۰/۷۴*	۰/۷۲*	۰/۷۹**	−۰/۰۶ns	۰/۴۸ns	۰/۳۶ns
AC-EDTA	۰/۷۳*	۰/۷۲*	۰/۷۹**	۰/۱۵ns	۰/۵۶ns	۰/۴۴ns
AB-DTPA	۰/۶۲ns	۰/۶۴*	۰/۷۵*	۰/۰۹ns	۰/۶ns	۰/۴۳ns
هیدروکسیل آمین	۰/۵۳ns	۰/۶۹*	۰/۸۴**	۰/۰۶ns	۰/۳۱ns	۰/۱۵ns
اگزالات آمونیوم	۰/۴۲ns	۰/۴۳ns	۰/۶۲ns	−۰/۰۸ns	۰/۴۱ns	۰/۲۲ns

*، ** و ns به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی کاربرد اسید هیومیک می‌تواند باعث افزایش فراهمی آهن در گیاه شود. نتایج نشان داد روش‌های مصرف خاکی، محلول‌پاشی و مصرف همراه آب آبیاری نسبت به شاهد، سبب افزایش فراهمی آهن در گیاه کلزا می‌شود. بیشترین آهن کل در برگ با میانگین ۲۴۵/۵ مربوط به تیمار ۰/۴ درصد محلول‌پاشی اسید هیومیک و بیشترین آهن کل در ساقه و آهن فعال به‌ترتیب با میانگین ۸۵ و ۴۴/۹ مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مصرف همراه با آب آبیاری اسید هیومیک بود. همچنین بیشترین مقدار آهن عصاره‌گیری شده تحت تأثیر نحوه کاربرد و سطوح مختلف اسید هیومیک مربوط به عصاره‌گیر اگزالات آمونیوم مرجع و کمترین مقدار آن با عصاره‌گیر AC-EDTA استخراج شد. تنها همبستگی بین DTPA با آهن کل ساقه و آهن فعال معنی‌دار شد و بین این عصاره‌گیر و غلظت کل آهن برگ همبستگی ضعیف و غیرمعنی‌دار مشاهده گردید. آهن فعال می‌تواند یک روش مناسب برای تشخیص کمبود آهن در گیاه کلزا باشد.

منابع مورد استفاده

Abadia J, Millan E., Montanes L and Heras L, 1980. DTPA and NH_4HCO_3-DTPA extractable Fe, Mn and Zn levels in the Ebro Valley. Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei 15(1): 181-193.

Abou-Aly HE and Mady MA, 2009. Complemented effect of humic acid and biofertilizers on wheat (*Triticum aestivum* L.) productivity. Annals of Agricultur Science Moshtohor 47(1): 1-12.

Adiloglu A, 2006. Determination of suitable chemical extraction methods for the available iron content of brown forest soils in Turkey. Eurasian Soil Science 39(9): 961-967.

Aiken GR, McKnight DM, Wershaw RL and MacCarthy P, 1985. Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization. Wiley-Interscience publication.

Al-Mustafa W, Abdallah A and Falatah A, 2001. Assessment of five extractants for their ability to predict iron uptake and response of sorghum grown in calcareous soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis 32(5-6): 907-919.

Ammari TG and Mengel K, 2006. Total soluble Fe in soil solutions of chemically different soils. Geoderma 136: 876–885.

Antonio SS, Jua SA, Margarita J, Juana J and Dolores B, 2006. Improvement of iron uptake in table Grapeby addition of humic substances. Journal of Plant Nutrition 30(1): 1-7.

Astaraei AR and Ivani R, 2008. Effect of organic sources as foliar spray and root madia on nutrition in cowpea plant. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 3: 352-356.

Baissa T, Suwanarit A, Ososapar Y and Sarobol E, 2007. Status of Mn, Fe, Cu, Zn, B and Mo in Rift valley soils of Ethiopia: Laboratory assessment. Kasetsart Journal (Natural Science) 41(1): 84-95.

Bar-Akiva A, 1986. Induced formation of enzymes as a possible measure of micronutrient requirement of citrus trees. Control de la Fertilizacion de lad Plantas Cultivadas; CEBAC: Sevilla, Spain 573–581.

Barani Motlagh M and Towfighi H, 2010. Comparison of kinetic equations to describe the release of iron from some calcareous soils. Iranian Journal of Soil and Water Research 1(40): 43-50. (In Persian with English Abbstract)

Benítez M, Pedrajas V, Del Campillo M and Torrent J, 2002. Iron chlorosis in olive in relation to soil properties. Nutrient Cycling in Agroecosystems 62(1): 47-52.

Berg Marlene G and Hugh Gardner E, 1978. Methods of soil analysis used in the soil testing laboratory at Oregon State University. Corvallis, Or. Agricultural Experiment Station, Oregon State University, 89:4.16.

Bremner JM and Mulvaney CS, 1982. Nitrogen—total. Pp. 595-624. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (Eds). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Brown AL, Quick J and Eddings JL, 1971. A comparison of analytical methods for soil zinc. Soil Science Society America Proceedings 35: 105- 107.

Chapman HD, 1965. Cation exchange capacity. Pp891- 901. In: Black CA (ed), Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society of Agronomy. Madison, WI.

Chen Y and Barak P, 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. Advance in Agronomy 35 (628): 217-240.

De Santiago A and Delgado A, 2006. Predicting iron chlorosis of lupin in calcareous Spanish soils from iron extracts. Soil Science Society of America Journal 70(6): 1945-1950.

De Santiago A and Delgado A, 2007. Effects of humic substances on iron nutrition of lupin. Biology and Fertility of Soils 43:829–836.

De Santiago A, Díaz I, Del Campillo MC, Torrent J and Delgado A, 2008. Predicting the incidence of iron deficiency chlorosis from hydroxylamine-extractable iron in soil. Soil Science Society of America Journal 72(5): 1493-1499.

Del Campillo MC and Torrent J, 1992. A rapid acid-oxalate extraction procedure for the determination of active Fe-oxide forms in calcareous soils. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 155(5): 437-440.

Delfine S, Tognetti R, Desiderio E and Alvino A, 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. Agronomy for Sustainable Development 25: 183-191.

Derek R and Phillips JP, 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. Applied and Environmental Microbiology 53 (7): 1536-1540.

Drouineau G, 1942. Dosage rapide du calcaire actife du sol; Nouvelles donnees sur la separation et la nature des fractions calcaires. Annuals of Agronomy 12: 441-450.

Dursun A, Guvenc I and Turan M, 2002. Effect of different levels of humic acid on seedling growth and macro and micronutrient contents of tomato and eggplant. Acta Agrobotanical 56: 81-88.

Ebrahimi S, Bahrami HA, Homaei M and Malakoti MJ, 2005. The role of organic matter in increasing the soil fertility level. High Council for Policy Development of Application of Biological Materials and Optimal Use of Fertilizer and Poison in Agriculture. Technical Journal No. 401. (In Persian with English Abbstract)

El-Bassiony AM, Fawzy ZF, Abd El-Baky MMH and Mahmoud Asmaa R, 2010. Response of snap bean plants to mineral fertilizers and humic acid application. Research Agricultural and Biological Science 6(2): 169-175.

Emami M and Dordipour E, 2012. Selection of suitable extractant to extract available iron in peach in soils of Golestan Province. Journal of Soil Managmenet and Sustainable Production 2(2): 89-103. (In Persian with English Abbstract)

Fageria NK, 2010. The use of nutrients in crop plants, CRC Press.

Foy CD, Fleming AL and Schwortz JW, 1981. Differential resistance of weeping love grass genotypes to iron related chlorosis. Journal of Plant Nutrition 3: 537-550.

Gee GH and Bauder JW, 1986. Particle size analysis, Pp. 383-409. In: Klute A, (Ed), Methods of Soil Analysis. Part 2, Physical properties. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Hakan C, Vahap Katkat A, Bulent Asık B and Turan MA, 2011. Effect of foliar applied humic acid to dry weight and mineral nutrient uptake of maize under calcareous soil conditions. Communications in Soil Science and Plant Analysis 42(1): 29 – 38.

Hammer D and Keller C, 2002. Changes in the rhizosphere of metal accumulating plants evidenced by chemical extractants. Journal of Environmental Quality 31: 1561-1569.

Havlin J, Beaton JD, Tisdale SL and Nelson WL, 1999. Soil Fertility and Fertilizers, 6 Ed. Soil Science Society of America. Madison, WI.

Jackosn ML, 1973. Soil Chemical Analysis. Prentice Halla of India Private Limited. New Delhi, India.

Jahan M, Ghale Nui Sh, Khamoshi A and Amiri MB, 2015. Investigation of basal eagroacological features (*Ocimum basilicum L.*) under the influence of superabsorbent application of moisture, ecosystems and irrigation periods. Journal of Horticulture 29(2): 240-254.

James DW, 1984. General summary of the second international symposium on iron nutrition and interaction in plants. Journal of Plant Nutrition 7: 859-864.

Jansen B, Tonneijck FH and Verstraten JM, 2011. Selective extraction methods for aluminium, iron and organic carbon from Montane volcanic ash soils. Pedosphere 21(5): 549–565.

Jones Jr JB and Case VW, 1990. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. Pp. 389-427. In: Westerman RL, (Ed), Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Katyal JC and Sharma BD, 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis. Plant and Soil 55(1): 105-119.

Khalkhal K, Reyhanitabar A and Najafi N, 2015. Evaluation of extraction methods for determination of iron usable use of maize in calcareous soils of East Azarbaijan Province. Iranian Journal of Water and Soil Research 47(2): 427-437. (In Persian with English Abbstract)

Khoram Ghahfarokhi A, Rahimi A, Torabi B and Maddah Hosseini Sh. 2015. Effect of humic acid application and foliar spraying of compost tea and vermiwash on nutrient absorption and chlorophyll content of safflower (*Carthamus tinctorius L.*). Journal of Oil Plants Production 2 (1): 71-84. (In Persian with English Abbstract)

Lindsay WL, 1984. Soil and plant relationships associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. Journal of Plant Nutrition 7(1-5): 489-500.

Lindsay WL, 1991. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. Pp. 29-36. In: Chen Y and Hadar Y (Eds). Iron Nutrition and Interactions in Plants. Kluwer Academic Publishers.

Lindsay WL and Norvell WA, 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42(3): 421-428.

Maccarthy P, 2001. The principles of humic substances. Soil Science 166(11): 738-751.

Mahashabde JP and Patel S, 2012. DTPA-Extractable micronutrients and fertilitystatus of soil in shirpur Tahasil region. International Journal of ChemTech Research 4(4): 1681-1685.

Malakouti MJ, Keshavarz P and Karimian NA, 2008. A comprehensive approach towards identification nutrients deficiencies and optimal fertilization for sustainable agriculture. Tarbiat Modares University Publication. (In Persian with English Abbstract)

Marschner H and Marschner P, 2012. Mineral nutrition of higher plants, Academic press.

Matocha JE and Pennington D, 1982. Effect of plant iron recycling on iron chlorosis of grain sorghum growth on calcareous soils. Journal of Plant Nutrition 5: 869-882.

Miller GW, Pushnik JC and Welkie GW, 1984. Iron chlorosis, a worldwide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. Journal of Plant Nutrition 7: 1-22.

Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A and Vianello A, 2002. Physiological effects of humic substances on higherplants. Soil Biology and Biochemistry 34 (11): 1527-1536.

Nasooti miandoab R, Samavat S and Tehrani MM, 2010. Humic acid fertilizer on plants and soil properties. Agric. Food. 101: 53-55. (In Persian with English Abbstract)

Neaman A and Aguirre L, 2007. Comparison of different methods for diagnosis of iron deficiency in avocado. Journal of Plant Nutrition 30: 1098 – 1108.

Olsen SR 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. United States Department of Agriculture; Washington.

Page AL, Miller RH and Keeney DR, 1982. Chemical and microbiological properties. Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Parfitt R and Childs C, 1988. Estimation of forms of Fe and Al-a review, and analysis of contrasting soils by dissolution and Mossbauer methods. Soil Research 26(1): 121-144.

Paya-Perez A, Sala J and Mousty F, 1993. Comparison of ICPAES and ICP-MS for the analysis of trace elements in soil extracts. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 51: 223-230.

Rafati F, 2004. The effect of different additives on iron availability in calcareous soils in sorghum. MSc Thesis, College of Agriculture, Gilan University, Iran. (In Persian with English Abbstract)

Rahii A, Davvodi fard M, Azizi F and Habiby D, 2012. Effects of different amounts of humic acid and response curves in the Dactylis glomerata. Agriculture and Plant Breeding Journal 8(3): 28-15. (In Persian with English Abbstract)

Rauthan BS and Schnitzer M, 1986. Effects of soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumus sativus*) plants. Plant Soil 63: 491-495.

Sabzavari S and Khazaee HR, 2008. Effect of spraying various levels of humic acid on growth characteristics, yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum L.*) Pishtaz cultivar. Agricultural Ecology 2 (1): 53-63. (In Persian with English Abbstract)

Salman SR, Abou-Hussein SD, Abdel-Mawgoud AMR and El-Nemr MA, 2005. Fruit yield and quality of watermelon as affected by hybrids and humic acid application. Journal of Applied Sciences Research 1: 51-58.

Sanchez Sanchez A, Sanchez anderu J, Juarez M, Jorda J and Bermudez D, 2002. Humic substances and amino acid improve effectiveness of Chelate FeEDDHA in lemons trees. Journal of Plant Nutrition 25(11): 2433-2442.

Sanjari mijani M, Cyrus Mehr AR and Fakheri BA, 2015. Effect of drought stress and humic acid on some physiological properties of sour tea. Journal of Agriculture 2(17): 403-414. (In Persian with English Abbstract)

Schwertmann U, 1964. Differenzierung der eisenoxide des bodens durch extraktion mit ammoniumoxalat-Lösung. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde 105(3): 194-202.

Shabazi K and Basharti H, 2013. Overview of fertility status of Iranian soil. Journal of Land Management 1(1): 1-17. (In Persian with English Abbstract)

Shahandeh H, Hossner L and Turner F, 1994. A comparison of extraction methods for evaluating Fe and P in flooded rice soils. Plant and Soil 165 (2): 219-225.

Sharma BD, Arora H, Kumar R and Nayyar VK, 2004. Relationship between soil characteristics and total and DTPA-extractable micronutrients in Inceptisols of Punjab. Communications in Soil Science and Plant Analysis 35: 799–818.

Soltanpour PN and Schwab AP, 1977. A new soil test for simultaneous extraction of macro- and micro-nutrients in alkaline soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis 8(3): 195-207.

Therios I, Chouliaras V, Bizas D, Boukouvalas S, Palioura E, Hatzidimitriou E, Basioukas D, Gioldasis V and Stavrou N, 2005. Changes in leaf biochemical and physiological indices due to iron deficiency in citrus. AgroThesis 1: 18 – 25.

Trierweiler JF and Lindsay WL, 1969. EDTA-ammonium carbonate soil test for zine. Soil Science Society of America Journal 33(1): 49-54.

Vatankhah A, Mohammadkhani AR, Houshmand S and Kiani Sh, 2015. Effect of humic acid and iron sulfate spraying on some physiological indices, quantity and quality of fruit grape varieties "*Askari*" cultivar. Production of Crop and Garden Cultivation 22(6): 107-119. (In Persian with English Abbstract)

Vempati RK and Loeppert RH, 1988. Chemistry and mineralogy of Fe- containing oxides and layer silicates in relation to plant available Fe. Journal of Plant Nutrition 11: 1557-1574.

Walkley A and Black IA, 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37(1): 29-38.

Wang L, Wu JP, Liu YX, Huang HQ and Fang QF, 2009. Spatial variability of micronutrients in rice grain and paddy soil. Pedosphere 19 (6): 748–755.

Wiren NV and Grusak MA, 2002. Summary of IX international symposium of iron nutrition and interaction in plants. Journal of Plant Nutrition 23: 2083-2102.

Xudan X, 1986. The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and wheat yield. Australian Journal of Agricultural Research 37: 343-350.