فصلنامهٔ علمی

مجلهٔ زیست‌شناسی کاربردی

تابستان ۱۴۰۰

صاحب امتیاز: **معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)**

سردبیر: **دکتر محمدرضا صعودی، استاد دانشگاه الزهرا (س)**

مدیر مسئول: **دکتر مهوش سیفعلی، استادیار دانشگاه الزهرا (س)**

دبیر تخصصی: **دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)**

دبیر تخصصی: **دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)**

اعضای هیأت تحریریه

دکتر مهناز اقدسی، دانشیار دانشگاه گلستان

دکتر نرگس حسینمردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دکتر فرشاد درویشی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عذرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه تهران

دکتر تورج ولی نسب پوری، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

اعضای هیأت تحریریه بین‌المللی

دکتر حسین رجایی، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کوینیگ آلمان

دکتر شهرام شهابی، استاد مدیر پژوهش کمپانی داروسازی هایلند و عضو هیات علمی وابسته کالج پزشکی نچروپاتی ساوت وست

مدیر اجرایی: **شهربانو برجیان**

ناشر: **معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)**

ویراستار: **خانم معصومه اصلانزاده**

چاپ و صحافی: **انتشارات دانش نگاران اوج**

ترتیب و انتشار : **فصلنامه**

این فصلنامه علمی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴/ ۸۹/۳/۱۱–در تاریخ ۸۹/۹/۸ منتشر می‌گردد.

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست‌شناسی ایران منتشر می‌شود.

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می‌شود : **www.Isc.gov.ir**

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کد پستی ۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا:۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: http://journals.alzahra.ac.ir/jab **Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir**

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

موارد	وضعیت اعمال موارد	محققان با رعایت سلامت و اصالت کامل نویسندگی در چهارچوب‌های اخلاق حرفه‌ای، مقالات علمی-پژوهشی خود را بر اساس نکات زیر تدوین و ارائه نمایند.
تعهدات		• فقط در صورت هیأت علمی بودن (مربی پژوهشی، استادیار، دانشیار و استاد) اقدام به ارسال مقاله فرمایید. نشریه زیست‌شناسی کاربردی در برابر مقاله‌های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
		• الزامی است نویسنده مسئول مقاله یکی از اعضاء محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها یا مؤسسات تحقیقاتی باشد. از این‌رو ایمیل نویسنده مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
		• در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به‌عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله‌ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
		• مقاله قبلاً به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور همزمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
		• تعهدنامه مطابق فرمت مجله ارسال شود.
		• چنانچه مقاله بخشی از پایان‌نامه دانشجویی است این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد(ان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
نگارش		• مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرند. هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد که همراه عنوان و واژه‌های کلیدی انگلیسی در انتهای مقاله آورده شود.
		• مقاله کامل دارای عنوان فارسی، نام و آدرس نویسندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه‌گیری کلی، سپاسگزاری(اختیاری)، منابع، عنوان، آدرس، چکیده و واژه‌های کلیدی انگلیسی می‌باشد.
		• شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها شماره‌گذاری شده و به همراه زیرنویس اشکال و بالانویس جداول در متن مقاله آورده شوند
		• تایپ مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word 2007 با حاشیه ۲/۵سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن۱/۵ (به جز جداول، شکل‌ها و بالانویس و زیرنویس آن‌ها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم در پایین و وسط صفحه با فونت B Nazanin ۱۲ شماره‌گذاری شوند. در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
		• از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز درون پرانتز و در مقاله آورده شود.

		• همواره فونت فارسی B Nazanin و فونت انگلیسی Times New Roman با دو سایز کوچک‌تر باشد و جزییات مطابق زیر رعایت شود: • عنوان فارسی مقاله: وسط چین، Bold و ۱۴ و انگلیسی وسط چین، Bold و ۱۲ باشد. • نام نگارندگان: وسط چین، Bold و ۱۱ باشد و با کاما از هم جدا شوند. در مورد انگلیسی هم همین‌طور ولی با فونت ۹. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده مسئول سمت راست آن عدد باشد (Akbari[1*]). • نشانی نگارندگان: وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد. • **چکیده باید شامل هدف، مقدمه، پارامترها و نتیجه‌گیری باشد.** • چکیده فارسی: فونت ۱۲ نازک و ایتالیک، در یک پاراگراف و حداکثر ۱۵۰ کلمه باشد. • واژگان کلیدی فارسی: Bold و ۱۲و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند. • متن فارسی: ۱۲ و انگلیسی ۱۰ باشد. • عناوین بخش‌های مختلف: عناوین اصلی، درجه دو و سه Bold باشند. عنوان اصلی فارسی راست چین ۱۴ و انگلیسی چپ چین و ۱۲ باشند. پس از عناوین اصلی و درجه دوم دو نقطه استفاده نشود و ادامه متن از سطر جدید نوشته شود ولی عناوین درجه سه با دو نقطه از مطلب جدا شود. • چکیده انگلیسی: فونت ۱۰ نازک و در یک پاراگراف باشد. • واژگان کلیدی انگلیسی: فونت ۱۰ Bold باشند. • شماره صفحه: پایین وسط با فونت B Nazanin۱۲
		• ابتدای هر پاراگراف ۱/۲۷ سانتی‌متر تورفتگی داشته باشد.
		• برای نوشتن اسامی علمی تحت جنس (سرده) سیستم دونامی رعایت شود.
		• در مقاله، علائم نگارشی مثل نقطه و غیره به کلمه قبلی چسبیده و از بعدی یک فاصله داشته باشد. از علامت ٪ استفاده نشود بلکه کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جداول و اشکال).
		• برای بیان مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
جدول و شکل		• جدول با سه خط افقی رسم شود (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).
		• فونت اعداد و متن داخل جداول و اشکال ۱۰ نازک و وسط چین باشد.
		• اعداد حداکثر تا دو رقم اعشار نوشته شوند.
		• عنوان جداول (در بالای جدول) و اشکال (در پایین شکل) وسط چین با فونت ۱۱ Bold
		• علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با فونت ۸ نازک نوشته شوند.

مرجع نویسی در متن		• منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). منابع با دو نگارنده: نام خانوادگی آن‌ها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001). منابع با بیش از دو نگارنده: تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al* (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (Fernandes *et al*., 2001). در متن مقاله می‌توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به‌عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953).
منابع		• بدون شماره بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و نیم سانتی‌متر تورفتگی داشته باشند. عنوان مجلات کامل نوشته شوند. برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده‌اند به جای ذکر سال از عبارت (in press) استفاده شود. • تمامی منابع به زبان انگلیسی باشد. • نشریات: الف) با یک نویسنده: Wilson, R.G.J.(1981). Weed control in established dryland Alfalfa (Medicago *sativa*). Weed science, 29: 615-618. ب) با دو نویسنده: Pline, W.A. and Wilcut, J.W. (2007). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Agriculture Food and Chemistry, 50: 506–512. ج) با بیش از دو نویسنده: Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998). Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posremergrnce herbicides. Weed Technology, 3: 424-428. د) بهتر است سایت به‌عنوان مرجع مورد استفاده قرار نگیرد ولی در صورت اضطرار حتماً تاریخ مشاهده و دسترسی ذکر شود. • کتاب الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، حرف اول نام (سال انتشار)نام کتاب. تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات. ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، حرف اول نام ،(سال انتشار)، نام کتاب ، تعداد چاپ‌ها، ناشر ، تعداد صفحات و سپسPp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک است و سپس شهر محل انتشار.

Ahrens, W.H. (1994). Herbicide Handbook. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America 224 Pp. losAngeles. ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود. -مقاله‌ای در یک کتاب: نام خانوادگی، حرف اول نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفات مقاله، عنوان کتاب. ناشر (کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ). Baver, L.D. and Gardner, W.H. (1972). Flow in stratified soil systems. Pages 343–345 in Baver LD, ed. Soil Physics New York: Academic Press. - خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور. Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005). Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – peroxidase activity of field bindweed (Convolvulus arvensis L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World Congressnon Allelopathy, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia. - گزارش علمی مستخرج از طرح تحقیقاتی: نام خانوادگی، حرف اول نام، سال انتشار، عنوان پروژه تحقیقاتی. ذکر سالیانه یا نهایی بودن گزارش، نام موسسه تحقیقاتی، تعداد صفحات. Shimi, P. (2003). Management of Cynanchum acutum in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institue of Plant Protection Pp25. -منابع بی نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب‌ناپذیر بود به‌صورت زیر عمل شود: بی نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه ، روز، سال). Anonymous, (2001). Project Summary Comparative Genomics of Domestication Traits in Lettuce and Sunflower. http://veghome.ucdavis.edu/faculty/michelmore/ Project summary.htm. Accessed August 23, 2001. -استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت		

		که به واژه htm ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال). Agriculture and Agri-Food Canada. (1999). Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division. http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean_e.html. Accessed: January 29, 2001. -وقتی مقاله‌ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.

- **نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که بر اساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به‌عنوان الگو استفاده نمایند.**
- **مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله(http://jab.alzahra.ac.ir) به دبیرخانه ارسال شود.**

فهرست صفحه

تأثیر کودهای ازت و نانو ازت بر ترکیبات فنلی و کلشی‌سین در بنه‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum speciosum*) سه منطقه‌ی استان مازندران

مسعود بابائی نائیج، مریم پیوندی، حسین عباسپور، زهرا نورمحمدی، صدیقه اربابیان..... ۹

تفاوت‌های تأثیر قارچ مایکوریزا و عناصر تغذیه‌ای بر بعضی از صفات دانهال پسته در برهمکنش با بیمارگر *Phytophthora drechsleri*

الهام باب‌زن، مژده ملکی، جلال غلام‌نژاد، فاطمه ناصری نسب..... ۲۴

تعیین میزان برخی ترکیبات شیمیایی گونه‌های غالب جلبک‌های قهوه‌ای بندر لنگه، استان هرمزگان

حدیث جعفری، فرناز رفیعی، آریا اشجع اردلان..... ۵۱

بررسی موقعیت اسیدهای آمینه آروماتیک آنزیم پراکسیداز ترب کوهی واسرشته شده با فلز روی؛ آنالیز مشتق مرتبه دوم گراف‌های طیف سنجی

محمدرضا رجبی، نجمه هادی‌زاده شیرازی..... ۷۰

توسعه‌ی نرم‌افزار اندازه‌گیری سطح برگ و مقایسه‌ی آن با روش‌های مرسوم

هومن شریف نسب، فریبرز عباسی..... ۸۳

ارزیابی محتوای کاروتنوئید تام و زیست‌توده‌ی میکروبی تولیدشده توسط *Deinococcus radiodurans* R1 در پاسخ به منابع نیتروژنی و کربنی مختلف

عاطفه صالحی بختیاری، زهرا اعتمادی فر، ماتیا سادات برهانی..... ۹۵

اثر ترکیبات فنلی سنتزی و استخراج شده از علف‌هرز سوروف (*Echino crus-galli* (L.) Beauv) بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیای گیاهچه‌های برنج رقم دمسیاه

ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری، امیر قربانی، حسین صبوری، میثم حبیبی، عبدالله عطایی..... ۱۱۲

بررسی اثر داروی اس‌سیتالوپرام بر تغییرات استروئیدهای جنسی و فراساختار اووسیت در ماهی گورامی سه خال پس از افزایش سطح دوپامین با تزریق بروموکریپتین

مناسادات حسینی‌جبلی، طاهره ناجی، همایون حسین‌زاده صحافی..... ۱۲۹

بررسی پیش‌تیمار کروناتین بر تنش ناشی از نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون بر گیاه سویا

شهلا هاشمی شهرکی، فرشته محمدحسنی‌جور.....۱۴۶

بررسی تأثیر کود زیستی ازتِ و کود اوره بر برخی صفات فیزیولوژی، فیتوشیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

فائزه هادی نژاد، اعظم سلیمی، مریم چاوشی.....۱۶۸

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser.68, Summer 2021, p. 9-23
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۹-۲۳
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

تأثیر کودهای ازت و نانو ازت بر ترکیبات فنلی و کلشی‌سین در بنه‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum speciosum* L.) سه منطقه‌ی استان مازندران

مسعود بابائی نائیج[۱]، مریم پیوندی*[۲]، حسین عباسپور[۳]، زهرا نورمحمدی[۳]، صدیقه اربابیان[۳]

چکیده

گل‌حسرت (Colchicum speciosum L.) گیاهی دارویی غنی از کلشی‌سین و ترکیبات فنلی است. در این مطالعه تاثیر غلظت های مختلف کودهای ازت و نانو ازت بر محتوای ترکیبات فنلی وآلکالوئید کلشی‌سین در بنه گیاهان گل‌حسرت از سه منطقه در استان مازندران (فیل‌بند، کلرد و سنگ‌درکا) بررسی شد. آزمایش با طرح بلوک های تصادفی برای پنج تیمار شامل تیمار شاهد، دو سطح کود ازت (۱/۱mg/l و۲/۲)، دو سطح کود نانو ازت (۱/۵mg/l و ۳) برای گیاهان سه رویشگاه اجرا شد. سه ماه پس از شروع تیمار، ترکیبات فنلی و آلکالوئید کلشی‌سین بنه استخراج شد. محتوای ترکیبات فنلی با روش اسپکتروفتومتری و کلشی‌سین با HPLC سنجش شدند. در گیاهان رویشگاه فیل‌بند همه تیمارهای ازت و نانو ازت موجب افزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد. استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار محتوای فلاونوئید کل در بنه گیاهان رویشگاه‌های مورد مطالعه شد. کود ازت در همه‌ی جمعیت‌ها موجب افزایش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین کل بنه شد، در حالی‌که تیمار با کود نانو ازت تاثیر معنی‌دار بر میانگین محتوای آنتوسیانین کل بنه نداشت. مقایسه‌ی نتایج میانگین محتوای کلشی‌سین بنه در تیمارهای مختلف نشان داد که کودهای ازت موجب کاهش و کودهای نانو ازت سبب افزایش محتوای کلشی‌سین بنه می‌شوند. نتایج حاضر نشان داد محتوای متابولیت‌های مورد مطالعه در بنه رویشگاه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارند و تاثیر کودهای ازت و نانو ازت برتغییر محتوای این متابولیت‌ها یکسان نیست.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین کل، بنه، فلاونوئید کل، کلشی‌سین، گل‌حسرت، نانو ازت

۱- دانشجوی دکترا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
*(نویسنده مسئول: naji_t@iaups.ac.ir/ tnaji2002@gmail.com)
۳- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

مقدمه

گل‌حسرت (*Colchicum speciosum* L.) *متعلق به جنس‌کلشی‌کوم* (*Colchicum*) و خانواده کلشی‌کاسه (*Colchicacae*) است و اعضای آن علفی، پایا همراه با بنه‌های زیرزمینی یا ریزوم و گل‌های هیپوژینوس با ۶ گلبرگ هستند (Nordenstam, 1998). از این خانواده در ایران فقط جنس کلشی‌کوم وجود دارد که ۱۴ گونه دارد. در شمال کشور ۹ گونه وجود دارد که یکی از این گونه‌ها *Colchicum speciosum* در ارتفاعات مازندران دیده می‌شود و علاوه بر شمال ایران در آذربایجان و شاهرود و تهران نیز مشاهده می‌شود. این گونه علاوه بر ایران در ترکیه و قفقاز نیز گزارش شده است (معروفی، ۱۳۹۶).

تنوع متابولیت‌های ثانوی در گیاهان بیش از ۲۰۰۰۰۰ ماده مختلف است که می‌توان به گروه‌های آمین، آمینواسیدهای غیر پروتئینی، اسیدهای آلی، کوئینون‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فنل‌ها اشاره نمود. ترکیبات فنلی خود شامل پلی فنل‌ها، اولیگوفنل‌ها و مونوفنل‌ها یا ترکیبات ساده فنلی چون بنزوئیک اسید و سینامیک اسید و مشتقات هیدروکسیله شده‌ی آن‌ها است (Marchiosi *et al.*, 2020). از ترکیبات فنلی موجود در جنس کلشی‌کوم می‌توان به وانیلین، وانیلیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید و لوتئین اشاره کرد (Mansoor, 2004).

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی ریشه و ساقه گیاه C. turcicum L. نشان داد که بالاترین محتوای فنل کل و فلاونوئید کل در این گونه مربوط به عصاره‌های حل شده در استون هستند که بالاترین محتوای فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند (Kilic, 2013). در مطالعه‌ی دیگر (Senizza *et al*., 2020) ۲۸۵ نوع ماده شیمیایی از گونه C.triphyllum شناسایی شد *که* فراوانترین این ترکیبات شامل آلکالوئیدها (مثل *کلشی‌سین* و دمکولسین)، آنتوسیانین‌ها (مثل پتونیدین ۳- O-روتینوزید و سیانیدین۳-O- سوفروزید) فلاون‌ها (مثل آپیژنین و لوتئولین گلوکوزیدها)، فلاونول‌ها (مثل اشکال ایزومری کامفرول و کوئرستین) بودند. از جمله مهمترین متابولیت‌های ثانوی در گل حسرت می‌توان به *کلشی‌سین* اشاره نمود. این آلکالوئیدها در خانواده Colchicaceae در جنس کلشی‌کوم و گونه *Gloriosa superba* وجود دارد (Renu Sarin, 2010). *کلشی‌سین* جزء گروه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشد و در اندام‌های مختلف گیاه مشاهده می‌شود. این گروه از آلکالوئیدها علاوه بر کلشی‌سین شامل اعضای فعال فیزیولوژیکی چون امتین (emetine نوعی ضد آمیب) (pettit *et al.*, 2020)، مورفین و کودئین (Mehabadi & Karimiyan, 2018) هستند.

کلشی‌سین بدون شک یکی از مهم‌ترین آلکالوئیدهایی است که مورد توجه انسان‌ها است. *کلشی‌سین* داروی سنتی نقرس است و برای درمان دردهای روماتیسمی از سال ۱۸۱۰ تجویز می‌شود (Wendelbo & Stuart, 1985).

ازت عنصر مغذی حیاتی در چرخه زندگی گیاهان محسوب می‌شود و در طیف وسیعی از ترکیبات آلی چون آمینواسیدها، پروتئین‌ها، نوکلئیک‌اسیدها و کلروفیل دیده می‌شود (Pilbeam, 2015). مشخص شده است که کمبود ازت سبب نقص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود که در نهایت منجر به کاهش تقسیم سلولی و اختلال در فرآیند فتوسنتز می‌گردد

(Roggatz *et al*., 1999). کودهای ازتی و همچنین زمان برداشت محصول بر محتوای انباشت متابولیت‌های ثانوی از جمله انواع فنل‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی گیاهی موثر هستند (Cojocaru *et al.*, 2020).

در عصر تغییر اقلیم، سیستم‌های کشاورزی جهانی برای دستیابی به امنیت غذایی با چالش‌های بی شماری روبرو هستند. مهندسی نانو، ابزاری مفید برای تقویت محصولات است. کودهای نانو می‌توانند یک یا چند ماده غذایی را در اختیار گیاه قرار دهند و با این روش سبب افزایش محصول و عملکرد گیاه می‌شوند (Liu & Lal, 2015) . نانوکودها مواد غذایی گیاهان را به نانومواد تبدیل می‌کنند و این ترکیبات در اندازه‌ی نانو می‌توانند از منافذ روزنه‌ها و دیواره‌ی اسکلتی سلول‌های ریشه به‌راحتی عبور کنند. همچنین با عبور از پلاسمودسم‌ها می‌توانند به سادگی از سلولی به سلول دیگر منتقل شوند و خود را به تمامی سلول‌ها برسانند و سبب افزایش عملکرد محصولات زراعی گردند (Wan *et al*., 2010). در مقایسه نانوکود و برتری آن نسبت به کود عادی می‌توان گفت که نانوکودها برخلاف کودهای شیمیایی عنصر غذایی را به آرامی آزاد می‌کنند و آب شویی ماده را نسبت به کود شیمیایی کاهش می‌دهند و نسبت به کودهای شیمیایی از کانال‌های یونی بیشتری در غشاء پلاسمایی برای جذب استفاده می‌کنند (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). این در حالی است که ۴۰ تا ۷۰ درصد کودهای شیمیایی به‌راحتی از دسترس گیاه خارج می‌شوند (Ombódi & Saigusa, 2000). مطالعات اندکی پیرامون اثرات کود بر گیاه گل حسرت انجام گرفته است (Al-Fayyad, 2003). از آنجایی که کلشی‌سین جزء ترکیباتی ازت دار می‌باشند به همین خاطر انتظار می‌رود که دسترسی ازت نقش مهمی در بیوسنتز و انباشت آلکالوئیدها در گیاهان داشته باشد. تأثیر ازت به عنوان عامل افزایش دهنده *کلشی‌سین* در کلشی‌کوم گزارش شده است در مطالعه‌ای دیگر علیرضایی و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقی پیرامون تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی ازتی بر عملکرد بنه و میزان کلشی‌سین در گونه *C. kotschyi* تحت شرایط رویشگاه، نشان دادند که کودهای زیستی یا شیمیایی با غلظت متوسط می‌تواند بهترین عملکرد را روی بنه به‌جا گذاشته و بیشترین مقدار *کلشی‌سین* را از این گونه بدست آورد. با بررسی تاثیر خصوصیات شیمیایی خاک روی مواد معدنی و مقدار آلکالوئیدهای گیاه *C. autumnale* نشان دادند که مقدار کبالت و کلسیم خاک اثر مثبتی روی انباشت *کلشی‌سین* در دانه‌های این گیاه دارد (Girardin, 2004 & Poutaraud). پیرامون اثر کودها بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان نیز بررسی متفاوتی انجام شده است. از جمله می‌توان به تحقیق Zhang و همکاران (2016) اشاره نمود که با تحقیقی روی اثرات بلند مدت کود آلی و ازتی بر خاصیت آنتی اکسیدانی میوه‌های گوجه فرنگی نشان دادند که وقتی از کود شیمیایی ازتی به‌همراه کود آلی استفاده شود سبب افزایش مقدار فنل‌ها و فلاونوئیدها خواهد شد.

استفاده از نانوکودها سبب افزایش کارآیی مصرف عناصر غذایی و افزایش مقدار محصول می‌شود (Liu & Lal, 2015). نانوکودها به دلیل آن که در دسترس بودن عناصر غذایی برای برگ های گیاه را با کمک کلات کردن عنصر مورد نظر تسهیل

می کنند، کارآیی مصرف این نوع کودها را نسبت به کودهای معمولی بالا می‌برند (Suppan, 2013) . محمدقاسمی و همکاران (۲۰۲۰) نیز با بررسی تاثیر نانوکود بر اجزاء عملکرد و خصوصیات آنتی اکسیدانی در گیاه *Lallemantia iberica* نشان دادند که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی زمانی در این گیاه حاصل می‌شود که از تیمار نانوکود NPK (نیتروژن، فسفر، پتاسیم) به‌همراه نانوکودآهن استفاده گردد.

از آنجایی که شرایط محیطی و تغذیه ای روی تولید و عملکرد گیاهان اثرات متفاوتی دارند هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات کود و نانوکود ازت بر محتوای کلشی‌سین و ترکیبات فنلی در شرایط گلدانی در گیاه *C. speciosum* بود. همچنین برای اولین بار به اهلی‌سازی این گونه‌ی وحشی اقدام شد.

مواد و روش‌ها

نحوه انتقال نمونه‌ها به گلدان و تیماردهی

گیاهان در اواخرآبان، زمانی‌که این گیاه در مرحله گل‌دهی قرار داشت از سه منطقه در استان مازندران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). بنه گیاهان در تاریکی و در مکان خشک و خنک نگهداری شد. برای بررسی اثرات کود و نانوکود ازت بنه‌ها در اواخر خرداد درگلدان‌هایی به ابعاد ۳۰×۵۰ سانتی متر کاشته شدند. برای سازگاری بهتر نمونه‌ها در محیط از خاک همان مناطق در کاشت نمونه‌ها استفاده شد. کود ازت آریو از شرکت گرین و نانوکود ازت از شرکت خضراء خریداری شد.

گیاهان با کود ازت (۱/۱ mg/l و ۲/۲) و نانو ازت (۱/۵ mg/l و ۳) تیمار شدند. تیمار با محلول‌های ازت یا نانو ازت دوبار(در اول مرداد ماه و دوم در ۱۰شهریورماه ۹۶) انجام شد. نمونه گیری از بنه‌ها در زمان گل دهی در آبان ماه انجام شد.

جدول۱ : مشخصات جغرافیایی سه منطقه

شماره جمعیت	نام منطقه	ارتفاع رویشگاه (m)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	عرصه رویشی
۱	سنگ‌درکا	۸۵۰	۶۱،۲۶،۲۸	۴۰،۲۳،۲	جنگلی
۲	کلرد	۴۸۳	۶۲،۲۶،۳۳	۴۰،۱۴،۷۵	جنگلی
۳	فیل‌بند	۲۱۴۱	۶۳،۶۶،۷۳	۴۰،۰۱،۸۹	ییلاقی

براساس UTM Coordinance System WGS84 Zoom 39N

استخراج کلشی‌سین از بنه

برای استخراج کلشی‌سین از روش Kumar و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. نیم گرم پودر بنه دوبار با ۲۵ میلی لیتر اتر نفت به مدت یک ساعت تکان داده و صاف شد. ماده جامد باقیمانده را در محیط خشک کردیم و سپس با ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان در دمای اتاق برای ۳۰ دقیقه تکان داده شد. سپس ۱۰ درصد محلول آمونیم (0.5 ml) به آن اضافه و به مدت ۱۰

دقیقه با شدت تکان داده شد. ۳۰ دقیقه محلول دست نخورده گذاشته و سپس صاف شد. باقیمانده دوبار با 10ml دی کلرومتان شسته و سپس با محلول مرحله قبل مخلوط شد.. فاز آلی بخار و خشک و سپس در 1ml اتانول ۷۰ درصد حل شد.

سنجش کلشی‌سین با HPLC

سنجش کلشی‌سین با دستگاه HPLC برند Waters مدل ۱۵۲۵(Sciencix company USA) با آشکارگر جذب UV انجام شد، شناسایی و جداسازی کلشی‌سین توسط کروماتوگرافی مایع انجام گرفت که به‌صورت ایزوکراتیک در ستون فاز معکوس C18) قطر ذرات ۵ µm و۶/۴X ۱۵۰)، فاز متحرک شامل استونیتریل (۳۲٪)، متانول (۴۸٪)، آب (۲۰٪) / بود و با اسید فسفریک pH ۵/۲ تنظیم شد. حجم تزریق ۳۰ µl و شدت جریان حلال ۰/۵ ml/min بود. مناسبترین طول موج شناسایی دتکتور UV، برای کلشی‌سین ۲۵۴ nm می‌باشد (Gowda, 2014).

برای رسم منحنی استاندارد کلشی‌سین از استاندارد کلشی‌سین تولیدی شرکت BIOFARM کشور رومانی استفاده شد. منحنی استاندارد کلشی‌سین براساس غلظت‌های (µg/ml)۱، ۱۰، ۲۰ رسم شد(شکل ۱).

استخراج و سنجش ترکیبات فنلی کل

برای استخراج فنل‌ها از روشSlinkard & Singleton, 1977 استفاده شد. یک گرم وزن تر بنه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰درصد قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در الکل جوشانده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰rpm) شد. سپس محلول فوقانی جدا و با الکل ۸۰ درصد به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد. در پایان ۰/۲ میلی لیتر عصاره با ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر محلول فولین سیوکالتو ۱۵ بار رقیق و مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه ۳ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷درصد به مخلوط اضافه گردید و پس از ۹۰ دقیقه جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فنل بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. منحنی استاندارد گالیک اسید براساس غلظت‌های (mg/ml) ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶۶، ۱ رسم شد (شکل۱).

استخراج و سنجش فلاونوئید کل

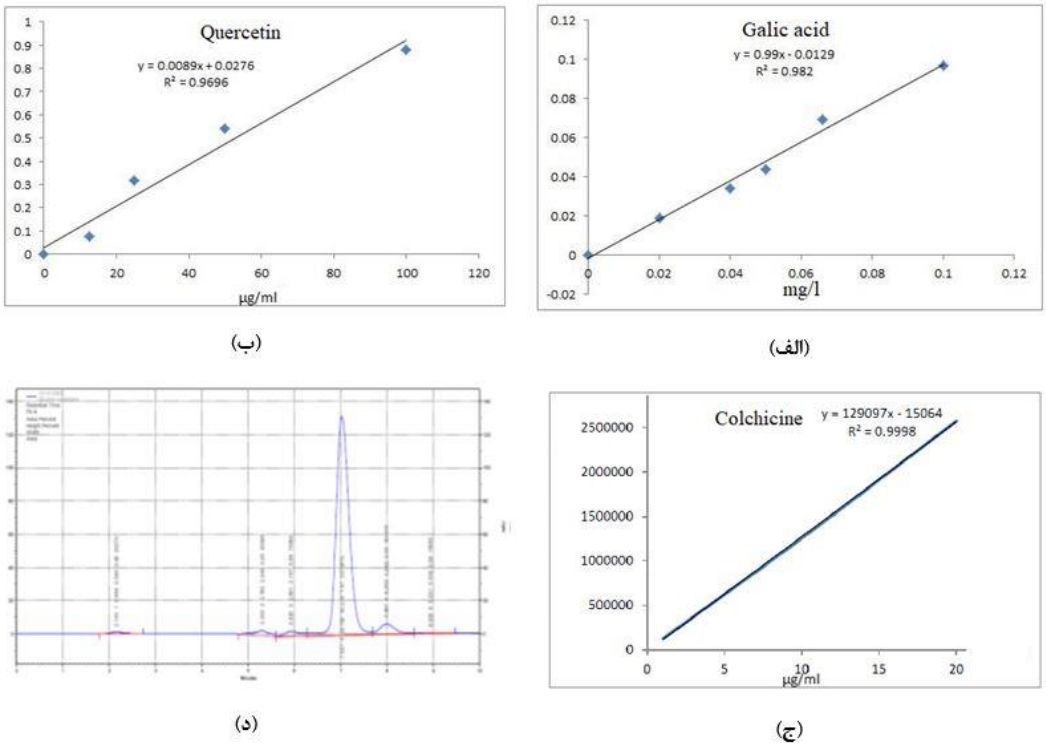
برای استخراج فلاونوئیدها از روش Chang *et al*., 2002 استفاده شد. یک گرم بنه با ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰درصد مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰rpm) شد. حجم روشناور با متانول ۸۰ درصد به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. ۰/۵ میلی لیتر عصاره با ۱/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط شد و به آن ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از

گذشت نیم ساعت جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید براساس منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد. منحنی استاندارد کوئرستین براساس غلظت‌های (۱۲/۵ µg/ml، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) رسم شد(شکل۱).

استخراج و سنجش آنتوسیانین کل

استخراج آنتوسیانین‌ها براساس روش (Baker & Nouges, 2000) انجام شد. یک گرم از بنه در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (۹۹:۱) (اسید کلریدریک : متانول) (**v/v**) استخراج شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰ rpm) شد. روشناور به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب محلول در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از ضریب خاموشی با فرمول زیر محاسبه شد.

$\varepsilon = 33000 mM^{-1} cm^{-1}$



شکل ۱: (الف) منحنی استاندارد گالیک اسید، (ب) منحنی استاندارد کوئرستین، (ج) منحنی استاندارد کلشی‌سین، (د) کروماتوگرامHPLC استاندارد کلشی‌سین

آنالیز آماری

آزمایش با طرح بلوک‌های کاملا تصادفی انجام شد. هر تیمار با نه گلدان و در هر گلدان ۱۵ نمونه کاشته شدند. آنالیز آماری با نرم افزار SPSSver.22 انجام شد. آنالیز واریانس چند عاملی با برنامه General Linear Model و گروه بندی میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) انجام شد.

نتایج

آنالیز واریانس چند عاملی نشان داد تفاوت در میانگین ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل و کلشی‌سین بنه وابسته به رویشگاه و نوع تیمار گیاه با کودهای ازت ونانو ازت می‌باشند (جدول ۲).

فنل کل

مقایسه میانگین محتوای ترکیبات فنلی کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای ترکیبات فنلی مربوط به بنه رویشگاه کلرد (۸/۶۲mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند (۴/۵۵mg/gFW) می‌باشد. محتوای ترکیبات فنلی در جمعیت کلرد در تیمار ازت (۱/۱ mg/l) افزایش معنی‌داری ($P\leq0.05$) را نشان داد، در حالی‌که تیمارهای نانو ازت در هر دو غلظت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) آن در این جمعیت شد.

در جمعیت فیل‌بند همه تیمارهای ازت و نانو ازت موجب اقزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد. بنابراین می‌توان گفت استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب افزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) ترکیبات فنلی کل در گیاهان منطقه فیل‌بند و کلرد شده است. برخلاف گیاهان این دو رویشگاه، در گیاهان منطقه سنگ‌درکا تیمار با نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد (شکل۱).

فلاونوئیدکل

مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای فلاونوئید کل مربوط به بنه رویشگاه سنگ‌درکا (۰/۱۵mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند (۰/۳۷mg/gFW) می‌باشد. همچنین این نتایج نشان داد استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای فلاونوئید کل در بنه گیاهان مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه شده است (شکل۱).

آنتوسیانین کل

مقایسه میانگین محتوای آنتوسیانین کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای آنتوسیانین کل مربوط به بنه رویشگاه فیل‌بند (۰/۴۰mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه سنگ‌درکا (۰/۶۲mg/gFW) می‌باشد. نتایج نشان داد کود ازت(۱/۱mg/l) در همه جمعیت‌ها موجب افزایش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین کل بنه شد. کود ازت با غلظت (۲/۲mg/l) نیز تاحدی موجب افزایش آنتوسیانین شد، در حالی‌که نانو ازت با غلظت‌های مختلف (۱/۵mg/l، ۳) تاثیر معنی‌دار ($P\leq0.05$) بر محتوای آنتوسیانین کل بنه نداشت(شکل۱).

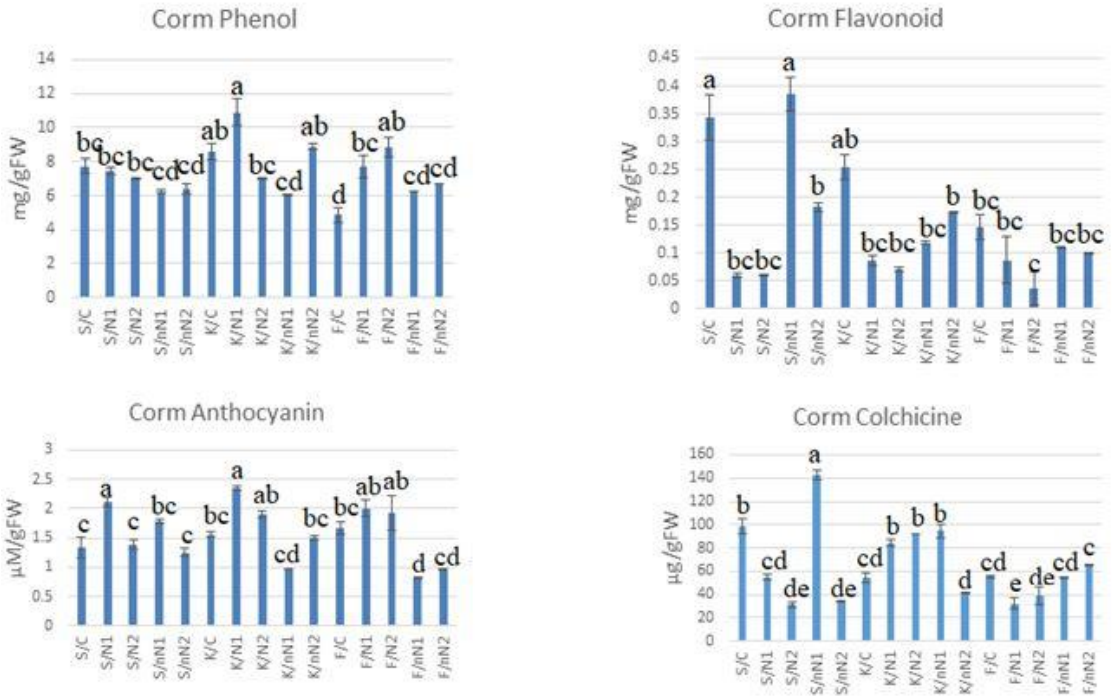
کلشی‌سین

مقایسه میانگین محتوای کلشی‌سین بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای کلشی‌سین مربوط به بنه رویشگاه سنگ‌درکا و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند می‌باشد.

در بنه گیاهان رویشگاه کلرد، کود ازت با هر دو غلظت و نانو ازت با غلظت کم موجب افزایش معنی‌دار محتوای کلشی‌سین شد. در بنه گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا کود نانوازت (۱/۵mg/l) موجب افزایش و کود ازت (۲/۲mg/l) و نانو ازت با غلظت بالا (۳mg/l) موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین بنه شد. هم‌چنین در بنه گیاهان رویشگاه فیل‌بند کود ازت در هر دو غلظت و نانو ازت در غلظت بالا موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین شد (شکل۲).

جدول ۲: آنالیز واریانس دوعاملی(رویشگاه، نوع کود) بر شاخص‌های مختلف در بنه گل‌حسرت

منبع	متغیر وابسته	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
کود	فنل کل	۱۰۴/۱۸	۴	۲۴/۰۴	۴۱/۶۴	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۴۷	۴	۰/۱۱	۳۷/۹۵	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۱۴/۷۷	۴	۳/۶۹	۱۲۵/۳۹	۰/۰۰
	کلشی‌سین	۱۰۳۷۸۶/۸۷	۴	۲۵۹۴۶/۷۱	۱۴۵/۵۷	۰/۰۰
رویشگاه	فنل کل	۶۸/۰۶	۲	۳۴/۰۳	۵۴/۴۱	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۱۹	۲	۰/۰۹	۳۰/۸۹	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۰/۳۱	۲	۰/۱۵	۵/۳۲	۰/۰۰۵
	کلشی‌سین	۸۳۶۴/۰۸	۲	۴۱۸۲/۰۴	۲۳/۴۶	۰/۰۰
کود * رویشگاه	فنل کل	۱۶۰/۲۶	۸	۲۳/۰۳	۳۲/۰۲	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۵۵	۸	۰/۰۶	۲۲/۰۰	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۱۳/۴۷	۸	۱/۶۸	۵۷/۱۶	۰/۰۰
	کلشی‌سین	۱۴۴۸۶۴/۴۴	۸	۱۸۱۰۸/۰۵	۱۰۱/۵۹	۰/۰۰



شکل۲: میانگین ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و کلشی‌سین بنه گیاهان سه رویشگاه سنگ‌درکا(S)، کلرد (K)، فیل‌بند (F) در تیمارهای شاهد(C)کود ازت(N1)۱/۱ mg/l، کود ازت(N2)۲/۲ mg/l، کود نانو ازت(nN1)۱/۵ mg/l، کود نانو ازت (nN2)۳ mg/l. نتایج میانگین سه تکرار (Maen±SE) را نشان می‌دهد. گروه بندی بر اساس آزمون دانکن ($P\leq0.05$).

بحث

کشت و کار و اهلی سازی گیاهان دارویی در رویشگاه طبیعی به حفظ تنوع ژنتیکی و برداشت پایدار کمک می‌کند (علیرضایی وهمکاران، ۱۳۹۱). شرایط جغرافیایی، بافت خاک و عناصر مغذی در رشد و نمو و بقا این گیاهان تاثیر بسزایی دارد (Gholami *et al.*, 2020). مطالعه حاضر نشان داد تیمار گیاهان با کود ازت و نانو ازت موجب افزایش محتوای فنل کل گیاهان رویشگاه کلرد و فیل‌بند شد. برخلاف این دو رویشگاه، محتوای فنل کل در بنه گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا در تیمارهای نانو ازت کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) نشان داد. در این ارتباط Benzon و همکاران (2015) در گیاه برنج نشان دادند که نانو کود سبب افزایش محتوای فنل کل در گیاه برنج می‌شود. تاثیر دو نوع کود بر محتوای فلاونوئید منفی بود. در پژوهشی بر روی گندم نشان دادند کاربرد کود ازت اگرچه عملکرد گیاه را افزایش می‌دهد، اما موجب کاهش محتوای برخی از فلاونوئیدها می‌گردد (Stumpf *et al.*, 2018). در پژوهشی بر تاثیر کود ازت بر محتوای فلاونوئید کنگر فرنگی نشان دادند که با افزایش غلظت کود، محتوای فلاونوئید در عصاره گیاه کاهش می‌یابد و دلیل این کاهش را به نقش اسید آمینه فنیل آلانین به عنوان پیش ماده تولید فلاونوئیدها دانستند (Allahdadi & Farzane,2018). در این ارتباط Aires و همکاران (2006) متذکر شدند که ازت بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی از جمله فلاونوئیدها را تعدیل می‌کند. Awad و همکاران (2002) نشان دادند که همبستگی منفی بین

افزایش غلظت کود ازتی با غلظت فلاونوئید، مربوط به افزایش دسترسی به فنیل آلانین است که سبب محدود کردن سنتز فلاونوئیدها تحت شرایط کمبود ازت می‌شود. Ibrahim و همکاران (2011) در بررسی رابطه بین محتوای تولید فنل و فلاونوئید با محتوای ترکیبات کربوهیدراتی غیر ساختاری و فتوسنتزی در گیاه *Labisia pumila* Benth تحت اثر کود نیتراتی و CO_2 بالا دریافتند که تولید فنل و فلاونوئید در ارتباط با افزایش کربوهیدرات‌های غیر ساختاری است چرا که افزایش در مقدار نشاسته نسبت به غلظت قند بیشتر بود. این محققان نشان دادند که غلظت قندهای محلول اثر بالاتری نسبت به نشاسته بر مقدار بیوسنتز فنل و فلاونوئید دارد. همچنین اظهار داشتندکه فتوسنتز رابطه‌ای منفی با تولید فنل و فلاونوئید دارد به‌نحوی که کاهش محتوای فتوسنتز سبب خواهد شد تا متابولیت‌های ثانوی زیاد گردند این امر به‌واسطه‌ی افزایش مسیر شیکمیک اسید می‌باشد که منجر به افزایش تولید فنل و فلاونوئید می‌شود.

Chun-Sen Wu و همکاران (2013) در بررسی مقایسه‌ای اثر کودهای آلی و سنتی بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی *Ziziphus jujube* Mill. دریافتند که کودهای آلی ازتی تاثیر بیشتری بر روی انباشت آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها در این گیاه دارد و پیشنهاد کردند که دلیل این تفاوت مربوط به تعادل در نسبت کربن به ازت می‌باشد و گیاه به این تعادل برای تولید فنل‌ها نیاز دارد. بر اساس نظریه‌ی اثر متقابل رشد و دفاع گیاه و رقابت برای منابع محدود می‌توان گفت بین عملکردهای مختلف گیاه معاملاتی وجود دارد، متابولیسم فنل‌ها نه تنها روی نمو عادی گیاه تاثیر می گذارد بلکه می‌تواند تحت تاثیر تنش‌های محیطی نیز در گیاه القا گردد (Endara & Coley, 2011).

Al-Fayyad و همکاران (2002) با بررسی تعیین محتوای کلشی‌سین در دو گونه از گل حسرت تحت کشت مزرعه‌ای نشان دادند که اثر کود NPK (پتاسیم، فسفر، نیتروژن) در مراحل متعدد رویشی گل حسرت، سبب بهبود معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین می‌شود و بالاترین محتوای این آلکالوئید نیز در بنه‌های آن دیده می‌شود. همچنین علیرضایی نغندر و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که سطوح متوسط کود ازتی و نیتروکسین سبب افزایش مقدار کلشی‌سین در گل حسرت می‌شود و دلیل افزایش محتوای کلشی‌سین را مربوط به افزایش تولید مواد فتوسنتزی و ارسال آن‌ها به بخش زمینی از جمله بنه دانستند که سبب افزایش محتوای رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی در آن‌ها شده است. درمورد اثر منفی افزایش ازت بر محتوای کلشی‌سین بنه طی کشت شیشه‌ای گیاه Gloriosa نشان دادند که تولید کلشی‌سین در غلظت متوسط کود ترکیبی نیترات آمونیوم، پتاسیم هیدروژن فسفات و کلرید کلسیم افزوده می‌شود و غلظت زیاده از حد ازت سبب کاهش مقدار کلشی‌سین خواهد شد (Bharathi& Philomina, 2010). این نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر در جمعیت سنگ‌درکا و کلرد است که نانوکود با غلظت پایین سبب افزایش محتوای کلشی‌سین در بنه گیاهان این رویشگاه شده است. کود ازت، محتوای کلشی‌سین در جمعیت فیل‌بند را کاهش داد. این مورد نشان می‌دهد کشت گیاهان رویشگاه فیل‌بند به منظور افزایش تولید کلشی‌سین نتیجه بخش

نبوده است و برای افزایش تولید کلشی‌سین پیشنهاد می‌شود تا از گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا و کلرد استفاده گردد. Poutaraud و Girardin (2004) در این مورد اظهار داشتند که اگر بیش از پنج گیاه در کنار هم کاشته شوند گیاه برای اجتناب از رقابت، ظریف و نازک‌تر می‌شود و وزن خشک دانه نیزکاهش می‌یابد. در بررسی حاضر، بیش از ۵ گیاه در کنار هم کاشته شده بودند که می‌توان این اثر را موجب کاهش محتوای کلشی‌سین در اعضای جمعیت فیل‌بند دانست ولی اجتناب از رقابت در بین اعضاء جمعیت کلرد و سنگ‌درکا دیده نشد. این محققین متذکر شدند که محتوای آلکالوئید در بین گیاهان هر جمعیت گل حسرت به‌واسطه آنکه در طبیعت از یکدیگر فاصله دارند با ثبات است. این دو محقق عنوان کردند که زمان نمونه برداری نیز در استحصال محتوای کلشی‌سین اثر دارد و بهترین زمان برای نمونه برداری زمان تکثیر رویشی آن‌ها است. در مطالعه حاضر نیز زمان نمونه برداری در اواخر پاییز و پایان دوره رشد رویشی گل حسرت بود که غده‌های آن‌ها بالاترین محتوای وزن تر را نشان می‌دهند و امکان بالاتر بودن محتوای کلشی‌سین در آن‌ها نیز زیادتر است.

نتیجه‌گیری

محتوای ترکیبات فنلی و کلشی سین بنه گل‌حسرت رویشگاه‌های مختلف، الگوی متفاوتی از یکدیگر نشان دادند. اگرچه تفاوت در میانگین این شاخص‌ها وابسته به رویشگاه و نوع تیمار گیاه با کودهای ازت ونانو ازت بود اما تاثیر کودهای ازت و نانو ازت بر انباشت این ترکیبات در بنه گیاهان رویشگاه‌های مختلف، یکسان نبود.

منابع

علیرضایی نغندر، مرتضی ، رضازاده شمسعلی، آروئی، حسین و محمود شور (۱۳۹۱). تأثیر سطوح مختلف کودهای زیستی و شیمیایی ازت بر عملکرد کورم و میزان کلشی‌سین در گیاه دارویی *Colchicum kotschyi* Bioss. تحت شرایط رویشگاه. فصلنامه گیاهان دارویی، سال یازدهم، دوره دوم، ویژه نامه شماره نه، بهار

معروفی،حسین (۱۳۹۶). فلور ایران. شماره ۱۴۲:تیره گل حسرت (Colchiceae) موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

Aires, A. Rosa, E. and Carvalho, R. (2006). Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. italica). Journal of the Science of Food and Agriculture.; 86:1512-1516.

Allahdadi, M., & Farzaneh, P. (2018). Influence of different levels of nitrogen fertilizer on some phytochemical characteristics of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. Journal of Medicinal Plants Studies; 6(1): 109-115.

Al-Fayyad, M. Alali, F. and Al-Tell, A. (2003). Effect of NPK fertilizer levels on morphological characteristics and productivity of *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum*, Journal of herbs, spices & medicinal plants, 4: 11-17.

Poutaraud, A. and Girardin, Ph. (2005). Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. Environmental and Experimental Botany; 54: 101–108.

Arabshahi-Delouee, S. Devi, D.V. and Urooj. (2007). A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. Food Chem; 100: 1100-5.

Awad, M.A. And De Jager, A. (2002). Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. Scientia Horticulturae.; 92:265-276.

Benzon, H.R.L. Rubenecia, M.R.U. Ultra Jr, V.U. and Lee, S.C. (2015). Nano-fertilizer affects the growth, development, and chemical properties of rice. International Journal of Agricultural Research, 7(1), 105-117.

Bharathi P and Philomina D. (2010). Effect of nutritional factors and precursors on formation of colchicine in *Gloriosa superba* in vitro. Res. In Biotechnol.; 1: 29 - 37.

Chang, C. Yang, M. Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food and Drug Analysis; 10: 178-82.

Cojocaru, A., Vlase, L., Munteanu, N., Stan, T., Teliban, G.-C., Marian, B., & Stoleru, V. (2020). Dynamic of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Yield of Rhubarb under Chemical, Organic and Biological Fertilization. Plants, 9, 355. https://doi.org/10.3390/plants9030355

David Pilbeam J. (2015). Handbook of Plant Nutrition, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, NY, USA.

Desgagné-Penix, I. and Facchini, PJ. (2011). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. In: Ashihara H, Crozier A, Komamine A, editors. Plant Metabolism and Biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons. 241-261.

Dewick, P.M. (2001). The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids In Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 2nd ed., pp. 137–186 Dewick PM, editor. Chichester: John Wiley.

Endara, M. J. Coley, P.D. (2011). The resource availability hypothesis revisited: A meta-analysis. Funct. Ecol. 25, 389–398.

Gholami, T. Peyvandi, M. Abbaspour, H. Noormohammadi, Z.and Sharifnia, F. (2020) Chemical Analysis of Population Variability in *Peganum Harmala* (var. *Harmala*). Acta Botanica Hungarica; 62:205-215

Gowda, B. G. (2014). High-performance liquid chromatographic determination of colchicine in pharmaceutical formulations and biological fluids. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(6):335-337.

Mirza, H. Fujita, M. Carvalho, M. and Thiago, A.(2020). Sustainable Crop Production. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83880-899-0.

Ibrahim, M. H. Jaafar, H. Z. Rahmat, A. and Rahman, Z. A. (2010). The relationship between phenolics and flavonoids production with total non-structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO_2 and nitrogen fertilization. Molecules (Basel, Switzerland), 16(1), 162–174.

Kiliç., I. Yesiloglu., Y. and Bayrak., Y. (2014). Investigation on the Antioxidant Activity of Roots and Stem *of Colchicum turcicum* L. Asian Journal of Chemistry; Vol. 26, No. 1, 5-9.

Kumar, A, Sharma, P.R. Mondhe, D.M. (2017). Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. Anticancer Drugs. Mar;28(3):250-262.

Liu, C., Liu, Y. M., Sun, Q. L., Jiang, C. Y., & Liu, S. J. (2015). Unraveling the kinetic diversity of microbial 3-dehydroquinate dehydratases of shikimate pathway. AMB Express, 5, 7. https://doi.org/10.1186/s13568-014-0087-y

Mansoor, A. (2004). Standardization of plant base medicines. Int. Chem.Pharm. Med. J. 1(2): 87-101.

Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. The Science of the total environment, 514C, 131-139. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104

Marchiosi, R. dos Santos, W.D. Constantin, R.P.and *et al.* (2020) Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. Phytochem Rev 19, 865–906. https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2.

Mehabadi., Sh and Karimiyan, S. M. (2018). Morphine Tolerance Effects on Neurotransmitters and Related Receptors: Definition, Overview and Update. Journal of Pharmaceutical Research International. 23(6): 1-11; Article no. JPRI.41936.

Ghasemi, V., Moghaddam, S., Rahimi, A., Pourakbar, L., & Popović-Djordjević, J. (2020). Winter Cultivation and Nano Fertilizers Improve Yield Components and Antioxidant Traits of Dragon's Head (Lallemantia iberica (M.B.) Fischer & Meyer). Plants (Basel, Switzerland), 9. https://doi.org/10.3390/plants9020252

Nogues, S. and Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plant growth under enhanced UV-B radiation. Journal of Experimental Botany 51(8): 1309-1317.

Nordenstam, B. (1998). Colchicaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The Families and Genera of Vascular Plants. Part III Flowering Plants, Monocotyledons, Lilianae (except Orchidaceae). SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 175–185.

Pettit, G. R., Melody, N., & Chapuis, J. C. (2020). Antineoplastic Agents. 607. Emetine Auristatins. J Nat Prod, 83(5), 1571-1576. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00031

Sarin. R., Rishi, A., & Kumar, A. (2010). In vivo and In vitro Estimation of Colchicine in Gloriosa 22olchi L. by High Pressure Liquid Chromatography. J. Exp. Sci. 1(4):1-2.

Roggatz, U., McDonald, A. J. Stadenberg, S. I., and Schurr, U. (1999). “Effects of nitrogen deprivation on cell division and expansion in leaves of *Ricinus communis* L,” *Plant, Cell and Environment*, vol. 22, no. 1, pp. 81–89.

Senizza, B. Rocchetti, G., Okur, M. A., Zengin, G., Yıldıztugay, E. A. k. G. Montesano, D. and Lucini, L. (2020). Phytochemical Profile and Biological Properties of *Colchicum triphyllum* (Meadow Saffron). Foods, 9, 457.

Slinkard, K., and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods.A.m J. Enol Viticult; 28: 49-55.

Stumpf, B., Yan, F., Honermeier, B. (2018) Influence of nitrogen fertilization on yield and phenolic compounds in wheat grains (*Triticum aestivum* L. ssp. aestivum). Journal of Plant Nutrition and Soil Science; 111-118

Suppan, S. (2013). Nanomaterials in soil: Our future food chain? The institute of agriculture and trade policy, Minneapolis, MN.

Wan, A., Gao, Q. and Li, H. (2010). Effects of molecular weight and degree of acetylation on the release of nitric oxide from chitosan–nitric oxide adducts. Journal of Applied Polymer Science; 117:2183-2188.

Wendelbo, P., and Stuart, D. (1985). *Colchicum* L. In: Townsend CC, Guest (eds). Agriculture and Agrarian Reform. Baghdad. Republic of Iraq.

Wu, C., Gao, Q. Kjelgren, R.K. Guo, X. and Wang, M. (2013) Yields, phenolic profiles and antioxidant activities of *Ziziphus jujuba* Mill. in response to different fertilization treatments Molecules 18: 12029 -12040.

Zhang, E. Duan, Y., Tan, F. and Zhang, S. (2016) Effects of Long-term Nitrogen and Organic Fertilization on Antioxidants Content of Tomato Fruits. J Hortic 3: 172. doi:10.4172/2376-0354.1000172.

Effect of nitrogen and nano nitrogen fertilizers on corm colchicine and phenolic compounds of *Colchicum speciosum* L. from three regions of Mazandaran

M. Babaei Naiej[1], M. Peyvandi[2*], H. Abbaspour[3], Z. Noormohammadi[3], S. Arbabian[3]

Received:2020.12.14
Accepted:2021.1.20

Abstract

Colchicum speciosum L. is a medicinal plant rich in colchicine and phenolic compounds. In this study, the effects of different concentrations of nitrogen and nano-nitrogen fertilizers on the accumulation of phenolic compounds and colchicine alkaloids were investigated in collected plants corms from three regions in Mazandaran province (Philband, Kellerd and Sangdarka). Experiments were performed with a randomized block design for five treatments including control, two levels of nitrogen fertilizer (1.1 and 2.2 mg / l), and two levels of nano-nitrogen fertilizer (1.5 and 3 mg / l) for plants of three habitats. Three months after treatments, phenolic compounds and the colchicine were extracted. The contents of phenolic compounds were measured by spectrophotometer and colchicine by HPLC. The results indicated in the plants of Filband habitat, all nitrogen and nano-nitrogen treatments caused a significant increase ($P \leq 0.05$) of total phenol content of corm. The use of nitrogen and nano-nitrogen fertilizers significantly reduced corm total flavonoid contents of all studied habitats. Nitrogen fertilizers in all populations caused a significant increase in corm total anthocyanin content, while nano-nitrogen fertilizers had no significant effect on corm total anthocyanin content. Comparison of colchicine content of control plants with treated plants showed that treatment with nitrogen fertilizers decreased and with nano-nitrogen fertilizers increased corm colchicine content. The present results showed that the contents of corm metabolites in different habitats are different from each other and the effects of nitrogen and nano nitrogen fertilizers on changing the contents of these metabolites are not the same.

Keywords: *Anthocyanin, Corm, Flavonoid, Colchicine, Colchicum speciosum, Nano-Nitrogen*

1- PhD Student, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch, Islamic Azad University
2- Associate Professor, Tehran North Branch, Islamic Azad University
*(Corresponding author: maryapeyvandi@gmail.com)
3- Associate Professor, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch, Islamic Azad University

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۲۴-۵۰
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 24-50
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2021.29444.1341

تفاوت‌های تأثیر قارچ مایکوریزا و عناصر تغذیه‌ای بر بعضی از صفات دانهال پسته در برهمکنش با بیمارگر *Phytophthora drechsleri*

الهام بابزن[۱]، مژده ملکی[*۲]، جلال غلامنژاد[۳]، فاطمه ناصری‌نسب[۴]

چکیده

پسته یکی از مهم‌ترین اقلام صادراتی ایران است. این بیماری در بیشتر مناطق پسته کاری به درخت پسته خسارت وارد می‌کند بیماری گموز با عامل Phytophthora drescleri است. قارچ‌های مایکوریزا از جمله میکروارگانیسم‌های موفق در زمینه‌ی کنترل بیولوژیک و از عوامل تأثیرگذار بر کاهش شدت بروز بیماری‌های پوسیدگی ریشه هستند. عناصر غذایی قادر به افزایش سطح تحمل یا مقاومت گیاهان به بعضی بیماری‌ها نیز هستند. در این پژوهش با استفاده از قارچ‌های مایکوریزا و عناصر غذایی مختلف به مبارزه با بیماری گموز پرداخته شد. در این مطالعه ابتدا ترکیبات سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل علیه این بیماری به‌کار گرفته‌شد. نتایج نشان‌داد که بیشترین میزان کاهش رشد قارچ بیمارگر مربوط به غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام ترکیب سولفات آمونیوم با میزان ۶۷/۱۶ درصد نسبت به شاهد بود. در بخش دوم این مطالعه تأثیر تیمارهای مختلف شامل استفاده از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم هر کدام به‌تنهایی و هم‌چنین ترکیب این دو در کاهش بیماری ناشی از بیمارگر P. drescleri بر روی صفاتی مانند وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی و همچنین میزان عناصر فسفر، نیتروژن و پتاسیم مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت میزان بیان دو ژن پراکسیداز و کاتالاز در این مطالعه ارزیابی شد. نتایج نشان داد زمانی‌که از تیمار قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم به صورت هم‌زمان استفاده شد، بیشترین وزن خشک و تر اندام هوایی و ریشه، در مورد هر دو رقم سرخس و بادامی زرند در عدم حضور بیمارگر، مشاهده‌شد. لازم به ذکر است در مورد بیان ژن نیز تیمار کاربرد همزمان سولفات‌آمونیوم و قارچ مایکوریزا بیشترین میزان بیان را نشان‌داد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، عناصر غذایی، گموز، مایکوریزا

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، تهران، ایران
۲- استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، تهران، ایران
[*](نویسنده مسئول: mojdehmaleki@gmail.com)
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
۴- دکتری بیماری‌شناسی گیاهی

مقدمه

درخت پسته اهلی (*Pistacia Vera*) متعلق به تیره‌ی Anacardiaceae است. جنس Pistacia دارای ۱۱ گونه است که همگی آن‌ها از خود تربانتین یا سقز ترشح می‌کنند. ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان محصول پسته در دنیا با سطح زیر کشت حدود ۴۰۰ هزار هکتار است (شیبانی، ۱۹۹۴).

آفات و بیماری‌ها در باغات پسته سبب کاهش رشد رویشی و محصول درخت می‌شوند. پوسیدگی ریشه و طوقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان پسته است که باغداران اغلب آن را به نام گموز[1] یا شیره‌ی سیاه می‌شناسند. این بیماری توسط گونه‌های مختلف قارچ *Phaytophtora* در درختان پسته ایجاد می‌شود. درختان پسته در تمام مراحل رشد به این بیماری مبتلا می‌شوند. در اندام هوایی درختان بیمار نشان‌هایی مانند ضعف، کم رشدی، زردی، پژمردگی و در نهایت علایم سبز خشکی مشاهده می‌شود. در درختان دارای پوسیدگی، طوقه پوست درخت در محل اتصال تنه به ریشه قهوه‌ای تا سیاه رنگ، و شکاف‌هایی در آن دیده می‌شود. در ریشه‌های مسن آلوده ناحیه پوست و استوانه‌ی مرکزی ریشه و طوقه به رنگ قهوه ای تیره تا سیاه در می‌آید و دچار پوسیدگی می‌شود و ریشه‌های کوچک‌تر نیز در نهایت از بین می‌روند (Morandi, 1996). در حال حاضر از میزان خسارت این بیماری در درختان پسته اطلاع کاملی در دست نیست، اما با توجه به مرگ و میر شدید درختان بیمار و خسارت زیاد به باغداران، اهمیت استفاده از روش‌های نوین در مدیریت این بیماری نمایان‌تر می‌شود. کنترل این بیماری مبتنی بر روش‌های کنترل زراعی و شیمیایی می باشد. استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی باعث معضل باقیمانده‌های سموم در محصول پسته، آلودگی خاک و آب مناطق پسته‌کاری می گردد. بنابراین پژوهشگران به دنبال روش‌های جایگزین به جای استفاده از سموم شیمیایی بوده‌اند (Banihashemi, 1984). روش‌های مختلفی برای مدیریت بیماری‌های ناشی از قارچ *Phytophtora* در مناطق یا باغ‌های آلوده پیشنهاد شده است ولی بیشترین تأکید بر روی استفاده از ارقام مقاوم و پیشگیری می‌باشد. یکی از مهم‌ترین موارد در خصوص بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، بافت و ساختمان خاک و چگونگی قرار گرفتن لایه‌های خاک در یک باغ آلوده می باشد که شدت و خسارت بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Teviotdale *et al*., 2002).

از روش های دیگری که برای مبارزه با بیماری می توان به آن اشاره نمود معالجه‌ی قسمت‌های آلوده طوقه و ریشه درختان با استفاده از قارچ‌کش‌های مختلف همچون مخلوط بردو، اکسی کلراید مس و یا قارچکش های موثر دیگر می باشد که به‌طور معمول توسط باغداران استفاده می‌شود (Morandi, 1996). در سال‌های اخیر کنترل‌زیستی بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست مطرح و مورد توجه واقع شده است. این میکروارگانیسم ها که در ناحیه‌ی ریزوسفر زندگی می‌کنند، به عنوان سدی دفاعی علیه بیمارگرهای خاکزی و گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیک هستند

[1] Gummosis

(Weller, 1988). قارچ‌های مایکوریزا از جمله میکروارگانیسم‌های موفق در زمینه‌ی کنترل بیولوژیک و از عوامل تأثیرگذار بر کاهش شدت بروز بیماری‌های پوسیدگی ریشه هستند که به دلیل رقابت با عامل بیماری برای اشغال ریشه و افزایش شاخص‌های رشدی، اثرات مخرب ناشی از بیماری را کاهش می‌دهند. گزارش شده است رقابت برای تلقیح ریشه در گیاهان، آنتی‌بیوز مستقیم، فعال شدن مسیرهای دفاعی گیاهی، تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین بالا رفتن فعالیت بعضی از آنزیم‌های پاداکساینده در گیاه میزبان قارچ مایکوریزا مورد مشاهده قرار گرفته است (Fillion *et al*., 2003).

کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ مایکوریزا و انتقال بهتر عناصر مذکور به نهال‌های پسته باعث جذب بیشتر عناصر به وسیله‌ی گیاه می‌شود. قارچ‌های مایکوریزا روی غلظت عناصر پتاسیم، نیتروژن و فسفر در ریشه و اندام‌های هوایی تاثیر می گذارد و باعث افزایش جذب عناصر توسط ریشه‌ها و انتقال آن‌ها به اندام های هوایی نسبت به نهال‌های شاهد می‌شود. این موضوع توسط محققین مختلف روی سایر محصولات کشاورزی نیز گزارش شده است (Turnau *et al*., 2001).

درخت پسته با توجه به قابلیت رشد در اکوسیستم‌های گرم و خشک، خاک‌های نسبتاً شور و تحمل به آبیاری شور قابلیت همزیستی بالایی با قارچ‌های مایکوریزا دارد. بنابراین با استفاده از پتانسیل این قارچ‌ها در افزایش رشد، تحمل به شوری و تحمل به تنش‌های آبی می‌توان شرایط مناسب‌تری برای کشت محصولات کشاورزی از جمله پسته فراهم نمود (Bagheri *et al*., 2012).

تغذیه‌ی صحیح گیاه یکی از عوامل مهم در بهبود کمی و کیفی محصول به‌شمار می‌رود. تمامی عناصر غذایی، سلامتی گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و حساسیت آن‌ها را به بیماری‌های گیاهی نیز تحت الشعاع قرار می‌دهند (Mengel *et al*., 2001). گیاهان تحت تأثیر یک تنش تغذیه‌ای به بیماری‌های گیاهی بسیار حساس می‌باشند و این در حالی است که میزان تغذیه‌ی کافی برای گیاهان آن‌ها را به بیماری‌ها مقاوم‌تر می‌نماید (Barker & Pilbeam, 2006). عناصر غذایی می‌توانند اثر مهمی بر تمام جنبه‌های چرخه بیماری داشته باشند. عناصر غذایی قادرند محیط‌زیست را تحت تأثیر قرار دهند، چرا که این عناصر سیستم خاکی و توانایی گیاهان برای مقاومت به شرایط متنوع آب و هوایی را تغییر می‌دهند.

همزیستی قارچ مایکوریزا با درختان مختلف در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. نتایج مطالعات محققان دیگر نشان داد که پس از بررسی ارقام مختلف نهال‌های پسته پنج ساله در باغ‌های ایالت کالیفرنیا، بیش از ۵۰٪ سیستم ریشه‌ای آن‌ها همزیستی مایکوریزایی دارند (Shamshiri and Fattahi, 2016). تحقیقی با عنوان کارایی سویه‌های بومی *Trichoderma harzianum* در بیوکنترل گموز پسته در استان های کرمان، یزد، خراسان رضوی و سمنان انجام شد. پس از تعیین میزان کارایی‌های تریکودرما در آزمایشگاه به روش کشت متقابل با *Phytophthora melonis*، برهمکنش آن‌ها با قارچ بیمارگر در آزمایشگاه با ارزیابی تداخل فیزیکی هیف، ترشحات فرار و غیرفرار و آزمایش‌های گلخانه ای انجام گرفت. در برهمکنش با

تریکودرما رشد رویشی قارچ *P. melnis* در سطوح مختلف تحت تاثیر قرار گرفت و در سطح معنا داری کاهش یافت (Fani *et al*., 2015).

اثرات متقابل بین گیاهان، عناصر غـذایی و عوامـل بیمـاری زای گیـاهی پیچیده و تا حدودی ناشناخته است. با وجود ناشـناخته بـودن ایـن نـوع اثرات، مباحث مربوط به نقش عناصر غذایی در بروز بیماری‌های گیاهی، در اولویت برنامه های کنترل قرار دارد. در بسیاری از خاک‌هـا و محـیط‌کشت گیاهان، عوامل بیمـاری‌زای زیـادی یافـت مـی شـوند. در چنـین شرایطی، گیاهانی که از کمبود عناصـر غـذایی رنـج مـی برنـد مقاومـت کمتری دارند و به انواع مختلف عوامل بیماری زا حساس تـر هسـتند. از این رو تمام عناصر غذایی قادرند بروز بیماری در گیاهان را تحـت تـأثیر قرار دهند. برخی از عناصر غذایی اثر بیشتر و مستقیمی بر بروز بیمـاری‌های گیاهی دارند. بنابراین توانایی گیاه برای بیان این پتانسیل ژنتیکی یعنـی مقاومت به بیماری می‌تواند تحت تأثیر عناصر غذایی قرار گیرد (Reise *et al*., 1982). گونه‌ها یا ارقامی که مقاومت ژنتیکی بالایی به بیماری دارند، ممکن است نسبت به گیاهان مقاوم به بیماری با تغییر عناصر غذایی، کمتـر تحـت تـأثیر قرار گیرند (Cherif *et al*., 1992). همچنین گیاهانی که از نظر ژنتیکی بسـیار حساس هسـتند ممکن است حساس باقی بمانند لیکن بـا تغذیـه مناسـب قادرنـد اثـرات ناشی از عامل بیماری زا را کم و در برابر بیماری مقاومت کنند. محققان خاطر نشان نمودند که شدت بسیاری از بیماری‌ها می‌توانـد کم شود و کنترل شیمیایی، بیولوژیکی یا ژنتیکی بسـیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی با تغذیه مناسب تقویت می‌شود. از این رو توصیه هـای کـودی بدین سبب انجام می گیرد که جذب عناصر غذایی بهینه و محصولی با بالاترین عملکرد تولید شود. در بسیاری از موارد، توصیه‌های کودی مناسب، محصول را در برابر بیماری‌ها مقاوم می کند (Menzies and Belanger, 1996).

با توجه به اینکه بیماری گموز همواره به گیاه پسته خسارت فراوان وارد می‌کند، و از جهت دیگر استفاده از سموم قارچکش باعث ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی و همچنین بیماری‌های خطرناک در انسان و دام می‌شود، لذا در این مطالعه با استفاده از ترکیبات غذایی و استفاده از قارچ مایکوریز به مدیریت این بیماری پرداخته شده است. در این مطالعه ابتدا تأثیر ترکیبات غذایی در محیط کشت بر روی بیماری بررسی شد و سپس تأثیر قارچ مایکوریزا و ترکیبات غذایی بر روی صفات مختلف از جمله وزن تر و خشک ساقه و ریشه، میزان عناصر نیتروژن، پتاسیم و فسفر بررسی شد. در نهایت میزان بیان نسبی دو ژن کاتالاز و پراکسیداز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌ی بیمارگر

عامل بیمارگر *Phytophthora drechsleri* از درختان آلوده در منطقه‌ی ورامین (ایزوله‌ی V6) جداسازی شد و در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. که گونه‌ی فوق بر اساس مشخصات مورفولوژیکی اندام‌های تولیدمثل جنسی و غیرجنسی تشخیص داده شد.

برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح بیمارگر *P. drechsleri* از فلاسک‌های حاوی برنج استفاده شد. ۲۵ گرم برنج در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری محتوی ۱۵ میلی‌لیتر آب ریخته شد. فلاسک‌ها طی دو روز متوالی هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار یک اتمسفر استریل شدند، سپس شش قرص میسلیومی از پرگنه‌های جوان (سه روزه) کشت داده شده بر روی محیط CMA [1] برداشته و به هر فلاسک اضافه شد. فلاسک‌ها به مدت سه هفته در ۲۵ در جه‌ی سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند (Holmes & Benson, 1994).

تهیه خاک

خاک مورد استفاده به نسبت ۲:۱ به ترتیب خاک بکر از مناطق پسته کاری ورامین و ماسه شسته شده از مزرعه کشاورزی تهیه شد. نمونه‌های خاک به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر قرار گرفتند و پس از سرد شدن گلدان‌های یک کیلوگرمی به اندازه‌ی سه چهارم حجم گلدان با آن پر شدند.

آزمون بیماری‌زایی

به‌منظور اثبات بیماری‌زایی از گیاهچه‌های دو ماهه پسته رقم سرخس استفاده شد. مایه‌زنی با اضافه کردن پنج گرم مایه‌ی تلقیح عامل بیماری به ازای یک کیلوگرم خاک در هرگلدان انجام شد. برای تیمار شاهد از برنج سترون شده بدون عامل بیماری استفاده شد. نتایج یک تا پنج هفته با ارزیابی پیشرفت بیماری و کشت بافت آلوده بر محیط‌های کشت نیمه انتخابی بررسی شدند. آزمون‌های این تحقیق در دو قسمت آزمون‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی انجام شد.

---

[1] Corn Meal Agar

آزمون آزمایشگاهی

عناصر غذایی

عناصر غذایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت شامل ترکیبات سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل بودند که هر کدام از آن‌ها در سه غلظت ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی سولفات آمونیوم انتخاب شد و در غلظت ۱/۵٪ و همراه با قارچ مایکوریزا در تیمارهای گلدانی مورد استفاده قرار گرفت.

در این آزمون پس از تهیه‌ی محیط کشت CMA، ترکیبات غذایی به محیط‌کشت در داخل ظرف پتری اضافه شدند، محیط‌کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سولفات‌آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۵۰۰ و۲۵۰۰ پی‌پی‌ام بودند. محیط‌کشت پایه (CMA) پس از تهیه، در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار یک اتمسفر و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت، و سترون شد. ظرف حاوی محیط کشت در دمای اتاق قرار داده شد و زمانی‌که دمای آن به حدود ۴۵ درجه‌ی سلسیوس رسید، ترکیبات غذایی در غلظت‌های مورد نظر به آن‌ها اضافه شدند. محیط‌های تهیه شده بلافاصله درون پتری‌های یکبار مصرف به قطر نه سانتی‌متر تقسیم شدند و اجازه داده شد تا محیط‌ها منعقد شوند. سپس دیسک‌های قارچ به قطر پنج میلی‌متر از کشت‌های یک هفته‌ای تهیه و در قسمت وسط پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. بعد از این مرحله ظروف پتری در انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند تا زمانی که سطح ظروف پتری شاهد توسط قارچ اشغال شود (هر ۲۴ ساعت یکبار اندازه گیری شد). قطر پرگنه‌ها پس از گذشت ۲۴، ۷۲ ، ۹۶ ساعت و تا پایان آزمایش اندازه‌گیری شد. این آزمایش با سه تکرار در مورد هر غلظت انجام شد. محاسبه درصد جلوگیری از رشد میسلیوم و تجزیه و تحلیل آماری بر اساس معادله ۱ (Gholamnejad *et al*., 2010) صورت گرفت.

معادله(۱)

$$\text{درصد جلوگیری از رشد میسلیوم} = ۱۰۰ \times \frac{\text{میانگین قطر میسلیوم در تیمار} - \text{میانگین قطر میسیلیوم در شاهد}}{\text{میانگین قطر میسلیوم در شاهد}}$$

آزمون گلخانه‌ای

گیاهان و قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق

در این تحقیق از دو پایه‌ی پسته سرخس و بادامی زرند استفاده شد. بذر پایه‌های سرخس و بادامی زرند از نهالستان‌های شهرستان رفسنجان تهیه شد.

قارچ مایکوریزا (Myco Root) مخلوطی از سه گونه‌ی *Glomus mosea*، *G. etunicatum* و *G. intraradices* است و از موسسه‌ی آب و خاک کرج دریافت شدند.

آماده‌سازی گلدان‌ها و دانهال‌ها

در این تحقیق از گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۲۰ cm با قطر دهانه ۲۳ cm استفاده شد. وزن هر گلدان خالی ۱۹۴ گرم بود و به هر گلدان ۶ کیلوگرم خاک الک شده اضافه گردید.

بذر گیاه پسته از رفسنجان خریداری شد. در مرداد ماه ۱۳۹۶ در گلدان‌های مذکور این بذورکشت داده (در هر گلدان سه بذر پسته) شدند و در طی سه هفته در مرحله‌ی ۴-۳ برگی شدند و رطوبت گلدان‌ها ۸۰ درصد FC نگه داشته شد. میانگین دما در زمان نگهداری حدوداً ۲±۲۲ و ۲±۱۸ درجه‌ی سلسیوس در روز و شب بود. گلدان‌ها به طور متوسط ۱۶ ساعت در نور و هشت ساعت در تاریکی نگهداری شدند.

بذور پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد، در پارچه مرطوب و در دمای مناسب برای جوانه زنی در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد بذور جوانه زده شده در گلدان‌هایی حاوی شش کیلوگرم خاک کشت و همزمان مایه‌کوبی گیاه با قارچ مایکوریزا در دو سطح ۴۰ گرم به ازای هر گلدان انجام شد (برای هر دو سطح حداقل ۱۰۰۰ پروپاگول قارچ به محیط ریشه اضافه شد). در طول دوره رشد آبیاری در ظرفیت مزرعه FC به روش وزنی انجام شد (Shamsi et al., 2019).

دو ماه بعد از مایه‌زنی با قارچ مایکوریزا و اطمینان از کلنیزاسیون ریشه‌ها، گیاهان موردنظر با عامل بیمار گر *P. drechsleri* تکثیر شد و بر روی برنج در گلدان‌ها مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی مقداری از خاک سطحی گلدان‌ها برداشته و دور تا دور گلدان‌ها شیارها ایجاد شد تا ریشه نهال‌ها نمایان شود. برای هر گلدان ۲۰ گرم مایه‌ی قارچ به صورت یکنواخت داخل شیارها ریخته شد و سپس خاک برداشته شده از گلدان‌ها روی مایه قارچ ریخته شد. با افزودن آب مقطر، گلدان‌ها به صورت غرقاب در آمده و ۲۴ ساعت در این حالت قرار گرفتند. پس از این مدت سوراخ کوچکی در ته گلدان‌ها ایجاد شد تا آب اضافی از گلدان‌ها خارج شود. ۱۰۰میلی لیتر از این زه‌آب (آب خروجی از ته گلدان) برداشته شد و برای ردیابی زئوسپورهای قارچ مورد استفاده قرار گرفت. آبیاری گلدان هر سه روز یکبار و بلافاصله با خشک شدن سطح خاک انجام گرفت.

اعمال تیمار کود سولفات آمونیوم

بر اساس نتایج آزمایشگاهی و تأثیر مثبت این کود بر جلوگیری از رشد قارچ این تیمار انتخاب شد و به صورت محلول پاشی بر روی برگ در غلظت‌های یک و نیم درصد مورد استفاده قرار گرفت. محلول پاشی بر روی گیاهان مورد تیمار هر دو هفته یکبار تا پایان آزمایش انجام گرفت. محلول‌پاشی گیاهان هم‌زمان با تلقیح ریشه‌های گیاهان با مایکوریزا انجام گرفت.

پنج ماه بعد از کشت اولیه بذور پسته و هم‌زمان با از بین رفتن گیاهان آلوده به بیمارگر که هیچ‌گونه تیماری بر روی آن‌ها اعمال نشده بود، آزمایش پایان یافت و سپس نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری بعضی از پارامترها از گیاهان صورت گرفت.

صفات مورد اندازه‌گیری

اندازه گیری فعالیت بیمارگر

برای تعیین درصد تشکیل کلونی *P. dreschleri* از هر تیمار چهار قطعه‌ی حداکثر یک سانتی‌متری از ریشه‌ها به صورت تصادفی جدا شدند و پس از شستشو با آب و خشک کردن لابه‌لای دستمال کاغذی استریل، بر روی محیط CMA-PARP کشت داده شدند.

وزن تر و خشک (اندام هوایی و ریشه)

بلافاصله بعد خارج کردن گیاهان از خاک، کل گیاهان به آزمایشگاه انتقال داده شدند و پس از شستشوی اندام هوایی و ریشه‌ها جدا گردید، بلافاصله وزن تر هر یک اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها داخل پاکت جداگانه گذاشته و داخل آون ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در نهایت نمونه‌های خشک شده از آون بیرون آورده شد و وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز به‌طور جداگانه با ترازوی با دقت یک صدم اندازه‌گیری شد (Gholamnejad *et al*., 2010).

اندازه‌گیری عناصر غذایی

برای اندازه‌گیری یون پتاسیم قسمت‌های هوایی هر گیاه به طور جداگانه با آب مقطر شسته شد. بافت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس آون خشک شد، پس از چهار روز آسیاب و پودر شدند. سپس برای اندازه‌گیری یون پتاسیم یک گرم از پودر خشک هر نمونه وزن و در کروزه چینی در دمای ۵۵۰ در جه سلسیوس پس از ۵ ساعت به خاکستر تبدیل شد. پس از عصاره‌گیری با کلریدریک اسید دو نرمال طبق روش چاپمن و پرت (Chapman and Pratt, 1961) مقدار پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتـومتر (مدلModel PEP7, Jenway, Dunmow, UK) خوانده شد و اندازه‌گیری فسفر با استفاده از دستگاه اسـپکتروفتومتر (مدل Jenus) انجام شد (Chapman & Pratt, P.F. 1961). برای اندازه‌گیری نیتروژن کل خاک از روش کجلدال (Bakhshi-V40، ساخت ایران) استفاده شد (Mulvaney & Bremner, 1982).

اندازه‌گیری بیان ژن‌های دفاعی

بررسی میزان بیان بعضی از ژن‌های دفاعی در سطح نسخه‌برداری

دانهال‌های پسته مانند بند قبل تیمار شدند. بعد از اینکه دانهال‌ها با قارچ بیمارگر تیمار شدند و بعد از پایان یافتن آزمایش برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها، نمونه‌برداری از رقم بادامی زرند تحت تیماری مختلف، انجام گرفت. دانهال‌های پسته مانند آزمون انداه‌گیری عناصر تیمار شدند، و نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها در روزهای مذکور انجام گرفت. بعد از نمونه-برداری، برگ های نمونه برداری شده تا زمان استفاده در نیتروژن مایع قرار داده و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

برای استخراج RNA کل، نمونه‌ها از فریزر خارج شدند و استخراج RNA توسط کیت RNXplus (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام پذیرفت (Gholamnezhad *et al*., 2016).

ساخت cDNA توسط آنزیم رونویسی معکوس

ساخت رشته‌ی cDNA از روی mRNAهای کل سلول با استفاده از آغازگر Oligo- (dt)18 تعبیه شده در کیت RevertAid Reverse Transcriptase (شرکت Thermo Scientific، آلمان) و بر اساس دستورالعمل ارایه شده در کیت انجام شد.

به منظور اطمینان از عدم آلودگی RNA به DNA ژنومی، قبل از ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR با RNAی استخراجی انجام شد و در مورد هیچ یک از RNAهای استخراجی، باندی در واکنش PCR آن‌ها مشاهده نشد.

بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش Real time –PCR

الگوی بیان دو ژن شامل ژن‌های رمز کننده‌ی کاتالاز، پراکسیداز در سطح نسخه‌برداری با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱) و روش PCR کمی از نوع کمیت‌سنجی نسبی بررسی شدند. ژن توبولین به عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد. تکثیر cDNA در واکنش کمی PCR از نوع کمیت‌سنجی نسبی، بر طبق دستورالعمل کیت YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (یکتاتجهیزآزما، ایران) و با استفاده از ترموسایکلر ویژه PCR کمی (Corbett RG-6000) انجام گرفت. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد (Livak *et al*., 2001). بلافاصله بعد از انجام واکنش Real time PCR، محصول واکنش روی ژل Run شد و از کارکرد اختصاصی واکنش اطمنیان حاصل شد. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر زمان واقعی (Corbett RG-6000) بررسی شد.

میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب بر اساس ژن توبولین (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.

میانگین مربوط به هر ژن در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار زیستی و دو تکرار روشی) تجزیه واریانس شد. نتایج به دست آمده از Real time RT -PCR با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SAS ver.9 انجام گرفت. داده ها بر اساس آزمون Kurtosis و Skewness نرمال بودند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real time PCR

Name of genes	Primers seqences	طول قطعه
Catalase	F: TTTCGCCGTCAAGACTTACA R: ATGAAGAAGACGGGGAAG TT	۱۵۶
Peroxidase	F: GATCTTCGTGCTCGTGGAGA R: TGTAAATGTTTTGCTGTCAG	۱۷۶
Tubolin-α	F: GCTTTCAACACCTTCTTCAG R: GGGGCATAGGAGGAAAGCA	۲۱۰

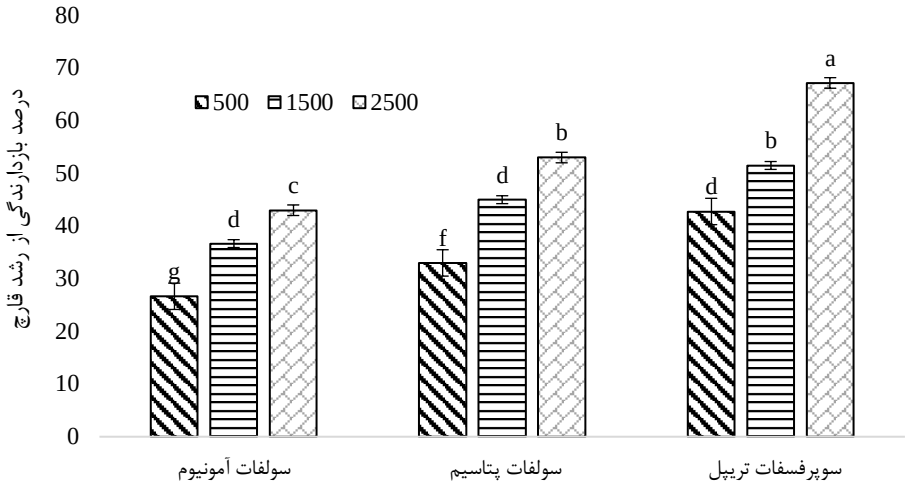
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد و در نهایت رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

تأثیر عناصر غذایی بر کاهش رشد بیمارگر در محیط کشت

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (داده‌ها نشان داده نشده است) مشخص شد که بین تیمارهای مختلف (شامل عناصر غذایی مختلف و غلظت‌های آن‌ها) بر کاهش رشد قارچ از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت عناصر غذایی در ترکیبات مختلف میزان رشد قارچ در مورد هر سه ترکیب سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل کاهش پیدا کرد (نمودار ۱). بیشترین میزان کاهش رشد قارچ بیمارگر مربوط به غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام ترکیب سولفات آمونیوم با میزان ۶۷/۱۶ درصد نسبت به شاهد بود. غلظت‌های ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از سولفات پتاسیم، ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام از سولفات آمونیوم و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام از سوپرفسفات تریپل به ترتیب با میزان کنترل ۵۳/۲، ۵۱/۱۲ و ۴۵/۴۲ درصد کاهش رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد در رتبه‌های بعدی قرار داشتند، (نمودار ۱). کمترین درصد کاهش رشد بیمارگر نسبت به شاهد در مورد هر سه ترکیب سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل مربوط به غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب با میزان ۴۲/۸۶، ۳۳ و ۲۶/۶۶ درصد بود.



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین اثر تیمارهای مختلف شامل غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات تریپل بر میزان رشد بیمارگر در محیط کشت، اعداد میانگین چهار تکرار و برحسب درصد هستند که نسبت به شاهد سنجیده شده‌اند.

وزن تر و خشک (اندام هوایی و ریشه)

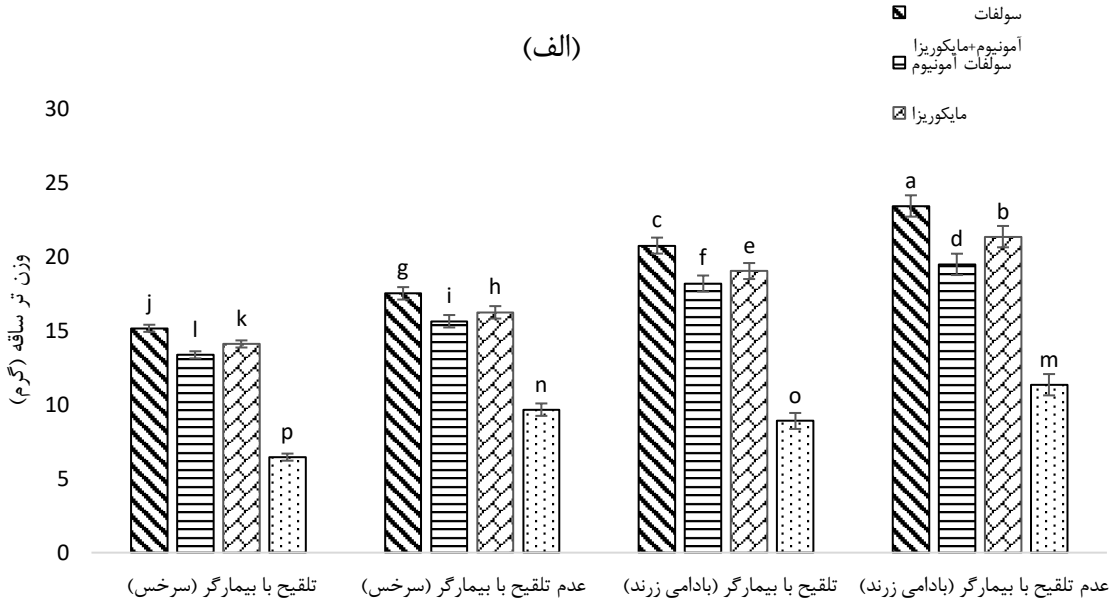
بر اساس نتایج تجزیه واریانس (داده‌ها نشان داده نشده است) مشخص شد که بین تیمارهای مختلف (استفاده جداگانه از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم و همچنین کاربرد همزمان آن‌ها در حضور و عدم حضور بیمارگر و همچنین شاهد در مورد دو رقم سرخس و بادامی) از لحاظ تأثیر بر افزایش وزن تر و خشک ریشه و همچنین اندام هوایی از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

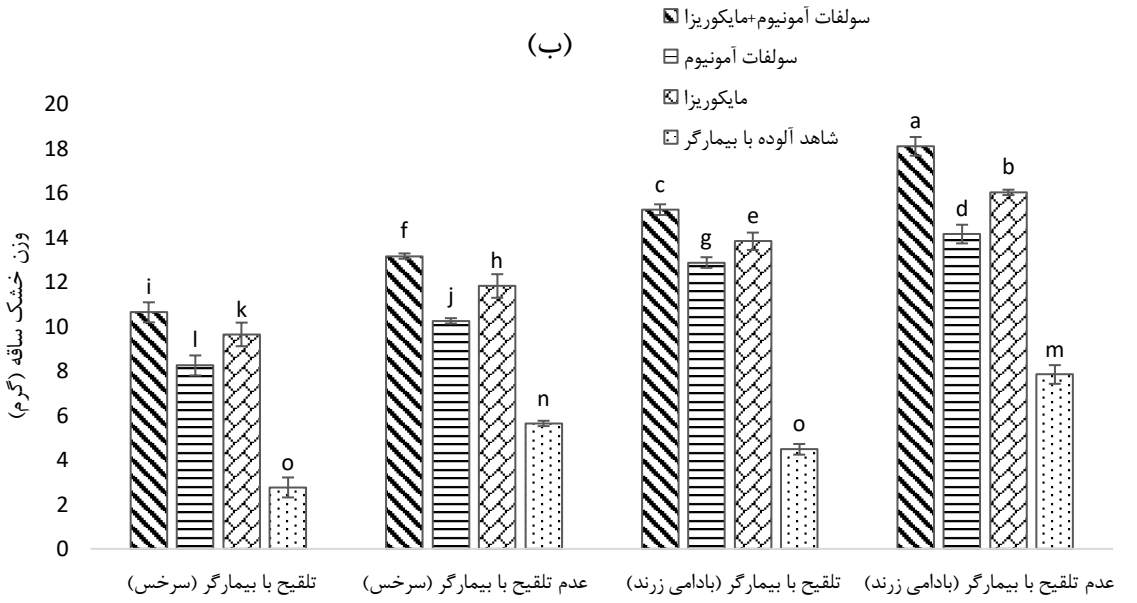
در مورد صفت وزن‌تر اندام هوایی، تیمار استفاده‌ی توأم قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر و در مورد رقم بادامی زرند با مقدار ۲۳/۴۱ گرم بیشترین مقدار را در بین تیمارها نشان داد که این مقدار با سایر مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار بود و در بالاترین سطح آماری قرار داشت و بعد از آن تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به تنهایی روی رقم بادامی زرند در عدم حضوربیمارگر به میزان ۲۱/۳۴ گرم بود. (نمودار ۲ الف). تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر و روی بادامی زرند رتبه‌ی سوم را با میزان ۲۰/۷۳ گرم به خود اختصاص داد. کمترین میزان وزن تر در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهدهای آلوده و سالم به ترتیب با میزان گرم ۶/۴۵، ۹/۶۵ (رقم سرخس) ۸/۸۹، ۱۱/۳۴ (مربوط به رقم بادامی زرند) بود و بعد از آن تیمار سولفات آمونیوم به ترتیب در حضور بیمارگر و عدم حضور بیمارگر با مقادیر ۱۴/۰۹ و ۱۶/۲۲ گرم (رقم سرخس)، ۱۸/۱۷ و ۱۹/۴۶ گرم (رقم بادامی زرند) قرار داشتند.

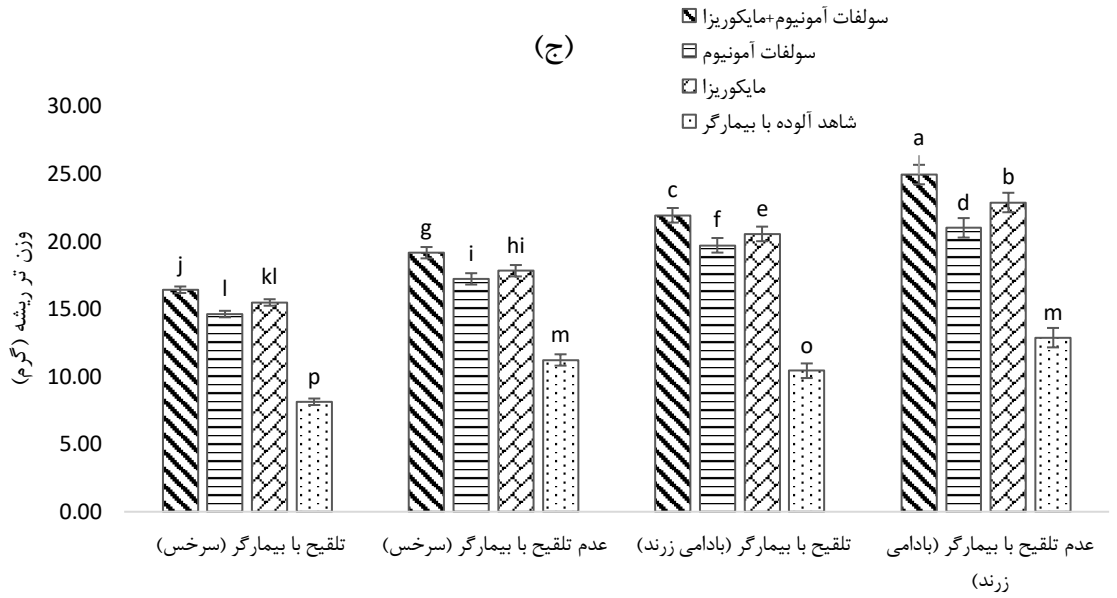
تیمار استفاده‌ی توأم قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر و در مورد رقم بادامی زرند با مقدار ۲۳/۴۱ گرم بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی را نشان داد، که این مقدار با سایر مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار بود و در

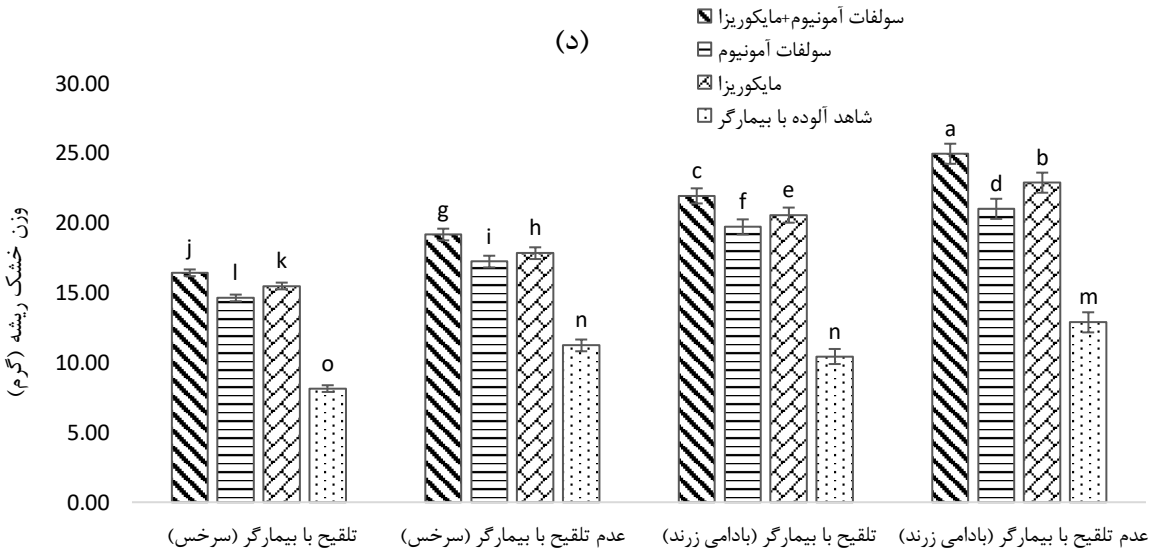
بالاترین سطح آماری قرار داشت و بعد از آن تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به تنهایی روی رقم بادامی زرند در عدم حضوربیمارگر به میزان ۱۶/۰۲ گرم بود (نمودار ۲ ب). تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر و روی بادامی زرند رتبه‌ی سوم را با میزان ۹/۷۶۳ گرم به خود اختصاص داد. کمترین میزان وزن خشک در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهدهای آلوده و سالم به ترتیب با میزان گرم ۳/۷۶، ۵/۴۳ (رقم سرخس) ۴/۴۷، ۷/۸۳ (مربوط به رقم بادامی زرند) بود و بعد از آن تیمار سولفات آمونیوم به ترتیب در حضور بیمارگر و عدم حضور بیمارگر با مقادیر ۸/۲۴ و ۱۰/۲۸ گرم (رقم سرخس)، ۱۲/۸۴ و ۱۶/۰۲ گرم (رقم بادامی زرند) قرار داشتند.

در مورد وزن تر و خشک ریشه روند مانند وزن تر و خشک اندام‌هوایی بود. در مورد وزن تر ریشه، تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در رقم بادامی در عدم حضور بیمارگر بیشترین مقدار را (۲۱/۹۳ گرم) نشان داد. بعد از این تیمار، به ترتیب تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا در عدم حضور بیمارگر و سپس تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر هر دو روی بادامی زرند، به ترتیب با مقادیر ۲۲/۸۸ و۲۱/۹۳ گرم، بیشترین مقادیر را نشان دادند. تیمار استفاده‌ی توأم قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر در رقم بادامی زرند (۱۸/۷۵ گرم) بیشترین مقدار وزن خشک را نشان داد، که این مقدار با سایر مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار بود و در بالاترین سطح آماری قرار داشت و بعد از آن تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به تنهایی روی رقم بادامی زرند در عدم حضوربیمارگر به میزان ۱۶/۶۸ گرم بود (نمودار ۲). تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر در رقم بادامی زرند رتبه‌ی سوم را با میزان ۱۵/۷۳ گرم به خود اختصاص داد. کمترین میزان وزن تر و خشک ریشه در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهد آلوده و سپس شاهد سالم بود (نمودار ۲ ج و د).


(الف)
سولفات
آمونیوم+مایکوریزا
سولفات آمونیوم
مایکوریزا
وزن تر ساقه (گرم)
30
25
20
15
10
5
0
j l k p
g i h n
c f e o
a d b m
تلقیح با بیمارگر (سرخس)
عدم تلقیح با بیمارگر (سرخس)
تلقیح با بیمارگر (بادامی زرند)
عدم تلقیح با بیمارگر (بادامی زرند)


(ب)
سولفات آمونیوم+مایکوریزا
سولفات آمونیوم
مایکوریزا
شاهد آلوده با بیمارگر
وزن خشک ساقه (گرم)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
i l k o
f j h n
c g e o
a d b m
تلقیح با بیمارگر (سرخس)
عدم تلقیح با بیمارگر (سرخس)
تلقیح با بیمارگر (بادامی زرند)
عدم تلقیح با بیمارگر (بادامی زرند)





نمودار ۲: مقایسه‌ی میانگین مربوط به آزمون تأثیر تیمارهای مختلف شامل ارقام (سرخس، بادامی زرند)، قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور و عدم حضور بیمارگر بر وزن تر وخشک ریشه و ساقه‌ی پسته، اعداد نمودارها میانگین چهار تکرار، وزن (بر حسب گرم) است. تیمارهایی که با حروف مختلف در ستون‌ها نشان داده‌شده‌اند در آزمون دانکن ($P<0.01$) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند.

پتاسیم، فسفر و نیتروژن

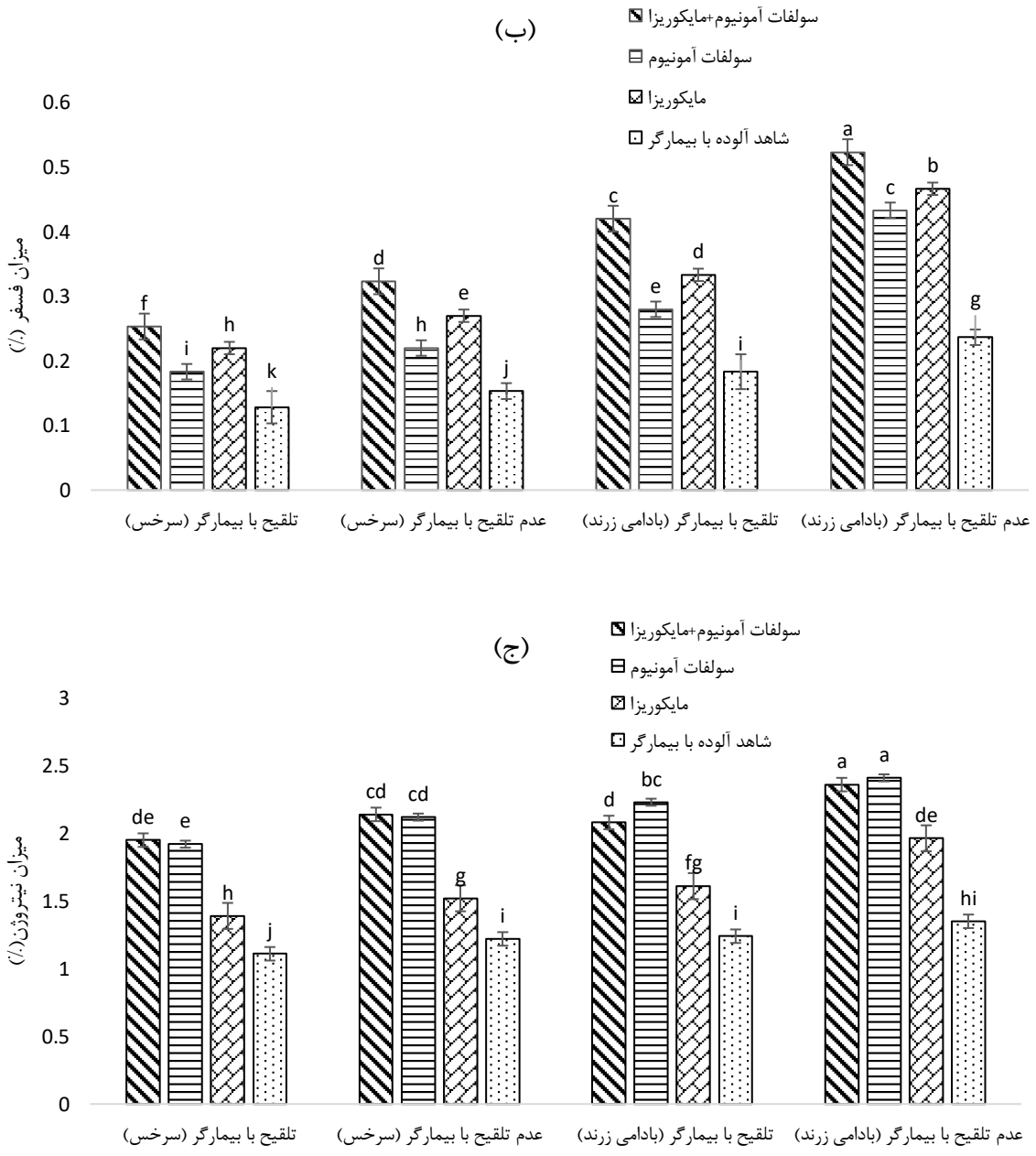
نتایج تجزیه واریانس (داده‌ها نشان داده نشده است) نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ تأثیر بر میزان پتاسیم، فسفر و نیتروژن از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

اعمال تیمارهای مختلف باعث ایجاد تغییراتی در میزان پتاسیم شد، به‌نحوی که تیمار استفاده‌ی توأم قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر و در مورد رقم بادامی با میزان ۱/۵۳درصد بیشترین مقدار پتاسیم را با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر تیمارهای استفاده شده در این تحقیق، نشان داد و بعد از آن تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به‌تنهایی روی رقم بادامی در عدم حضور بیمارگر به میزان ۱/۴۲ درصد بود (نمودار ۳ الف). تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر و روی رقم بادامی میزان ۱/۲۹ درصد در جایگاه سوم از نظر میزان پتاسیم قرار گرفت. کمترین میزان پتاسیم در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهدهای آلوده و سالم به ترتیب با میزان ۰/۷۵، ۰/۸۵ (رقم سرخس) ۰/۹۲، ۰/۹۷ درصد (مربوط به رقم بادامی زرند) بود و بعد از آن تیمار سولفات آمونیوم به ترتیب در حضور بیمارگر و عدم حضور بیمارگر با مقادیر ۰/۸۵ و ۱/۰۰ درصد (رقم سرخس)، ۱/۰۹ و ۱/۳۵ درصد (رقم بادامی زرند) قرار داشتند.

میزان فسفر نیز مانند پتاسیم تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده قرار گرفت، به نحوی که تیمار استفاده‌ی توأم قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر و در مورد رقم بادامی با میزان ۰/۵۲ درصد بیشترین مقدار فسفر را با اختلاف معنی دار نسبت به سایر تیمارهای استفاده شده در این تحقیق نشان داد، و بعد از آن تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به تنهایی روی رقم بادامی در عدم حضور بیمارگر به میزان ۰/۴۶ درصد بود (نمودار ۳ ب). تیمار استفاده از سولفات آمونیوم به تنهایی بر رقم بادامی در عدم حضور بیمارگر و همچنین تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در حضور بیمارگر در رقم بادامی به ترتیب با مقادیر ۰/۴۳ و ۰/۴۲ درصد رتبه‌ی سوم را از آن خود کردند. کمترین میزان فسفر در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهدهای آلوده و سالم به ترتیب با میزان ۰/۱۲، ۰/۱۵ درصد رقم سرخس ۰/۱۸، ۰/۲۳ درصد (مربوط به رقم بادامی زرند) بود و بعد از آن تیمار سولفات آمونیوم به ترتیب در حضور بیمارگر و عدم حضور بیمارگر با مقادیر ۰/۱۸ و ۰/۲۲ درصد (رقم سرخس)، ۰/۲۸ درصد (رقم بادامی زرند) قرار داشتند (نمودار ۳ ب).

روند تغییرات میزان نیتروژن در پسته‌های تحت تیمار به علت کاربرد سولفات آمونیوم با روند تغییرات پتاسیم و فسفر اندازه گیری شده متفاوت بود. در بین تیمارهای مطالعه شده، گیاهانی که با استفاده از سولفات آمونیوم تیمار شده‌بودند، همواره از بقیه تیمارها مقدار نیتروژن بیشتری را نشان‌دادند و همچنین با گیاهان تیمار شده با مایکوریزا و سولفات آمونیوم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. تیمار استفاده از سولفات آمونیوم در عدم حضور بیمارگر و در مورد رقم بادامی با میزان ۲/۴۱ درصد بیشترین مقدار نیتروژن را از نظر عددی نشان داد و در عین حال با تیمار استفاده‌ی توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم در رقم بادامی در عدم حضور بیمارگر هم اختلاف معنی‌داری نشان نداد ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی دار نشان داد. تیمار استفاده از قارچ مایکوریزا به تنهایی در مورد هر دو رقم بادامی و سرخس همواره کمتر از تیمار استفاده توأم از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم و همچنین استفاده از سولفات آمونیوم به‌تنهایی بود و مقادیر آن برای دو رقم سرخس و بادامی در حضور و

همچنین عدم حضور بیمارگر به‌ترتیب ۱/۳۹، ۱/۵۲، ۱/۶۱ و ۱/۹۶ درصد مشاهده شد (نمودار۳ ج). کمترین میزان نیتروژن در ارقام سرخس و بادامی‌زرند مربوط به شاهدهای آلوده و سالم به ترتیب با میزان ۱/۱۱، ۱/۲۲ درصد (رقم سرخس) ۱/۲۴، ۱/۳۵ درصد (مربوط به رقم بادامی زرند) بود.



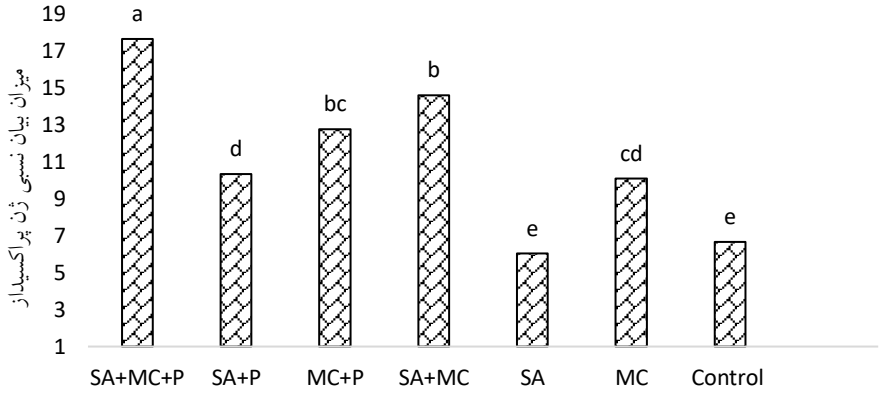
نمودار ۳: مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل تیمارهای مختلف (شامل قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم) و ارقام متفاوت پسته بر پتاسیم (نمودار الف)، فسفر (نمودار ب) و نیتروژن نمودار ج)، اعداد نمودار میانگین چهار تکرار، وزن (بر حسب گرم) است. تیمارهایی که با حروف مختلف در ستون‌ها نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن (P<0.01) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند.

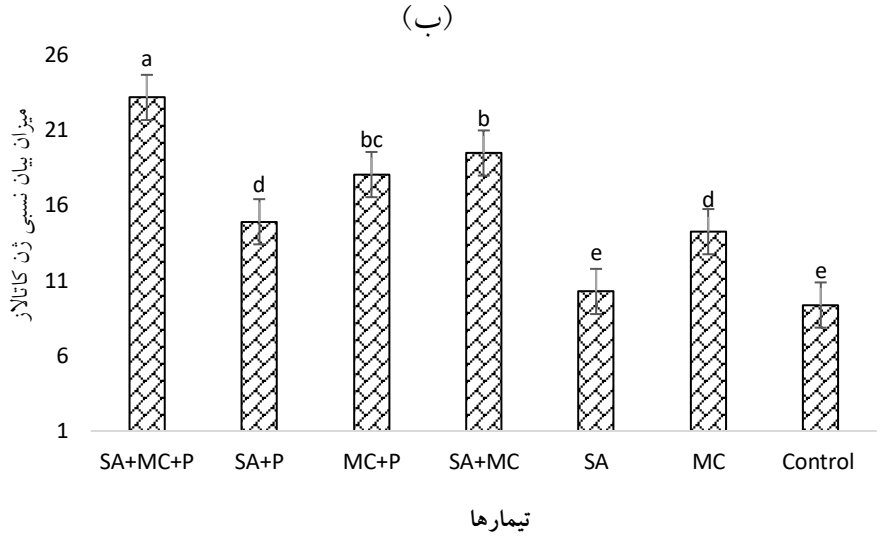
بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز

منحنی‌های ذوب قطعات تکثیری تنها یک پیک برای هر ژن نشان دادند، که نشان‌دهنده‌ی اختصاصیت قطعات تکثیری در این آزمون است. برای اطمینان دوباره از تکثیر قطعات در واکنش محصول حاصل بر روی ژل الکتروفورز Run شد، و بعد از رنگ‌آمیزی باندهایی با اندازه‌ی مورد انتظار به‌دست آمد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس بین تیمارهای مختلف از نظر میزان بیان نسبی ژن پراکسیداز اختلاف معنی‌دار وجود دارد. میزان بیان ژن پراکسیداز بعد از پایان آزمایش در بین تیمارهای مختلف اعمال شده بر روی دانهال‌های پسته متفاوت بود. کمترین میزان بیان ژن پراکسیداز در بین تیمارها مربوط به تیمار شاهد آلوده به میزان ۶/۶۵ برابر میزان بیان این ژن در شاهد سالم بود. بیشترین میزان بیان مربوز به استفاده‌ی توأمان قارچ مایکوریزا و ترکیب سولفات آمونیوم در دانهال‌های آلوده به بیمارگر و بعد از آن همین تیمار بدون استفاده از بیمارگر به ترتیب به میزان ۱۷/۶۱ و ۱۴/۵۸ بود (نمودار ۴ الف).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (داده‌ها نشان داده نشده است) بین تیمارهای مختلف از نظر میزان بیان نسبی ژن کاتالاز اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در مورد میزان نسبی بیان ژن کاتالاز نیز روندی مانند بیان ژن پراکسیداز طی شد. بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به تیمار استفاده‌ی توأمان قارچ مایکوریزا و ترکیب سولفات آمونیوم در دانهال‌های آلوده به بیمارگر به میزان ۲۳/۶۴ برابر میزان بیان این ژن در شاهد سالم بود. بعد از این تیمار به ترتیب تیمارهای استفاده توأمان قارچ مایکوریزا و ترکیب سولفات آمونیوم در دانهال‌های سالم، استفاده از مایکوریز در دانهالی آلوده به بیمارگر و استفاده از سولفات آمونیوم در گیاهان آلوده به بیمارگر به ترتیب با مقادیر عددی ۱۹/۴۵، ۱۸/۰۲ و ۱۴/۸۹ قرار داشتند (نمودار ۴ ب).

(الف)





نمودار ۴: تأثیر تیمارهای مختلف سولفات آمونیوم و مایکوریزا بر میزان بیان نسبی ژن‌های پراکسیداز (الف) و کاتالاز (ب). گیاهان سالم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. SA: سولفات آمونیوم، MC: قارچ مایکوریزا، P: بیمارگر، Control: شاهد آلوده با بیمارگر؛ داده‌ها (میزان بیان نسبی ژن) میانگین سه تکرار هستند.

بحث

بر اساس نتایج این تحقیق، ترکیبات غذایی اثرات بازدارندگی بر رشد قارچ بیمارگر دارند و در این بین، سولفات آمونیوم بیشترین اثر قارچکشی را نشان داد. اثر قارچکشی در مورد سولفات آمونیوم و پتاسیم در ارتباط با عنصر گوگرد به کار رفته در ترکیب این عناصر و در مورد سوپرفسفات‌تریپل مربوط به عنصر فسفر به کار رفته در این ترکیبات می باشد. اثرات قارچکشی این دو عنصر بارها در تحقیقات مختلف مورد اثبات قرار گرفته است، تا جایی که این دو عنصر پایه‌ی تعداد زیادی از قارچکش‌ها می‌باشند. گوگرد برای کنترل سفیدک‌های پودری بهترین قارچ‌کش است (Gaikwad & Karkeli, 1994).

تحقیقات نشان داده است که گوگرد در سطح گیاه به صورت یون S^{-2} در آمده و پس از ورود به قارچ بیمارگر بر سیستم تنفسی قارچ اثر خواهد کرد و مانع انتقال الکترون به اکسیژن می‌شود (Rabie & Almadini, 2005). گوگرد در دماهای بیشتر از ۱۴ درجه سلسیوس به صورت بخار درآمده و در این حالت بر بیماری مؤثر است. یکی دیگر از مکانیسم‌هایی که گوگرد ممکن است باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها شود تغییر pH است. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که اسیدیته پایین اثر بازدارندگی بر بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp *caelorum* دارد (Tivoli *et al*., 1990). نتایج این تحقیق نشان داد که هم افزایش و هم کاهش دادن اسیدیته محیط‌کشت اصلی (شاهد)، منجر به کاهش رشد قارچ شد. در تحقیقی نشان داده شد که با کاهش اسیدیته، کلونیزاسیون قارچ به طور معنی داری کاهش می‌یابد (Andrivon, 1994).

کمبود پتاسیم باعث ایجاد نشت در دیواره‌ی سلولی و در نتیجه ورود قند و آمینواسید به فضای آپوپلاست برگ می‌شود (Prabhu *et al*., 2007). نیتروژن به عنوان عنصر اصلی تشکیل دهنده‌ی اسیدآمینه‌ها در سلول، ارتباط مستقیمی با فراوانی اسیدهای آمینه دارد و لذا باعث ایجاد مقدار زیادی آمینواسید و دیگر ترکیبات نیتروژن دار در بافت گیاه می‌شود. تعادل عناصر غذایی باعت فراهم آمدن شرایط نامساعد برای بیمارگرهای قارچی و در نتیجه باعث کاهش مقاومت گیاه به بیمارگرهای گیاهی می‌شود (van Bruggen, 2016).

کمبود نیتروژن در گیاه باعث ایجاد علایم مشخصی مانند این‌که برگ‌های گیاه سبز کم‌رنگ یا متمایل به زرد می‌شود، شروع علایم از نوک برگ‌های پیر شروع می‌شود. ابتدا برگ‌های پیر گیاه، زرد رنگ و سپس قهوه‌ای کم‌رنگ می‌شود و ریزش می‌کنند، ساقه‌ها کوتاه و نازک شده، کاهش پنجه در غلات، افزایش نسبت ریشه به تاج و کاهش ریشه های ثانویه از علایم گیاهان با کمبود نیترژن است که بروز پیدا می‌کند (Rabie & Almadini, 2005).

تحقیقات بیانگر آن است که فسفیت، رشد قارچ های *Phytophthora* در ریشه را بطورمستقیم محدود می‌نماید، علاوه برآن سبب تحریک سیستم دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری زا می گردد (Forster *et al*., 1999). با اینکه فسفیت برخی از قارچ های اومیست[1] را به‌خوبی کنترل می‌کند اما بر اغلب قارچ های خاکزی تأثیر ناچیز دارد. فسفیت علاوه بر این‌که دارای خاصیت قارچکشی است، می تواند باعث ساخته شدن دامنه‌ی گسترده‌ای از متابولیت‌ها ثانویه در گیاهان شود. متابولیت‌های ثانویه علاوه بر این‌که دارای خاصیت قارچکشی هستند، گیاه را نیزدر برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی مقاوم خواهند کرد. متابولیت‌های ثانویه در واقع ترکیباتی ضد قارچ هستند که هیچ‌گونه اثر تخریبی برای محیط‌زیست هم ندارند (Lovatt, 1999).

نتایج تحقیقی نشان داد که مایه‌زنی گیاه پسته با قارچ مایکوریز گلوموس موزآ و یا مخلوط چند گونه با هم همراه با عناصر ریزمغذی باعث افزایش وزن خشک ریشه می‌شود. تأثیر مایه‌زنی گیاهان مختلف با گونه‌های قارچ مایکوریزا در سطوح ترکیبات غذایی که توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌است بیانگر اثرات مثبت این همزیستی بر افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی می‌باشد (Wu & Zou, 2009).

پژوهشگران مختلف افزایش وزن تر و خشک گیاهانی که در حضور قارچ مایکوریزا بوده‌اند را گزارش کرده اند، و دلیل این امر را بیشتر بهبود شرایط جذب عناصر غذایی به وسیله‌ی این گیاهان ذکر نموده اند (Jeffries *et al*., 2003). در این راستا، افزایش وزن خشک گیاهان تلقیح شده در محیط‌های تحت تنش مشاهده و اعلام شد که تلقیح مایکوریزایی با افزایش توسعه ریشه سبب کاهش اثرات زیانبار تنش‌های زیستی وغیر زیستی می‌شود (Ruiz- Lozano *et al*., 1996).

[1] Oomycetes

نتایج تحقیقی در سال۲۰۰۰ نشان داد که تلقیح پیاز با قارچ‌های مایکوریز موجب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی، مقدار فسفر اندام هوایی و عملکرد غده‌ها نسبت به گیاهان تلقیح نشده می‌گردد (Mahaveer & Alok, 2000).

استفاده از قارچ مایکوریزا در کنار عناصر مغذی باعث بهبود وضع رشدی گیاه می‌شود، که این پدیده را می توان به افزایش سطوح جاذب گیاه و همچنین رفع نیاز گیاه به عناصر مورد نیاز خود ریشه نسبت داد.

قارچ‌های مایکوریز از جمله میکروارگانیسم‌های موفق در زمینه‌ی کنترل بیولوژیک و از عوامل تأثیرگذار بر کاهش شدت بروز بیماری‌های پوسیدگی ریشه و افزایش شاخص‌های رشدی هستند. این قارچ‌ها به دلیل رابطه‌ی پیچیده ای که با گیاه میزبان خود برقرار می‌کنند اثرات مخرب ناشی از بیماری را کاهش می‌دهند. بر اساس نتایج یک تحقیق، رقابت برای کلنیزاسیون ریشه در گیاهان، آنتی‌بیوز مستقیم و فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله سازوکارهای موثر در کنترل بیولوژیک بیماری‌ها توسط قارچ‌های مایکوریز داخلی می باشند (Morandi, 1996). کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ های مایکوریز باعث ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی در بافت‌های میزبان می‌شود که تحریک و فعال شدن مسیر فنیل پروپانوئید و تولید ترکیبات فنلی و ایزوفلاونوئیدها، تغییر در محتویات آمینواسیدهای آزاد، فعال شدن ژن‌های دفاعی و افزایش فعالیت هیدرولازها، افزایش استحکام دیواره‌ی سلول‌ها با رسوب کالوز و پروتئین‌های غیراستروی و نیز لیگنینی و سوبرینی شدن دیواره‌ی سلول‌ها و تغییر جمعیت میکروبی خاک به خصوص در ناحیه‌ی مایکوریزوسفر از مهم‌ترین آن‌ها می باشد. نتایج پژوهشی نشان داد که مایه‌زنی گیاه لوبیا با قارچ *G. intradices* باعث کاهش علایم پوسیدگی ریشه در اثر قارچ بیمارگر *F.solani* می‌شود (Fillion *et al*., 2003).

عناصر غذایی بر روی ویژگی‌های ساختمانی و سلولی گیاه از جمله ضخامت کوتیکول و اپیدرم، سیلیسی شدن، لیگنینی شدن و بسیاری از اعمال حیاتی دیگر سلول تأثیر دارد. عوامل دیگر در میزبان مانند قدرت و سرعت رشد گیاه که سبب فرار از بیماری می‌شوند نیز تحت تأثیر تغذیه‌ی گیاه قرار دارند، لذا عناصر غذایی بر روی وقوع و توسعه‌ی بیماری‌های گیاهی تأثیر می‌گذارند (Gholamnezhad *et al*., 2019).

به دنبال استفاده از قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم افزایش در ارتفاع گیاه و همچنین افزایش در سطح برگ مشاهده شد؛ که این افزایش در درجه‌ی اول احتمالاً ناشی از اثرات تامین عناصر معدنی برای گیاه بوده است (Marschner, 1995). کمبود عناصر معدنی سبب کوتاه ماندن فاصله میانگره و جلوگیری از رشد طولی ساقه می‌شود (Saravanan *et al*., 2007). نتایج این تحقیق نشان داد که با اعمال تیمارهای قارچ مایکوریزا و همچنین سولفات آمونیوم میزان عناصر نیتروژن پتاسیم و همچنین فسفر در اندام هوایی گیاه پسته افزایش پیدا می‌کند.

آزمایشی دیگری روی گیاه پیاز (*Allium cepa*) انجام گرفت نتایج نشان داد که همزیستی میکوریزی باعث افزایش غلظت فسفر در بافت گیاهان می‌گردد (Mozzaffari & Malakouti. 2006).

بوته‌های گندم فقیر از لحاظ فسفر به طور فیزیولوژیکی تحت فشار و مستعد ابتلا به بیماری‌هایی مانند پوسیدگی ریشه‌ها هستند. تحقیقات نشان داده‌اند که مفیدترین عنصر غذایی در افزایش مقاومت در گیاهچه، فسفر است زیرا با تولید ریشه‌های قوی و متعدد در گیاهچه باعث فرار گیاه از بیماری های قارچی می‌شود (Dordas, 2008). به نظر می‌رسد که نقش فسفر در افزایش مقاومت گیاه به علت بهبود بخشیدن به فرایند رسیدن محصول است که باعث می‌شود بیمارگرهایی که بافت‌های جوان را ترجیح می‌دهند فرصت آلوده کردن گیاه را نداشته باشند (Agrios, 2005).

پتاسیم مهم‌ترین عنصر در محلول‌های غیرآلی گیاه است و نقش مهمی در کاهش پتانسیل اسمزی در مغز ریشه دارد که لازمه فشار تورگر برای سلول، انتقال شیره خام در آوند چوبی و متعادل ساختن آب گیاه است (Liang *et al*., 2005). در شرایط شوری سدیمی نه تنها مقادیر زیاد سدیم در جذب پتاسیم به‌وسیله‌ی ریشه مزاحمت ایجاد می‌کند بلکه به غشا سلولی نیز آسیب می‌زند (Flowers & Dalmond, 1992).

نتایج تحقیقات محمودی و همکاران (۱۳۸۲) نشان داد که همزیستی مایکوریزی، غلظت نیتروژن موجود در اندام هوایی گیاه پسته را افزایش داد. گیاهان پسته پرورش یافته در فسفر نسبتاً زیاد، نیتروژن بیشتری در ریشه و اندام هوایی خود داشتند در صورتی که غلظت نیتروژن در این بخش ها تحت شرایط فسفر کم، پایین‌تر بود. Oliver و همکاران (۱۹۸۳) دریافتند در شرایط کمبود فسفر گیاهان مایکوریزی توانایی بیشتری برای احیای نیترات از طریق نیترات ردوکتاز نسبت به گیاهان بدون میکوریزی دارند. افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز به بهبود تغذیه فسفری ناشی از آغشتگی میکوریزا نیز نسبت داده شده است. بنابراین کمبود فسفر می تواند مانع از احیاء نیترات شود. شیرانی راد و همکاران (۱۳۸۹) در تحقیقات خود بر روی گیاه ذرت به این نتیجه رسیدند که بین کاربرد و عدم کاربرد مایکوریزا در کارایی جذب نیتروژن تفاوت معنی داری وجود ندارد. Robert در سال ۲۰۰۱ گزارش داد که همزیستی با میکوریزا در شرایط تنش های زیستی مانند عوامل بیماری زای قارچی بر میزان نیتروژن گیاهان تاثیر زیادی دارد و این یافته ها با نتایج ما مطابقت داشت.

گیاهان مرکباتی که با قارچ‌های میکوریزایی تلقیح شده بودند افزایش وزن خشک کل، غلظت نیتروژن، پتاسیم و منیزیم را نشان دادند (Youpensuk *et al*., 2009).

اثر نیتروژن در تحقیقات صورت گرفته بسیار متغیر می‌باشد. این تفاوت‌ها به‌دلیل تفاوت در فرم کود نیتروژن مورد استفاده، نوع بیمارگر و مرحله‌ی رشدی گیاه است. در واقع اثر نیتروژن به‌دلیل تعامل بیماری و میزبان بستگی به عوامل متعددی از جمله پاسخ میزبان، کشت قبلی، نیتروژن باقی مانده در خاک، زمان استفاده از نیتروژن، میکروفلورخاک، نسبت آمونیوم به نیترات و نوع بیمارگر دارد. مطالعات نشان داده است اگر بیمارگر انگل اجباری باشد استفاده از نیتروژن سبب افزایش بیماری شده اما زمانی که بیمارگر انگل اختیاری باشد با افزایش نیتروژن بیماری کاهش پیدا می‌کند (Dordas, 2008).

در آزمون بررسی تغییرات بیان ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز، میزان بیان نسبی این دو ژن دقیقاً روندی همانند داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که قارچ مایکوریزا و سولفات آمونیوم هر دو قادر به افزایش بیان ژن این دو آنزیم هستند، به عبارت دیگر استفاده از این دو عامل باعث مقاوم‌تر شدن گیاه در برابر شرایط نامساعد و تنش‌های زیستی می‌گردد. همانطور که می‌دانیم قارچ‌های مایکوریزا می‌توانند با گیاه ارتباط همزیستی برقرار کنند.

قارچ مایکوریزا زندگی پارازیت اجباری با گیاه میزبان خود دارد و باید با گیاه میزبان خود سازگاری کامل داشته باشد تا بتواند با آن زندگی همزیستی بر قرار کند و به عبارتی ساده تر بر گیاه میزبان خود سوار شود، این برقراری زندگی پارازیتی نیاز به فرایندهای علامت‌دهی (Signalling) و ارتباطات پیچیده‌ی مولکولی بین دو موجود است (Haddad *et al*., 2004). در این رابطه ژن های زیادی از هر دو موجود فعال و باعث ایجاد این ارتباط می‌شوند، یک دسته از ژن‌هایی که در ارتباط با قارچ های پارازیت فعال می‌شوند ژن های دفاعی میزبان هستند که از آن جمله می توان به ژن‌های تولید کننده و بالابرنده فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده، مانند کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز، اشاره نمود (Haddad *et al*., 2004; Gholamnezhad *et al*., 2014).

جمع‌بندی

بیماری گموز باعث کاهش شاخص‌های رشدی و نامناسب‌شدن شرایط فیزیولوژیکی گیاه می‌شود. استفاده از سولفات آمونیوم و قارچ مایکوریزا باعث بهتر شدن شاخص های رشدی و شرایط فیزیولوژیک گیاه می‌شود. استفاده از ترکیبات غذایی در محیط کشت باعث کاهش رشد بیمارگر بود و این کاهش نشان دهنده‌ی تأثیر مثبت ترکیبات غذایی در کاهش این بیماری می باشد. این ترکیب غذایی علاوه بر افزایش رشد در گیاه باعث افزایش میزان بیان دو ژن کاتالاز و پراکسیداز شد. سولفات آمونیوم دو عنصر مورد نیاز گیاه یعنی گوگرد و نیتروژن را تأمین می‌کند و از طرف دیگر بر اساس نتایج این پژوهش هم اثر قارچ‌کشی و هم اثر فعال کننده‌ی سیستم دفاعی گیاه را دارد که باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی می‌گردد. با اتکا به نتایج این تحقیق سولفات آمونیوم ترکیبی بسیار کاربردی در کشاورزی معرفی می‌شود و می‌توان آن را به کشاورزان برای افزایش عملکرد در واحد سطح و همچنین افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی معرفی نمود، از طرفی استفاده از قارچ‌های مایکوریزا در زمینه‌ی افزایش رشد و در نتیجه افزایش عملکرد گیاهی بسیار کاربردی و مفید، مورد مشاهده قرار گرفتند؛ لذا پیشنهاد می‌شود که بر روی فرمولاسیون‌هایی که ترکیبی از قارچ‌های مایکوریزا و ترکیبات غذایی مانند سولفات آمونیوم است، تحقیقات بیشتری صورت بگیرد.

منابع

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. 5th ed. Academic Perss, San Diego, USA. 948pp.

Bagheri, V., Shamshiri, M.H., Shirani, H., Roosta, H. (2012). Nutrient uptake and distribution in mycorrhizal pistachio seedlings under drought stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 14 (Suppl.), 1591–1604.

Banihashemi, Z. (1975) Phytophthora black stem rot of sunflower. Plant Disease, 59: 721-724.

Banihashemi, Z. (1984) Phytophthora diseases of pistachio in southern Iran. PhytophthoraNewsletter, 12(3).

Chapman, H.D. and Pratt, P.F. (1961) Methods of analysis for soils, plants and water. University of California, Berkely, CA, USA.

Chaves, M.M. and Oliveira, M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water – saving agriculture. Journal of Experimental Botany, 55(407):2365 – 2384.

Cherif, M., Menzies, J. G., Benhamou N. and Bélanger, R.R. (1992) Studies of silicon distribution in wounded and Pythium ultimuminfected cucumber plants. Physiol. Mol. Plant Pathol.41: 371-385.

De Gara, L., de Pinto, M. C. and Tommasi, F. (2003) The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry, 41: 863–870.

Dordas, C. (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases. Review Sustainable Agriculture. 28: 33-46.

Dumas-Gaudot, E., SLezack, S., Dassi, B., Pozo, M.J., GIianna, V. and Gianinazzi, S. (1996) Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β-1,3 glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. Plant and Soil 185: 211-221.

Ercolin, F. and D. Reinhardt. (2011) Successful joint ventures of plant: Arbuscular mycorrhiza and beyond. Trends Plant Sci. 16: 356-362.

Fani, S.R., Mirabolfathy, M. and Zamanizadeh H.R. (2015) Identification of Pistachio Root and Crown Rot Casual Agents in Sistan Province, Journal of Pistachio Science and Technology, 1(2): 74-92.

Fillion, M., Starnaud, M. & Jabaji-hare, H. (2003) Quantification of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolation on selective media. Phytopathology 93: 229-235.

Flowers, T. J. and Dalmond, D. (1992) Protein synthesis in halophytes: the influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. Plant and Soil 146: 153– 161.

Forster, H.J.E. Adaskaveg, D.H. Kim, and Stanghellini. M.E. (1998) Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. Plant Disease,. 82:1165-1170.

Gaikwad, A. P. and Karkeli, M. S. (1994) Comparative efficacy of three fungicides for control of powdery mildew in grapes. Journal of Maharashtra Agricultural Universities. 1994, 19: 2, 214-215.

Garcia, A., Rizzo, C.A., UD-Din, J., Bartos, S.L., Senadhira, D., Flowers, T.J. and Yeo. A.R. (1997) Sodium and Potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanisms of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. Plant Cell and Environ. 20: 1167-1174.

Ghazi.A.K., McMichael, B., and Zak.J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress.14:263-269.

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R. & Sahebani, N. (2010) Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science. 4: 001-007.

Gholamnezhad, J. (2019) Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture, 17(0): 1-10.

Gholamnezhad, J., Sanjarian F., Mohammadi goltapeh E., Safaei N. and Razavi Kh. (2016) Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*, Iranian Journal of Science and Technology. 8(30): 43-55.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi Kh. (2014) The evaluation of salicylic acid effect on septorios disease by *Mycospharella graminicola*, Research in Plant Pathology. 2(2):35-46.

Haddad, R., Morris, K. and Buchanan-Wollaston, V. (2004) Expression analysis of genes related to oxidative protection during senescence in Brassica napus. Iranian Journal of Biotechnology, 2: 269-278.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J.M. (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Boilogy and Fertility of Soil. 37: 1-16.

Kamble, S.R., Navale A.M. and Sonawane. R.B. (2009) Response of mango seedlings to VA-mycorrhizal inoculation. International Journal of Plant Protection, 2(2): 161-164.

Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. and Popova, L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. Journal of Plant Physiology, 165: 920–931.

Liang, Y. C. Wong, J. W. C. and Long, W. (2005) Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. Chemosphere. 58: 475-483.

Lovatt, C.J. (1999) Timing citrus and avocado foliar nutrient applications to increase fruit set and size. HortTechnology, 9:607-612.

Mahaveer, P.S., and Alok, A. (2000) Enhanced growth and productivity following inoculation with indigenous AM fungi in four varieties of onion (*Allium cepa* L.) in an alfisol. Biological Agriculture and Horticulture,18: 1-14.

Marschner H., (1995) Mineral Nutrition of Plants, Ed 2. Academic Press, Boston.

Menzies, J. G. and Belanger. R. R. (1996) Recent advances in cultural management of diseases of greenhouse crops. Plant Pathology, 18: 186-193.

Morandi, D. (1996) Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions and their potential role in biological control. Plant and Soil, 185: 241-251.

Mostajeran, A., and Rahimi-Eichi, V. (2009) Effects of drought stress on growth and yield of rice *Oryza sativa* L.) Cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 5(2). 264-272.

Mozzaffari, V. and M. J. Malakouti. (2006) An investigation of some causes of die-back disorder of pistachio trees and its control through balanced fertilization in Iran. Acta Horticulture, 22: 301-305.

Oliver, A.J., Smith, S.E., Nicholas, D.J, D., Wallace, W., and Smith, F.A. (1983) Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterranum*: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition, New phytologist.94:63-79.

Ortas, I. (2008). Field trials on mycorrhizal inoculation in the eastern Mediterranean Horticultural region. In: F. Feldman., Kapulnik and j. Barr (eds). Mycorrhiza works Hannorer, Germany.

Patil, A. O., Padule, D. N., Boramanikar, P. K. (1993) Chemical control of powdery mildew of grape with new fungicides. Maharashtra Journal of Horticulture. 7: 2, 13-16.

Rabie, G.H., and Almadini, A.M. (2005) Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of Vicia faba plants under salinity stress. African Journal of Biotecnology. 4(3): 210-219.

Reise, E. M., R. J. Cook, and McNeal, B. L. (1983). Elevated pH and associated reduced trace-nutrient availability as factors contributing to take-all of wheat upon soilliming. Phytopathology. 73(3):411-413.

Robert M.A. (2001) Water relation, drough and vesicular- arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza. 11:3-42

Ruiz-Lozano, J.M., Azcon, R. and Gomes, M. (1996). Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal Glomus species in Lactuca sativa plants. Physiologia Plantarum. 98(4): 767-772.

Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. and Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). Chemosphere, 66(9): 1794-1798.

Shamshiri, M.H. and Fattahi, H. (2014) Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Photosystem II Activity of Three Pistachio Rootstocks under Salt Stress as Probed. Russian Journal of Plant Physiology, 63(1): 101–110.

Shamsi, H., Saberi Riseh, R., Alaei, H., Khodaygan, P., Akhgar, A. (2019). The effect of some plant probiotic bacteria isolated from salty and dry areas in control of pistachio gummosis caused by *Phytophthora drechsleri* under in vitro condition. Biological control of pests and plant diseases, 7(2): 65-82.

Sheibani, A. (1994) Pistachio production in Iran. First International Symposium on Pistachio Nut, Adana, Turkey.

Teviotdale, B., Michalides, T. and Pscheidt, J. (2002). Compendium of nut crop diseases in temperate zones. The American Phytopathological Society.

Tommasi, S. (2008). Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. Mutation Research, 644: 64–70.

Turnau, K., Ryszka, P., Gianinazzi-Pearson V. and van Tuinen D. (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. Mycorrhiza, 10:169–174.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. Y. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus yunnanensis cell suspension cultures. Nitric Oxide, 15: 351-358.

Weller, D.M. (1998). Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 29: 379-407.

Wu, Q.S. and Zou. Y.N. (2009). Arbuscular mycorrhizal symbiosis improves growth and root nutrient status of citrus subjected to salt stress. Science Asia, 35: 388–391.

Youpensuk, S., Lordkaew, S. and Rerkasem. B. (2009). Genotypic variation in responses of Citrus spp. to arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Agricultural Science, 1(1) p59.

Yuncai, H. and Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Plant Nutrition. 168: 541–549.

The Effect of Mycorrhiza and Nutrients on Some Pistachio Seed characters in Interaction with *Phytophtora drescleri*

E. Babzan[1], M. Maleki[2*], J. Gholamnezhad[3], F. Naserinasab[4]

Received:2019.12.12
Accepted:2021.2.13

Abstract

Pistachio is one of the most important export crops of Iran. One of the diseases that damages pistachio trees in most pistachio growing areas is Gumosis disease caused by *Phytophthora drescleri*. Mycorrhizal fungi are the most successful microorganisms in the field of biological control and one of the effective agents to reduce the root rot diseases incidence caused by *P. drescleri*. Nutrients are also able to increase the level of tolerance or resistance of plants against to some diseases. In this study, mycorrhizal fungi and various nutrients were used to control the root rot disease. In this study, ammonium sulfate, potassium sulfate and triple superphosphate compounds were used against the root rot disease *in vitro*. The results showed that the highest amount of growth inhibition of pathogen was related to 2500 ppm concentration of ammonium sulfate with 67.16%. In the second section of the study, the effect of different treatments including mycorrhiza and ammonium sulfate alone and their combination in the reducing *P. drescleri* disease on characters such as fresh and dry root and shoots and shoots. The levels of phosphorus, nitrogen and potassium were evaluated. Finally, the expression levels of the two peroxidase and catalase genes was measured. The results showed that the combination of fungal mycorrhiza and ammonium sulfate always had the highest dry and fresh weight of shoots and roots among the treatments applied in both cultivars in the absence of pathogen. The shoot fresh weight was 24.40 g (Badami zarand) and 17.51 g (Sarakhs), respectively.

Keywords: *Gummosis, Mycorrhiza, Nutrients, Gene Expression*

1- M.Sc. Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran
2- Assistant Professor Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran
*(Corresponding author: mojdehmaleki@gmail.com)
3- Assistant Professor Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
4- Phd of Plant pathology

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۵۱-۶۹
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 51-69
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2021.33481.1384

تعیین میزان برخی ترکیبات شیمیایی گونه‌های غالب جلبک‌های قهوه‌ای بندر لنگه، استان هرمزگان

حدیث جعفری*[۱]، فرناز رفیعی[۲]، آریا اشجع اردلان[۳]

چکیده

در این تحقیق برخی ترکیبات بیوشیمیایی تاکسون‌هایی از جلبک‌های قهوه‌ای، متعلق به ۵ جنس مختلف بندر لنگه، در استان هرمزگان شامل Sargassum vulgare (C. Agardh, 1820)، Padina australis (Hauck,1887)، Cystoseira myrica (C. Agardh, 1820) ، Colpomenia sinousa (Derbes & Solier, 1851) و Iyengaria sp. (Borgesen) در فصول زمستان (بهمن ۹۷) و تابستان (تیر ۹۷) بررسی شد. جلبک‌ها در زمان جزر جمع‌آوری شدند. استخراج پروتئین به روش لوری، چربی به روش Freeman ، کربوهیدرات توسط روش فنل-سولفوریک اسید و آلژینات به روش Istini صورت گرفت. بیشترین درصد پروتئین با ۲/۷ درصد از جلبک Cystoseira myrica در بهمن، چربی با ۷۵ درصد از جلبک Padina australis در بهمن ، کربوهیدرات با ۳/۴ درصد از جلبک Sargassum vulgare در بهمن و آلژینات با ۳۰ درصد از جلبک Sargassum در تیر به‌دست آمد. اختلاف میانگین این ترکیبات بین ماههای بهمن و تیر معنی‌دار بود (P<0.05). طبق نتایج به‌دست آمده با درنظر گرفتن میزان بالای چربی در جلبک‌های این پژوهش می‌توان از آن‌ها برای افزایش چربی شیر دام استفاده نمود. همچنین آلژینات به‌دست آمده در این تحقیق در بین جلبک‌های قهوه‌ای مطالعه شده، از مقدار مناسبی برخوردار است و می‌توان آن را برای استفاده در صنایع مختلف استخراج نمود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، جلبک‌های قهوه‌ای، چربی، فیکوکلوئید، کربوهیدرات

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی دریا، گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: : jfrihadis@gmail.com)
۲- استادیار گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳- دانشیار گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

مقدمه

جلبک‌های ماکروسکوپی به‌عنوان غذا، کود و دارو از زمان‌های قدیم مورد استفاده بوده‌اند و منبع بسیار خوبی از پروتئین، کربوهیدرات، ویتامین و مواد مغذی هستند که در تغذیه‌ی انسان نقش بسزایی دارند و استخراج پلی‌ساکاریدهای آن (مانند آگار، آلژینات و کاراگینان) تأمین کننده‌ی مواد خام برای بسیاری از صنایع (غذا، مواد آرایشی، رنگ، پارچه، کاغذ و ...) می‌باشند. مواد غذایی، کیفیت و کمیت ترکیبات بیوشیمیایی در جلبک‌ها با توجه به گونه، جایگاه (بوم)، فصول مختلف، دوره‌ی زندگی گیاه، دما، شوری، آب‌های مجاور و عمقی که گیاه در آب فرورفته، تغییر می‌کنند. همچنین مطالعات نشان داده است بخش‌های مختلف ریسه‌های یکسان، دارای مقادیر ترکیبات با نوسانات معنی‌داری هستند (Kumar, 2013).

پروتئین که از ترکیبات مهم قابل اندازه‌گیری در توده‌ی جلبک است در ساخت سلول‌های جدید و ترمیم سلول‌های آسیب‌دیده در تمام بخش‌های بدن، در حفظ توده‌ی عضلانی، تولید هورمون و آنزیم، عملکرد درست سیستم ایمنی و فراهم کردن انرژی (درصورت عدم دسترسی به کربوهیدرات‌ها) شرکت دارد (Kumar, 2013). کربوهیدرات‌ها منبع اصلی انرژی در بدن بوده و برای مغز، سیستم‌عصبی، کلیه‌ها و ماهیچه‌ها اهمیت دارند. اغلب جلبک‌ها حاوی ۵۰-۶۰ درصد کربوهیدرات هستند، در جلبک‌ها کربوهیدرات‌های محلول، مهمترین بخش از ترکیبات کربوهیدرات‌ها هستند (Kumar, 2013). آلژینات یا اسیدآلژنیک در دیواره‌ی سلولی جلبک‌های قهوه‌ای یافت می‌شود و جاذب آب است. مصارف آلژینات در محصولات لاغری، تولید کاغذ و منسوجات، ضدآب و ضدآتش کردن منسوجات، عامل ژلاتین‌کننده و تغلیظ‌کننده (در نوشیدنی‌ها، بستنی‌ها و مواد آرایشی)، عامل سم‌زدا (جذب فلزات‌سمی از خون)، مواد قالب‌گیری در دندانپزشکی، چسب‌ها، و ... کاربرد دارد (Kumar, 2013).

در حال حاضر مصرف انسانی جلبک‌های سبز (۵ درصد)، قهوه‌ای (۶۶/۵ درصد) و قرمز (۳۲درصد) است که در آسیا رقم بالایی را به خود اختصاص داده و تقاضا برای مصرف آن‌ها به آمریکای شمالی و جنوبی و اروپا رسیده است (Fathy, 2007)، علاوه بر مصرف انسانی به تغذیه دام و طیور نیز می‌رسند. اما اطلاعات در ایران از ارزش غذایی آن‌ها در حد کمی است.

محمدی و همکاران در ۲۰۱۲، ۸ گونه از جلبک‌ها را در بوشهر و استان هرمزگان بررسی کردند. بیشترین کربوهیدرات را در *Gracilaria corticata* با ۴۱/۷۲ درصد، پروتئین در *Champia* با ۱۱/۳ درصد به‌دست آوردند. حافظیه در ۱۳۹۳، ارزش غذایی *Sragassum lentifolium* را در خلیج چابهار بررسی کرد. این جلبک بیشترین کربوهیدرات را در زمستان داشت. صفائیان و همکاران در ۱۳۹۰ ارزش غذایی *Padina borgesenii* را در قشم مطالعه کردند. بیشترین چربی و پروتئین در زمستان و بهار به‌دست آمد.

در خصوص بررسی میزان برخی ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌های قهوه‌ای بندر لنگه، مطالعه‌ای صورت نگرفته است، لذا این مطالعه با هدف تعیین میزان برخی ترکیبات شیمیایی جلبک‌های قهوه‌ای گونه‌های *Sargassum vulgare*، *Padina*

australis، *Cystoseira myrica*، *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria* sp در بندر لنگه در دو فصل سرد (بهمن ماه۹۷) و گرم (تیرماه ۹۸)، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این مطالعه نمونه‌های جلبکی از استان هرمزگان- بندر لنگه با موقعیت جغرافیایی ۲۶درجه و ۳۲دقیقه عرض شمالی و ۵۴درجه و ۵۳دقیقه طول شرقی، با توجه به تغییرات دمایی محیطی، طی دو فصل سرد (بهمن ماه۹۷) و گرم (تیرماه ۹۸)، نمونه برداری شدند. جلبک‌ها از ناحیه اتصال به رسوبات با دست از بستر جدا شدند، توسط آب شیرین شستشو داده، مواد زائد از روی آن‌ها را برداشته و نمونه‌ها در داخل کیسه‌های نایلونی حاوی آب دریا به آزمایشگاه منتقل شدند.

جلبک‌ها بعد از این‌که خشک شدند؛ چربی، پروتئین، کربوهیدرات و آلژینات از آن‌ها استخراج شد. روش استخراج هر یک از این مواد به شرح ذیل می‌باشد:

روش سنجش چربی

برای تعیین میزان چربی کل نمونه‌ی گیاهی یا جانوری از روش Freeman و همکاران (1957) و Sperry & Brand (1955) استفاده شد. در این روش نمونه در محلول کلروفرم- متانول به نسبت ۱:۲ همگن می‌شود، توسط آب شسته و فاز چربی از آن جدا، خشک و وزن می‌شود. درنهایت با استفاده از فرمول (۱) میزان چربی نمونه محاسبه شد:

$$\text{درصد میزان چربی} = \frac{\text{وزن چربی}(mg) \times \frac{۳}{۲}}{\text{وزن خشک بر حسب } mg} \times ۱۰۰ \qquad \text{(فرمول۱)}$$

روش سنجش پروتئین

سنجش پروتئین با استفاده از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) که بیشترین کاربرد را در زمینه‌ی تعیین میزان پروتئین نمونه‌های زیستی دارد، انجام شد. ابتدا پروتئین به همراه یون مس در محلول قلیایی عمل‌آوری می‌شود، سپس اسیدآمینه‌های آروماتیک در نمونه‌ی عمل‌آوری شده باعث کاهش اسیدphosphomolybdate-phosphotungstic ظاهر شده در معرف فولین می‌شود. محصول نهایی این واکنش محلولی آبی‌رنگ خواهد بود. میزان پروتئین را می‌توان از طریق خواندن میزان جذب نوری نمونه (در ۶۶۰ نانومتر) در برابر منحنی استاندارد سرم آلبومین به‌دست آورد.

روش سنجش کربوهیدرات

برای اندازه‌گیری میزان قندهای محلول از روش فنل‌اسیدسولفوریک استفاده شد (Kochert,1978). در این روش فنل در حضور اسیدسولفوریک برای رنگ‌سنجی کمی قندها و مشتقات متیله‌ای آن‌ها به‌کار می‌رود. رنگ حاصل پایدار است و نیاز به کنترل شرایط ویژه‌ای ندارد.

روش سنجش آلژینات

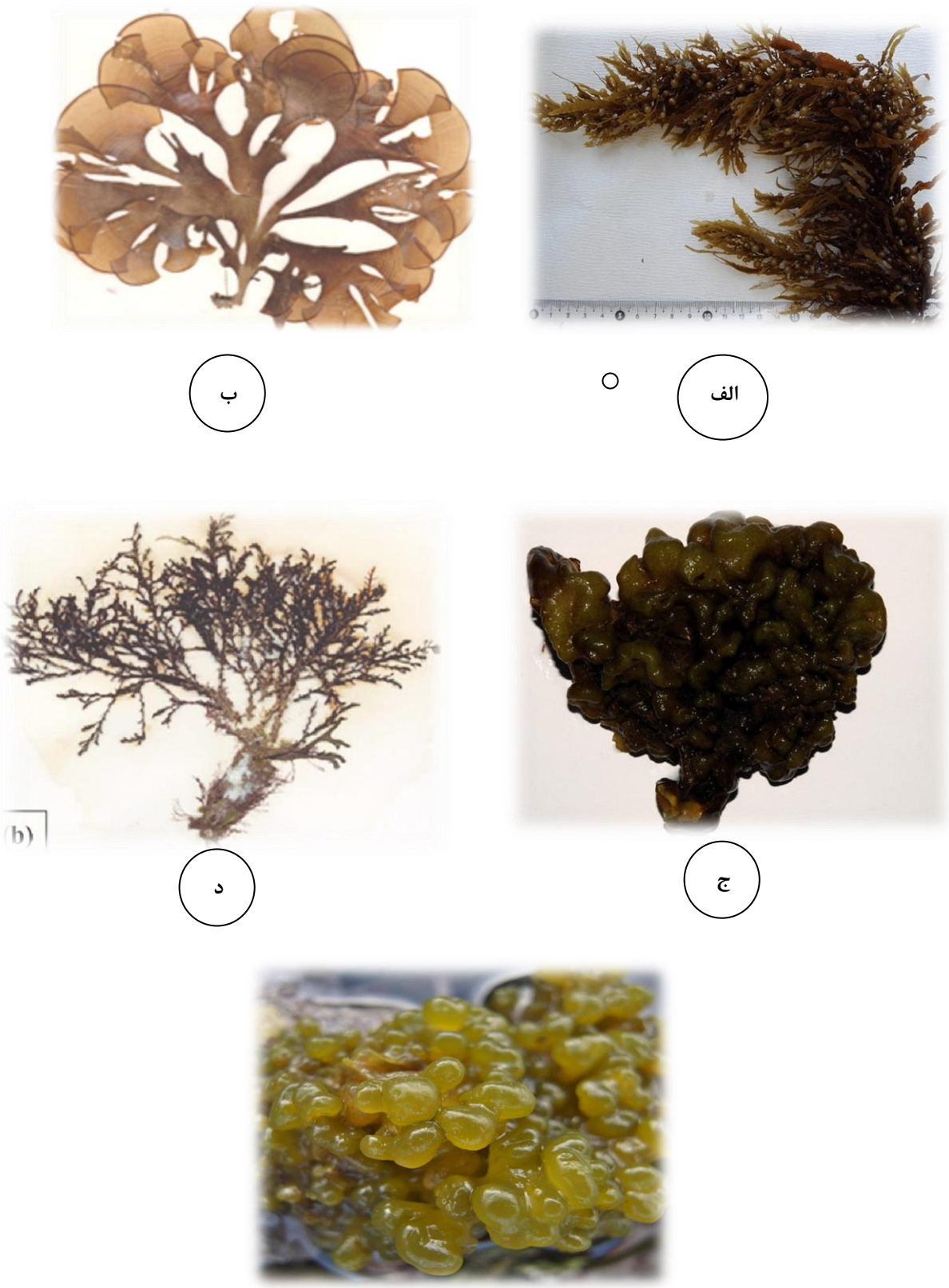
۱۰ گرم از جلبک خشک شده را پس از تبدیل به قطعات کوچک، در ۵۰۰cc اسیدسولفوریک ۲درصد قرار گرفت و در یک شیکر آرام در طول شب استراحت داده شد. مخلوط حاصل را از صافی عبور داده و با ۵۰ تا ۱۰۰cc آب مقطر شسته و دوباره فیلتر شد. سپس مواد در ۵۰۰ cc کربنات‌سدیم ۱درصد قرار داده شد و پس از قرارگرفتن یک شب در دمای اتاق در شیکر قرار گرفت، حجم نمونه با آب فقط به یک لیتر رسانده و توسط توری صاف شد. به‌منظور استخراج آلژینات، ۵۰۰cc NaCl یک درصد به مایع صاف شده، اضافه شد. سپس مایع صاف شده به اتانول کم‌کم اضافه (حجم مایع صاف شده ۲برابر اتانول) و همزمان با یک همزن شیشه‌ایی هم‌زده شد. آلژینات چسبیده در روی یک صافی توری قرار داده و با اتانول شسته شد و در کوره‌ی ۵۰درجه سانتیگراد برای ۲۴ساعت خشک گردید. به‌منظور بی‌رنگ کردن آلژینات، ابتدا مواد جلبکی در محلول فرمالین ۰/۱تا ۰/۴درصد به مدت ۳ تا ۵ساعت در دمای اتاق نگه‌داری و سپس با آب شستشو شدند (Istini *et al*., 1994).

آنالیز آماری

اختلاف معنی‌داری هر یک از ترکیبات بیوشیمیایی حاصل از گونه‌های جلبک قهوه‌ای به صورت فصلی بین دو فصل زمستان (بهمن ماه-سرد) و تابستان (تیرماه-گرم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. همچنین اختلاف معنی‌داری ترکیبات بیوشیمیایی بین هر یک از گونه‌های جلبک قهوه‌ای بررسی شد. آنالیز آماری ANOVA، آزمون‌های لون (Levene's Test) و T-Test به‌منظور هم‌واریانس بودن داده‌ها انجام شد و مقایسه سطح معنی‌داری در ۰/۰۵ بود.

نتایج و بحث

گونه‌های جلبکی مورد بررسی در این مطالعه به شرح ذیل می‌باشند (شکل۱):



شکل۱ : جلبک‌های مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر (www.algeabase.com)

الف- (*Sargassum vulgare*) ؛ ب- (*Padina australis*)؛ ج- (*Colpomenia sinuosa*)؛ د- (*Cystoseira myrica*)؛ ه- *Iyengaria* sp.

(***Sargassum vulgare***) : متعلق به خانواده‌ی Sargassaceae ، تیرهٔ سارگاسه Sargassaceae می‌باشد و گیاهان این تیره دارای محور اصلی و انشعابات جانبی هستند که این انشعابات به ساختاری شبیه به برگ منتهی می‌شوند. ساختارهای شبیه به ساقه و برگ دارند و دارای حباب‌های هوا یا وزیکول ساقه‌دار می‌باشند. در دریاهای گرمسیری، نیمه‌گرمسیری حاره و معتدله، در منطقه‌ی بین جزر و مدی تا زیر جزر و مدی و در استخرهای کشندی سواحل صخره‌ای وجود دارند.

(***Padina australis***) : از جنس‌های معروف خانواده Dictyotaceae و راسته Dictyotales می‌باشد که شکل ظاهری آن شبیه بادبزن است و به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای در کنار ساحل دیده می‌شود. ریسه‌ی آن مواد آهکی در خود ذخیره می‌کند. رشد توسط سلول‌های انتهایی که در حاشیه و لبهٔ ریسه قرار گرفته‌اند، انجام می‌گیرد (ریاحی،۱۳۸۷) (شکل۱- ب).

(***Colpomenia sinuosa***) : متعلق به خانواده Scytosiphonaceae و جنس *Colpomenia* است. رنگ این جلبک متمایل به زرد، نیمکروی تا کروی، به‌طور نامنظم پیچ‌خورده و توخالی صاف در اوایل رویش و توسعه یافته با افزایش سن، می‌باشد. شکل نامنظم، کم و بیش گرد یا چندوجهی، قطر تال حدود ۱۰-۵ سانتی‌متر یا بیشتر است. محل رویش جلبک معمولاً در منطقه‌ی بین جزر و مدی روی سطح بسترهای صخره‌ای مسطح یا به صورت اپیفیت روی جلبک‌های بزرگ می‌باشد. پراکنش کم و بیش در استان‌های هرمزگان و سیستان‌وبلوچستان (گواتر، بریس، چابهار، گوردیم، تنگ و جود) در فصل زمستان و اوایل بهار است (قرنجیک و روحانی قادیکلایی، ۱۳۸۸) (شکل۱- ج).

(***Cystoseira myrica***) : متعلق به خانواده Sargassaceae و جنس *Cystoseira* است. رنگ این جلبک تیره، تخت و شکل عمومی معمولاً متغیر می‌باشد، برخی باریک و بلند و دارای تعداد زیادی وزیکول‌های هوایی هستند. انشعابات اصلی معمولاً دوطرفه و شانه‌ای، پوشیده از تعداد زیادی خارهای ریز است. انشعابات فرعی کوتاه، گاهی اوقات جایگزین با وزیکول‌های هوایی می‌شوند. ارتفاع تال ۳۰-۲۰ سانتی‌متر می‌باشد. محل رویش جلبک *Cystoseira myrica* معمولاً در قسمت‌های میانی محدوده‌ی بین جزر و مدی، روی سطح بسترهای صخره‌ای پوشیده با ماسه است. پراکنش کم و بیش در استان‌های هرمزگان در تمام فصول و سیستان‌وبلوچستان (چابهار) در پائیز می‌باشد (قرنجیک و روحانی قادیکلایی، ۱۳۸۸) (شکل۱- د).

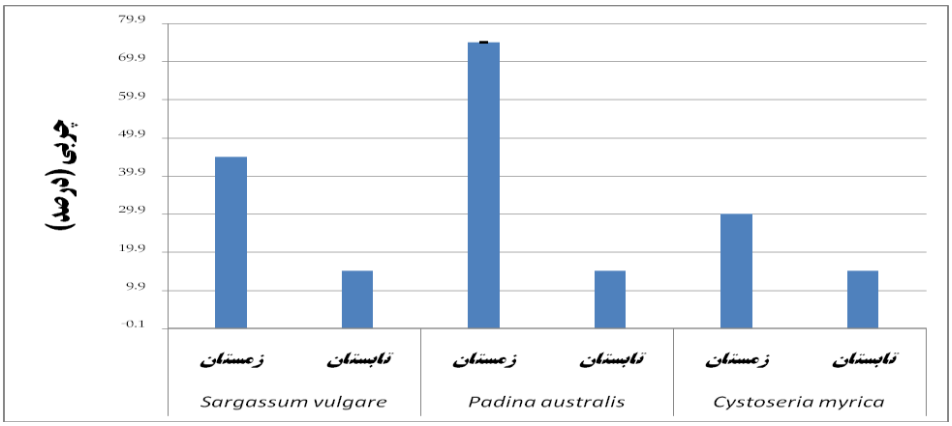
***Iyengaria* sp** : متعلق به خانواده Scytosiphonaceae و جنس *Iyengaria* است. رنگ جلبک قهوه‌ای متمایل به سبز، به شکل نیمکره‌ای و کره‌ای در سطح، خوشه انگوری شکل فشرده و توخالی، می‌باشد و کم و بیش گرد یا چندوجهی و نامنظم است. نگهدارنده گسترده و متصل به هم، با قطر تال ۱۰-۵ سانتی‌متر یا بیشتر هستند. محل رویش جلبک *Iyengaria* sp. در محدوده‌ی بین جزرو مدی به‌خصوص در قسمت‌های پایینی تا کم‌عمق زیر جزر و مدی، روی سطح بسترهای صخره‌ای است. پراکنش کم و بیش در استان‌های هرمزگان و سیستان‌وبلوچستان (گواتر، بریس، چابهار، گوردیم، تنگ و جود) در فصول زمستان و اوایل بهار می‌باشد (قرنجیک و روحانی قادیکلایی، ۱۳۸۸) (شکل۱- ه).

مطالعات محدودی در رابطه با میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات جلبک‌ها انجام شده است. اما داشتن اطلاعات درباره‌ی این موضوع قبل از بکار بردن آن‌ها در تغذیه‌ی انسان و دام مهم است. به طورکلی ۵گونه جلبک قهوه‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند که دو گونه (*Colpomenia sinousa* و *Iyengaria* sp) در تابستان مشاهده نشدند. نتایج ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌های قهوه‌ای بندر لنگه نشان داد میزان چربی بالاترین ارزش خود را در فصل زمستان و در جلبک *Padina australis* (۷۵درصد) و کمترین میزان چربی در فصل تابستان در هر سه گونه‌ی جلبکی یکسان (۱۵درصد) است. به طورکلی میزان چربی سنجش شده، در فصل سرد (زمستان) نسبت به فصل گرم (تابستان) بالاتر است. همچنین در مقایسه‌ی کلی میزان میانگین درصد میزان چربی سنجش شده، در *Padina australis* طی دو فصل سرد (زمستان) و فصل گرم (تابستان) میزان بالاتری نسبت به سایر گونه‌های جلبکی دارد (نمودار۱). در فصل سرد سال، اختلاف معنی‌داری بین *Padina australis* با دو گونه‌ی جلبکی دیگر و در فصل گرم بین تمام گونه‌ها وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

تفاوت در میزان چربی بین گونه‌های جلبکی احتمالاً بر اثر عوامل محیطی بر روی رشد جلبک‌ها بستگی دارد. تغییرات چربی به نوع گونه، فصل، مکان و مرحله زندگی جلبک بستگی دارد و با افزایش دما، کاهش می‌یابد (Khairy & El-Shafay, 2013). به همین دلیل درصد چربی سنجش شده در فصل سرد (زمستان) نسبت به فصل گرم (تابستان) بالاتر بود. در تحقیقی که توسط حافظیه در ۱۳۹۳ انجام شد نشان داد که در *Sargassum lentifolium* میزان‌چربی در زمستان و تابستان تفاوت معنی‌داری نداشته است. در تحقیق صفائیان و همکاران در ۱۳۹۰ چربی *Padina boergesenii* در زمستان بیشتر از بهار بوده است. به عقیده‌ی خیری و الشافی در ۲۰۱۳، با افزایش دما، میزان چربی کاهش می‌یابد و تا انتهای فصل رشد ثابت باقی می‌ماند. در تحقیق آن‌ها میزان چربی در *Jania rubens* بین سه ماه فروردین، مرداد و آبان، بیشترین میزان را فروردین با ۴/۰۹ داشته است.

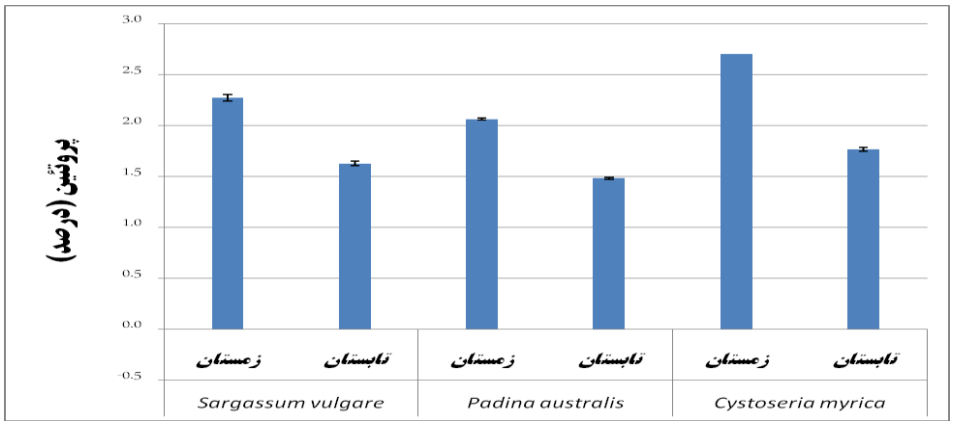
مطالعات گوناگونی که درباره‌ی میزان چربی جلبک‌های قهوه‌ای انجام شده است، نشان می‌دهد که در *Sargassum* مقادیر مختلف میزان چربی در *Sargassum ilicifolium* ۱۳/۵۵درصد (ولی‌کمال،۱۳۹۰)، ۰/۵۸ درصد (Gojon *et al.*, 1998)، ۲ درصد (Casas *et al.*, 2003)، ۰/۴۵ درصد (Marin *et al.*, 2009) گزارش شده است. میزان چربی در *Gracilaria* spp. (۳/۹۷درصد) و *Enteromorpha intestinalis* (۱/۲درصد) بوده است که نسبت به چربی به‌دست آمده در تحقیق حاضر میزان کمی را داشته است (Kheiry and Al-Shafi, 2013). Gosch و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که اگر چربی بیشتر از ۱درصد باشد از ماکروجلبک‌ها به عنوان سوخت زیستی می‌توان استفاده کرد. به‌عنوان مثال جلبک قهوه‌ای *Spatoglassium macrodatium* دارای ۵۷/۴۷ میلی‌گرم چربی در گرم وزن خشک می‌باشد. به‌طورکلی جلبک‌های قهوه‌ای میزان لیپید بیشتری از جلبک‌های سبز و سپس قرمز دارند. در لیپید گونه‌های جلبک *Sargassum*، اسیدهای چرب اشباع مانند اسیدپالمتیک غنی

هستند. در بین جلبک‌های قهوه‌ای اعضای راسته *Dictyotales* دارای بیشترین میزان چربی است (همان‌طورکه در این پژوهش *Padina* دارای بیشترین میزان چربی (۷۵درصد) است)، بطوری‌که *Dictyota bartayraii* ۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و *Spatuglussum macradantum* دارای ۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک جلبک، چربی کل دارد. لیپیدها در بدن تولید انرژی می‌کنند و به‌صورت ترکیب با مواد دیگر در ساختمان سلول‌ها دخالت دارند. در خوراک دام‌ها به‌طور سنتی حدود ۲/۱۵ برابر بیشتر از کربوهیدرات‌ها انرژی تولید می‌کنند و اضافه‌کردن آن به خوراک، بازده غذایی را افزایش می‌دهد و اسیدهای‌چرب ضروری برای بدن را تأمین می‌کند (محمودزاده و کرم‌زاده، ۱۳۹۴). تولید حداکثر شیر با بالاترین میزان چربی هدف تمام پرورش‌دهندگان دام‌های شیری است. اهمیت شیرهای پرچرب علاوه بر بالا بودن ارزش غذایی و کالری‌زایی بیشتر این است که متناسب با افزایش درصد چربی شیر، مواد پروتئینی و معدنی و ماده خشک نیز افزایش می‌یابد. همچنین در تهیه کره، خامه و یا روغن شیرهای پرچرب نقش اساسی در راندمان محصول دارند (ربیعی،۱۳۶۹). به این ترتیب با درنظرگرفتن میزان بالای چربی در جلبک‌های این پژوهش می‌توان از آن‌ها در شرایط مطلوب و عدم حضور فلزات سنگین و مواد آلاینده برای افزایش درصد چربی شیر در دام استفاده نمود.



نمودار۱ : میزان چربی سنجش شده در گونه‌های مختلف جلبکی در دو فصل سرد(زمستان) و گرم(تابستان)

در میزان پروتئین، اختلاف معنی‌دار بین تمام گونه‌ها و در فصل گرم و سرد مشاهده شد($p<0.05$). مقایسه میزان پروتئین در بین گروه‌های مختلف جلبکی نشان داد *Cystoseira myrica* نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی، از پروتئین بیشتری (۲/۷درصد) برخوردار و در *Padina australis* از همه کمتر (۱/۴۸درصد) است. همچنین در مقایسه کلی میزان پروتئین سنجش شده، در *Cystoseira myrica* طی دو فصل سرد و گرم میزان بالاتری نسبت به سایر گونه‌های جلبکی نشان داد (نمودار۲).



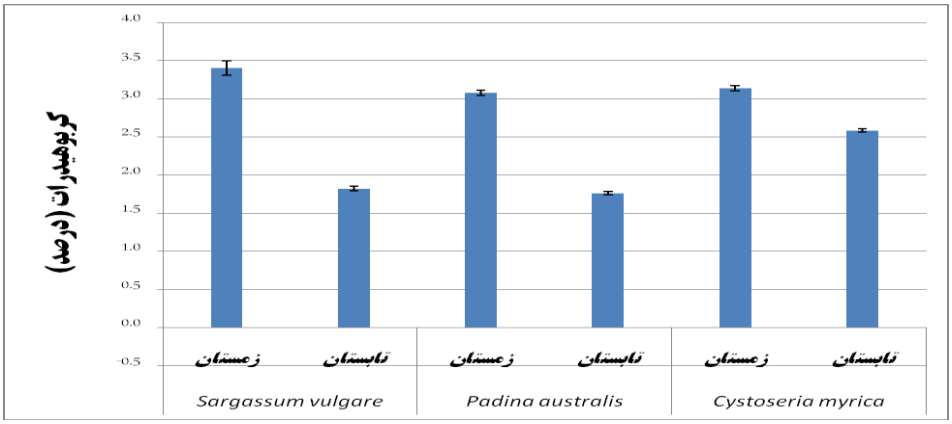
نمودار۲ : میزان پروتئین سنجش شده در گونه‌های مختلف جلبکی در فصل سرد(زمستان) و گرم (تابستان)

میزان پروتئین انواع جلبک دریایی بسیار متفاوت است و به عواملی چون فصل و شرایط محیط بستگی دارد (Gokalakrishnan *et al*., 2015). در این مطالعه میانگین میزان پروتئین در فصل زمستان نسبت به تابستان بیشتر بود. طبق گزارش صفائیان و همکاران پروتئین *Padina boergesenii* در زمستان بیشتر از بهار بوده است. در بررسی خیری و الشافی در ۲۰۱۳، پروتئین در فروردین‌ماه بیشتر از مردادماه بود و بین پروتئین و دمای آب ارتباط منفی وجود داشته است. در مطالعه‌ای، پروتئین جلبک *Sargassum wightii* در زمستان بیشتر از تابستان بود، که با این تحقیق مطابقت دارد.

در مقایسه میزان پروتئین در بین گروه‌های مختلف جلبکی نشان داد میزان پروتئین از حداقل ۲/۰۶ درصد در *Padina australis* تا حداکثر ۲/۷۰ درصد در *Cystoseira myrica* در فصل زمستان و از ۱/۷۶ درصد در *Cystoseira myrica* تا ۱/۴۸ درصد در *Padina australis* در فصل تابستان، متفاوت می‌باشد، که نتایج این مطالعه با نتیجه به‌دست آمده توسط Fathy (۲۰۰۷) مطابق می‌باشد که بیان کرده است مقادیر پروتئین جلبک‌های دریایی قهوه‌ای در گروه‌های مختلف طبقه‌بندی و یا حتی در گونه‌های یک جنس متفاوت از گونه های مختلف دیگر، متفاوت است (Fathy, 2007). در چندین مطالعه میزان پروتئین جلبک سارگاسوم مورد ارزیابی قرار گرفته است. میزان پروتئین *Sargassum ilicifolium* ۹/۲۵درصد (ولی‌کمال، ۱۳۹۰)، ۵/۹۹درصد (Gojon *et al*., 1998)، ۱۳/۲درصد (Zubia *et al*., 2003)، ۷/۶درصد (Hong *et al*., 2007)، ۶ درصد (Casas *et al*., 2003)، ۴/۷ درصد (Marin *et al*., 2009)، ۱۲/۳۹ درصد (پارسازاده و همکاران، ۱۳۹۷)، در *S.vulgare* ۱۵/۷درصد، *S.finipendula* ۸/۲درصد (Marinho-Soriano *et al*., 2006)، ۷/۶۰درصد (Hong *et al*., 2007)، *Sargassum angustifolium* ۴/۸درصد (کبیری‌فرد، ۱۳۹۸) گزارش شده است. در مطالعه‌ی خیری و الشافی ۲۰۱۳، میزان آن در *U. lactura* (۷/۰۶درصد)، در *Palmaria* sp. (۱۳/۸۷درصد)، در *Laminaria ochroleuca* (۷/۴۹درصد) و در *Enteromorpha* (۹/۴۲درصد) به‌دست آمده که بیشتر از میزان پروتئین جلبک‌های این تحقیق است.

در مورد ارزش غذایی *Padina* و *Cystoseria* گزارشات کمی موجود است. Patarra و همکاران (۲۰۰۱) پروتئین خام *Cystoseira abiesmarin* را ۶/۹۴ درصد گزارش کردند. Goecke و همکاران (۲۰۱۲) پروتئین *Padina fernandez* در شیلی را ۶ تا ۸ درصد به‌دست آوردند. انواع پروتئین‌ها در متابولیسم بدن، نقش کلیدی دارند و مواردی مانند آنزیم‌ها و هورمون‌ها پروتئینی هستند (محمودزاده و کرم‌زاده، ۱۳۹۴). با وجود میزان کم پروتئین در جلبک *Sargassum vulgar* مورد بررسی در این تحقیق (فصل سرد ۲/۲۷درصد و فصل گرم ۱/۶۳درصد) گزارش شده است که جلبک *Sargassum* منبع غنی از اسیدهای آمینه ضروری مانند آرژینین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین است (Carrillo *et al*., 2008).

میانگین میزان کربوهیدرات در فصل زمستان نسبت به تابستان بیشتر بوده است. اختلاف معنی‌داری بین تمام گونه‌ها و در فصل گرم و سرد مشاهده شد ($p<0.05$). مقایسه میزان کربوهیدرات در بین گروه‌های مختلف جلبکی نشان داد *Sargassum vulgare* نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی، از کربوهیدرات بیشتری (۳/۴۰درصد) برخوردار و در *Padina australis* از همه کمتر (۱/۷۶درصد) است. همچنین در مقایسه‌ی کلی میزان کربوهیدرات سنجش شده، در *Cystoseira myrica* طی دو فصل سرد (زمستان) و فصل گرم (تابستان)، میزان بالاتری نسبت به سایر گونه های جلبکی بود (نمودار۳).



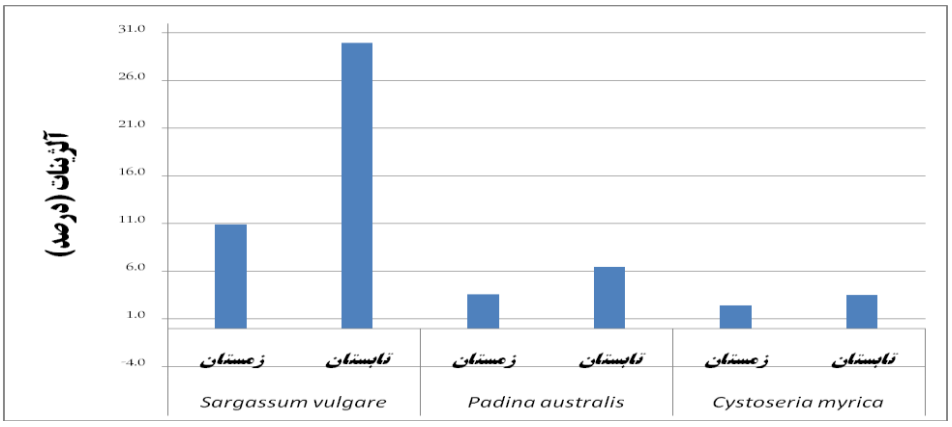
نمودار۳ : میزان کربوهیدرات سنجش‌شده در گونه‌های مختلف جلبکی در دو فصل سرد (زمستان) و گرم (تابستان)

در بررسی حافظیه در ۱۳۹۳، جلبک *Sargassum lentifolium* دارای میزان کربوهیدرات بیشتر در زمستان و کمتر در تابستان بود که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. صفائیان و همکاران (۱۳۹۰) کربوهیدرات *Padina borgesenii* را در بهار بیشتر از زمستان گزارش کردند. *Sargassum vulgare*، از کربوهیدرات بیشتری برخوردار بود که این نتیجه از مطالعه‌ی حاضر با کارهای قبلی انجام شده مطابقت دارد (Gokalakrishnan *et al*., 2015) و در *Padina australis* از همه کمتر بوده است. میزان کربوهیدرات به‌دست آمده در مطالعه‌ی حاضر از حداقل ۳/۰۸ درصد در *Padina australis* تا ۳/۴۰درصد در *Sargassum vulgare* در فصل زمستان و از ۱/۷۶درصد در *Padina australis* تا ۲/۵۸درصد در *Cystoseira myrica* در فصل تابستان، متفاوت

می‌باشد، که نتایج این مطالعه با نتیجه به‌دست آمده توسط Gokalakrishnan و همکاران (۲۰۱۵) منطبق است که بیان کرد میزان پروتئین انواع جلبک دریایی بسیار و به عواملی همچون فصول و شرایط رشد محیط، وابسته است. کربوهیدرات به‌دست آمده در تحقیق حاضر از مقادیر *Ulva lactuca* (۴۶/۴۲درصد)، *Pterocladia capillacea* (۵۰/۹۶درصد) (Khairy & El-Shafay, 2013) کمتر و بیشتر از میزان کربوهیدرات گونه *Padina gymnospora* (۱/۸۶درصد) بود (صفائیان و همکاران، ۱۳۹۰).

کربوهیدرات‌ها بزرگترین بخش (۶۰ تا ۷۰درصد) جیره‌ی غذای یک گاو شیری را تشکیل می‌دهند. میزان کربوهیدرات در *Sargassum filipendula* ۵۳/۷ درصد و *Sargassum vulgare* ۶۷/۸درصد (Marinho-Soriano *et al*.,2006) و در مورد مطالعه دیگری ۳۹ درصد (Casas Valdez *et al*., 2009) است. بیشتر انرژی کربوهیدرات‌ها بعد از جذب مورد استفاده قرار می‌گیرند، بعد از تبدیل شدن به گلیکوژن یا چربی در بدن حیوان ذخیره می‌شوند تا در هنگام لزوم تجزیه شود و به مصرف برسد (محمودزاده و کرم‌زاده، ۱۳۹۴). کربوهیدرات به‌دست آمده از تحقیق حاضر، کربوهیدرات محلول بود و همان‌طورکه ذکر شد، قابلیت هضم بالایی داشت و پتانسیل استفاده در جیره‌ی غذایی دام را دارد.

میانگین آلژینات (درصد) در فصل تابستان نسبت به زمستان بیشتر بود. در فصل سرد سال، اختلاف معنی‌داری بین *Padina australis* با دو گونه‌ی جلبکی دیگر و در فصل گرم بین تمام گونه‌ها وجود دارد (P<۰/۰۵). مقایسه‌ی میزان آلژینات در بین گروه‌های مختلف جلبکی نشان داد *Sargassum vulgare* نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی، از آلژینات بیشتری (۳۰درصد) برخوردار و در *Cystoseira myrica* از همه کمتر (۲/۴درصد) بود. همچنین در مقایسه‌ی کلی میزان درصد آلژینات سنجش شده، در فصل گرم (تابستان) میزان بالاتری نسبت به فصل سرد (زمستان) داشت (نمودار۴).



نمودار۴ : میزان آلژینات سنجش شده در گونه‌های مختلف جلبکی در دو فصل سرد (زمستان) و گرم (تابستان)

درصد آلژینات در جلبک‌های قهوه‌ای بین ۱۳ تا ۵۵ درصد می‌باشد. با توجه به این که بیشترین درصد جلبک‌های دریایی سواحل جنوب کشور، جلبک‌های قهوه‌ای بخصوص *Sargassum* و *Cystoseria* می‌باشد، استخراج مواد با ارزش از این

جلبک‌ها، مهم و قابل‌توجه است (آبکنار و همکاران، ۱۳۸۷). مقادیر آلژینات به‌دست آمده از تحقیقات مختلف به شرح زیر می‌باشد: *Sargassum vulgare* ۲۵/۴۶درصد، *Sargassum tenerrimum* ۱۸/۳۲درصد در هند (Sasraswathi *et al*., 2003)، *Sargassum polycystum* ۱۷/۱۲ تا ۲۷/۰۴درصد در هند، Durvillaea ۳۰ تا ۵۵درصد در نیوزیلند (Kelly *et al*., 2000)، *Sargassum oligocystum* ۱۶ تا ۱۹درصد، *S. polycystum* ۵ تا ۱۱/۴درصد (Gillespie & Critchley, 1999)، *Sargassum hystrix* ۱۲درصد، *Sargassum zanardinii* ۱۳درصد، *Padina* ۱۱درصد، *Stoechospermum marginatum* ۱۰درصد، *Cystoseria myrica* ۷ درصد، *Colpomenia sinousa* ۵ درصد در چابهار (علوی، ۱۳۷۶). در مطالعه حساس و پایان سال ۱۳۷۵ در جلبک*Sargassum* میزان آلژنیک‌اسید بین ۱۷/۲ تا ۳۲/۶ درصد بود. Saraj در سال۱۹۸۸ در *Sargassum* سواحل مالزی، میزان آلژنیک‌اسید را ۳۲ درصد گزارش نمود. بدین ترتیب میزان آلژینات به‌دست آمده در این تحقیق (۳۰درصد) از مقدار مناسب برخوردار است. باتوجه به این که میزان درصد آلژینات در گونه‌های مختلف مورد مطالعه متفاوت بود، بالاترین مقدار در هر دو فصل در جلبک *Sargassum vulgare* مشاهده شد. میانگین درصد آلژینات در فصل تابستان نسبت به زمستان بیشتر و در *Cystoseira myrica* از همه کمتر بود. *S. polycystum* در هند بیشترین مقدار در بهمن به‌دست آمد (Saraswathi *et al*., 2003). بیشترین میزان آلژینات در *Sargassum elegance, Sargassum sp* در آفریقای جنوبی در تابستان به‌دست آمده است (Gillespie & Critchley, 1999) که با این تحقیق همخوانی دارد. مطالعه مقایسه میزان اسیدآلژنیک استحصال شده از جلبک قهوه‌ای*Sargassum* و *Cystoseria* در سواحل چابهار، نشان داد در دو گونه مقدار یکسان نداشت و بیشترین درصد متعلق به جلبک*Sargassum* (۳۲/۱درصد) در فصل پاییز بوده است. میزان آلژینات در این مطالعه در فصل پاییز بیشتر از زمستان بود (آبکنار و همکاران، ۱۳۸۷)، یعنی تحت تأثیر دما می‌باشد که در پاییز نسبت به زمستان گرمتر است، در تحقیق حاضر نیز میزان آلژینات در فصل گرم تابستان بیشتر از زمستان می‌باشد. در نتایج آبکنار و همکاران (۱۳۸۷) نیز میزان آلژنیک برای*Sargassum* در هر دو فصل نسبت به *Cystoseria* بیشتر بود. Siraj در سال ۱۹۸۸ گزارش کرد که مقدار اسیدآلژنیک و نمک‌های آلژینات در جلبک‌های قهوه‌ای در فصول، مناطق جغرافیایی و عمق‌های مختلف، تغییر می‌نماید. میزان آلژینات استخراج شده از سه گونه‌ی مورد مطالعه‌ی حاضر در دو فصل زمستان و تابستان، بین ۲/۴۰ تا ۳۰درصد متفاوت بود. مطالعات درخصوص تغییرات فصول روی میزان آلژنیک‌اسید در جلبک پادینا و سارگاسوم نشان می‌دهد که آلژنیک‌اسید در *Padina* در ماه آگوست به بالاترین میزان یعنی ۲۳ تا ۳۰ درصد می‌رسد اما در جلبک*Sargassum* در ماه‌های آوریل و آگوست بالاترین میزان می‌باشد (Fattah & Hussein,1969). این میزان در سواحل کشور انگلستان، ۲۱ درصد عنوان شد (آبکنار و همکاران، ۱۳۸۷). با بررسی این تحقیق مشخص می‌شود که در مناطق جغرافیایی متفاوت میزان این مواد حتی در گونه‌های مشابه نیز دارای اختلاف قابل توجهی است، دلیل این امر این است که مناطقی که جلبک‌ها در آن رویش داشته‌اند کاملاً از نظر حرارت، ترکیبات آب منطقه و شدت نور با

یکدیگر متفاوت هستند و از آنجاکه مواد مغذی در هر یک از این مناطق فرق دارد، مستقیماً بر روی میزان و ترکیبات تشکیل‌دهنده تأثیر می‌گذارد. درضمن در برخی از ماهها باتوجه به مرحله رشد جلبک‌ها و تغییر ترکیبات آن‌ها، مقدار اسیدآلژنیک در آن‌ها به حداکثر و در مرحله‌ی دیگر به حداقل می‌رسد. میزان آلژینات‌ها، کیفیت و ویسکوزیته‌ی آن در جلبک‌های قهوه‌ای به فصول مختلف سال بستگی دارد، معمولاً مقدار آلژینات‌ها از حداقل در مرحله‌ی جوانی به حداکثر مقدار در مرحله بلوغ می‌رسد و بعد از مرحله‌ی بلوغ دوباره کاهش چشمگیری دارد، به شرایط اکولوژیکی و حتی زمان برداشت نیز بستگی دارد (UNDP,1990). طبق مطالعات مشخص شده است که در طی ماههای گرم سال میزان فیکوکلوئیدی گونه‌های جلبک‌های قهوه‌ای یعنی میزان آلژینات‌ها افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد (سهرابی‌پور،۱۳۸۲). گونه‌های *Sargassum* با افزایش میزان تولید پلی‌ساکاریدهایی همچون اسیدآلژنیک، باعث استحکام بیشتر دیواره‌ی سلولی و مقاومت آن نسبت به افزایش درجه‌حرارت می‌شود که موجب افزایش تولید این گونه‌ها در طی ماه‌های گرم سال است (سهرابی‌پور،۱۳۸۲ ؛ Dawes,1998). با توجه به دارا بودن ارزش ترکیبات بیوشیمیایی در جلبک‌های قهوه‌ای مورد مطالعه، به‌عنوان مثال میزان آلژینات بالا در *Sargassum vulgare*، جلبک دریایی همچنین می‌تواند به‌عنوان یک ماده‌ی آلی در برخی از مواد غذایی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به این که دو گونه *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria* sp از جلبک‌های قهوه‌ای تنها در فصل سرد (زمستان) حضور داشتند، کمترین میزان آلژینات، چربی و پروتئین در فصل زمستان در گونه جلبکی *Iyengaria* sp (به ترتیب ۱/۸۰، ۱۵و ۱/۹۳درصد) و میزان کربوهیدرات در *Colpomenia sinousa* از همه کمتر (۲/۷۴درصد) بود. *Iyengaria* sp از همه کمتر (۱/۸۰درصد) آلژینات داشت (جدول۱).

جدول۱: میزان ترکیبات بیوشیمیایی (Mean±SD) جلبک‌های قهوه‌ای بندر لنگه در فصل سرد (زمستان)

گونه جلبکی	ترکیب بیوشیمیایی			
	پروتئین(درصد)	چربی(درصد)	کربوهیدرات(درصد)	آلژینات(درصد)
Sargassum vulgare	۲/۰.۰۳±۲۷	۰.۰۰±۴۵	۳/۰.۰۹±۴۰	۱۰/۰.۰۰±۹
Padina australis	۲/۰.۰۰۸±۰۶	۱۵.۰۰±۷۵	۳/۰.۰۳±۰۸	۳/۰.۰۰±۶
Cystoseira myrica	۲/۰.۰۲±۷۰	۰.۰۰±۳۰	۳/۰.۰۳±۱۴	۲/۰.۰۰±۴۰
Colpomenia sinousa	۲/۰.۰۲±۳۹	۰.۰۰±۳۰	۲/۰.۰۷±۷۴	۴/۰.۰۰±۷۰
Iyengaria sp.	۱/۰.۰۱±۹۳	۰.۰۰±۱۵	۳/۰.۰۵±۱۲	۱/۰.۰۰±۸۰

نتیجه‌گیری کلی

جلبک‌های قهوه‌ای گونه‌های *Sargassum vulgare*، *Padina australis* و *Cystoseira myrica*، *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria* sp در بندر لنگه دارای ارزش غذایی (پروتئین، چربی، کربوهیدرات و آلژینات) هستند و میزان این ارزش غذایی با توجه به نوع گونه متغیر است؛ میزان ترکیبات استخراج شده تحت تأثیر فصول گرم و سرد تغییر می‌کند. در آلژینات برخلاف سایر ترکیبات، در تابستان و فصل گرم بهترین نتایج مشاهده شد، درحالی‌که سایر ترکیبات بالاترین میزان خود را در فصل سرد

و زمستان داشتند که این میزان با توجه به نوع گونه‌ی جلبکی، متفاوت بود. طبق نتایج به‌دست آمده و با درنظر گرفتن میزان بالای چربی در جلبک‌های این پژوهش می‌توان از آن‌ها برای افزایش چربی شیر دام استفاده نمود. همچنین آلژینات به‌دست آمده در این تحقیق دربین جلبک‌های قهوه‌ای مطالعه شده، از مقدار مناسبی برخوردار است و می‌توان آن را برای استفاده در صنایع مختلف استخراج نمود.

فهرست منابع

آبکنار، ع.م.، پیغمبری، س.ی.، سجادی، م.م. و عبیدی، م.ر.، ۱۳۸۷. مقایسه میزان اسیدآلژنیک استحصال‌شده از جلبک‌های قهوه‌ای *Cystoseria indica*، *Sargassum illicifolium* و *Nizimuddinina zanadrini* در سواحل چابهار. شماره۸۰، پاییز. صص ۴۹-۵۴.

ابهری، س.ر.، ۱۳۷۲. گیاهان ماکروسکوپی بین جزرومدی خلیج گواتر. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۵ ص.

پارسازاده، م.؛ خدادای، م.؛ تدینی، م.، ۱۳۹۷. استخراج پروتئین از جلبک قهوه‌ای و بررسی خصوصیات عملکردی آن. علوم و صنایع غذایی شماره ۸۲، دوره ۱۵، آذر ۱۳۹۷ .

پایگاه خبری صنعت مرغداری و دامپروری. http://www.itpnews.com/home/show. خرداد ۱۳۹۸.

حافظیه، م.، ۱۳۹۳. ارزش غذایی گیاه دریایی *Sargassum lentifollium* خلیج چابهار (دریای عمان)- قبل و بعد از مانسون. مجله علمی شیلات ایران، سال بیست وسوم/شماره۱/بهار۱۳۹۳.

ربیعی، ع.، ۱۳۶۹. تأثیر عوامل مختلف بر درصد چربی شیر. کشاورزی و دام. دوره۳-شماره۲، صص۶۰-۵۵.

ریاحی، ح.، ۱۳۸۷. جلبک‌شناسی. دانشگاه الزهرا- تهران، ۲۷۲ص.

سهرابی پور، ج.، نژادستاری، ط.، اسدی، م.، و قهرمان، ا.،۱۳۸۲. تحقیقی پیرامون شناسایی و میزان تولید جلبک‌های قهوه‌ای و تأثیر عوامل اکولوژیک مختلف برروی این رویش‌ها در سواحل بندر لنگه. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره ۵۹، تابستان. صص۴۴ تا ۵۸.

شوقی، ح.،۱۳۷۴. شناسایی جلبک‌های سواحل استان سیستان و بلوچستان. مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور (چابهار). ۸۰ ص.

صفاییان، ش.، گیویان راد، م.ه.؛ فرزادمنش، ش.، ۱۳۹۰. تغییرات شیمیایی عناصر و املاح معدنی جلبک قهوه‌ای *Padina boergesenii* در ساحل قشم. مجله پژوهشی علوم و فنون دریایی، شماره۳، دوره۶، پاییز۱۳۹۰. صص ۶۱ -۶۹ .

علویان، ز.، ۱۳۸۱. بررسی فراوانی و پراکنش جلبک‌های ماکروسکوپی سواحل کیش در ارتباط با آلودگی‌های زیست محیطی. مجله علمی پژوهشی شیلات. شماره۳. سال یازدهم. صص۸۰-۶۳.

علوی، ا. ۱۳۷۶. استخراج اسیدآلژینیک از جلبک‌های قهوه‌ای دریای جنوب و تفکیک آلژینات‌ها بر پایه وزن مولکولی، دانشگاه تهران. ۲۱۶ ص.

قرنجیک، ب.م. و روحانی قادیکلایی، ک.، ۱۳۸۸. اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، مدیریت اطلاعات علمی. ۲۰۲ص.

قرنجیک، ب.م.، نظری، ب.، سعیدپور، ب. و ولی نسب، ت.، ۱۳۹۵. تعیین پراکنش و برآورد توده زنده جلبک‌های دریایی به ساحل آورده شده در آب‌های ساحلی دریای عمان. مجله علمی شیلات ایران، سال بیست و پنجم، شماره۳، پاییز.

کبیری فرد، ع.، دشتی‌زاده، م.، کمالی، ا.ا.، حاج، ح.، ۱۳۹۸. مقایسه ارزش غذایی جلبک دریایی سارگاسوم آنگوستیفولیوم در سواحل استان بوشهر با جلبک دریایی سیستوسریا الیویکا در سواحل استان سیستان و بلوچستان برای تغذیه نشخوارکنندگان. فصلنامه پژوهشی محیط زیست جانوری، سال یازدهم، شماره۳، پاییز.

محمودزاده، ه.، کرم‌زاده، م.ج.، ۱۳۹۴. اصول تغذیه دام. شرکت چاپ و نشر کتاب‌های ایران. تهران. ۷۸ص.

ولی‌کمال، ع.ر.،۱۳۹۰. تأثیر سطوح مختلف جلبک دریایی *Sargassum ilacifolium* بر روی عملکردی و فراسنجه‌های خونی و شکمبه‌ای بره‌های پرواری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

Borgesen, F. (1939) Marine algae from the Iranian Gulf especially from the innermost part near Bushehr and Khark. No.1, pp: 47-141.

Carrillo, S., Lopez, E., Casas, M.M., Avila, E., Castillo, R.M., Carranco, M.E., Calvo, C., and Perez-Gil, F. (2008) "Potential use of seaweed in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs", Journal of Applied Phycology, No.20, pp: 721-728.

Casas, M., Hernandez, H., Marin, A., Agulia, R., and Carrillo, S. (2003) "Use of sargassum spp algae as supplement for goats and cattle", XIII congress latinoamericano de Nutrition, 9-13 Noviember, Acapulco Guerrero, Mexico.

Dawes, C.J. (1998) Marine Botany. 2nd edition, A Wiley interscience publications, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, p. 480.

Endlicher, S.L. and Diesing, C.M. (1845) Enumeration algarum, quas ad oram insulae karek, Sinus persici legit Theodoras kotschy. Bot. Zeitung. No.3, pp: 268-279.

Fathy, A.A. (2007) Evaluation of Nutritional Composition of Some Attached And Drifted Marine Algae From Alexandria, Egypt. Egyptian Journal of Phycol. No.8, pp: 131-141.

Fattah, A.H. & Hussein, M.M. (1969) Composition of some brown algae as influenced by seasonal variation. Phytochemistry. Vol.9(4), pp: 721-724.

Gillespie, R.D. & Critchley. A.T. (1999) Phenology of *Sargassum* spp. (Sargaceae, Phaeophyta) from Reunion Rocks, Kwazul, Natal, South Africa. Hydrobiologia. Pp: 201-210.

Goecke, F., Escobar, M., and Collantes, G. (2012) "Chemical composition of *Padina fernandeziana* (Phaeophyceae, Dictyotales) from Juan Fernandez Archipelago, Chile", Rev Latinoum Biotecnol Amb Algal, Vol.3 (2), pp: 95-104.

Gojon, H.H., Siqueiros, D.A., and Hernandez, H. (1998) "In situ ruminal digestibility and degradability of *Macrocytis pyrifera* and *Sargassum spp* in bovine Livestock", Giencias Marinas, Vol.24, pp: 463-481.

Gokulakrishnan, S., Raja1, K., Sattanathan, G. & Subramanian, J. (2015) Proximate composition of Bio Potential Seaweeds from Mandapam, South East Coast of India. International Letters of Natural Sciences. SciPress Ltd., Switzerland. Vol. 45, pp: 49-55.

Goecke, F., Eschobar, M. and Collantes, G. (2012) Chemical composition of *Padina fernandeziana* (Phaeophyceae, Dictyotales) from Juan Fernandez Archipelago, Chile. *Rev Latinoun Biotecnol Amb Algal*, Vol.3(2), pp: 95-104.

Gosch, Byorn J., Marie Hagnusson, Nicholas A Paul and Rocky De Nys. (2012) Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofocil and bioproducts. Vol.4, pp: 919-930 .

Hong, D.D., Hein, H.M. and Son, P.N. (2007) Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. Journal of Applied Phycology, Vol.19, pp: 817-826.

Hong, D.D., Hein, H.M., and Son, P.N. (2007) "Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer", Journal of Applied Phycology, No.19, pp: 817-826.

Istini, S., Ohno, M. & Kusunose, H. (1994) Methods of Analysis for Agar, Carrageenan and Alginate in Seaweed. Bull, Mar. Sci. Fish., Kochi Univ. No. 14, pp. 49-55.

Kelly, B.J., Brown, M.T. (2000) Variations in the alginate content and composition of *Durvillaea antarctica* and *D. willana* from southern New Zealand. J. Appl. Phycol. No. 129, pp: 317-324.

Khairy, M.; El-Shafay, Sh.M. 2013. Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt, Hanan. OCEANOLOGIA, Vol.55 (2), pp: 435–452.

Kochert, G. (1978) Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid method. In: Handbook of physiological and biochemical methods (eds. Hellebust, J.A. and Craige, J.S.) Cambridge University Press, London. Pp: 95-97.

Kumar, S. (2013) A comprehensive analysis of alginate content and biochemical composition of leftover pulp from brown seaweed *Sargassum wightii*. Ph.D. Thesis, 2013, University of Delh.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., No.193, pp: 265-275.

Marin, A., Casas-Valdez, M., Carrialo, S., Hernandez, H., Monroy, A., Sangines, L., and Perez-Gil, F. (2009) "The marine algae *Sargassum* spp. (*Sargassaeae*) as feed for sheep in tropical and subtropical regions", International Journal of Tropical Biology, No.37, pp: 1274-1281.

Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., and Moreira, W.S.C. (2006) "Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds", Bioresource Technology, No.97, pp: 2402-2406.

Mohammadi, M.; Tajik, H.; Hajeb, P., 2013. Nutritional composition of seaweeds from the Northern Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 12(1), pp: 232- 240.

Saraswathi, S.J., Babu, B., Renggasamy, R. (2003) Seasonal- Studies on the alginate and its biochemical compositional: *Sargassum polycystum.* Phycol. Res. No.51, pp: 240-243.

Siraj, O. (1988) Composition of alginates from brown seaweeds, *Sargassum* and *Padina* spp. Pertanica. Vol.11(1), pp: 79-85 .

Sohrabipour, J. and Rabii, R. (1999) A list of marine algae of seashores of Persian Gulf and Oman Sea in the Hormozgan province. Iran. Journal. Bot. Vol.8(1), pp: 132-162.

Sze, Ph., 1986. A biology of the algae. Wm. C. Brown. America. 251P.

UNDP (1990) *Traning* Manual on Gracilaria Culture and seaweed processing in China. FAO. /By the Regional Seafarming Development and Demonstration Project (RAS/90/002).90P.

Zubia, M., Payri, C.E., Deslandes, E., and Guezennec, J. (2003) "Chemical composition of attached and drift specimens of *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (phaeophyta: Fucales) from Tahiti, French Polynesia", Botanica Marina, No.46, pp: 562-571.

Determining the amount of some chemical compounds of the dominant species of brown algae in Lengeh port, Hormozgan province of Iran

H. Jafari[1*], F. Rafiee[2], A. Ashja Ardalan[3]

Received:2020.10.11
Accepted:2021.2.14

Abstract

In this study, some biochemical compounds of taxa of brown algae, belonging to 5 different genera in Lengeh port, Hormozgan province, including *Sargassum vulgare* (C. Agardh, 1820), *Padina australis* (Hauck, 1887), *Cystoseira myrica* (C. Agardh, 1820) *Colpomenia sinousa* (Derbes & Solier, 1851) and *Iyengaria* sp. (Borgesen) were studied in winter (February 2019) and summer (July 2018). Algae were collected at low tide. Extraction of protein was performed by Lowry method, lipid by Freeman method, carbohydrate by phenol sulfuric acid method and alginate by Istini method. As well the highest percentage of protein from algae *Cystoseira myrica* 2.7 % in February, lipid with 75 % of the algae *Padina australis* in February, carbohydrates with 3.4% from algae *Sargassum vulgare* in February and alginate with 30% were achieved in July. The mean differences of these compounds between February and July were significant ($P < 0.05$). According to the obtained results of this study and considering the high amount of lipid of algae, they can be used to increase the fat content of animal milk. Also, the amount of alginate obtained in this study is suitable among the brown algae studied and it can be extracted for using in various industries.

Keywords: *Protein, Brown algae, Lipid, Phycocloid, Carbohydrate*

1- Master of Marine Biotechnology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[*](Corresponding Author: jfrihadis@gmail.com)
2- Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۷۰-۸۲
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 70-82
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۰

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34174.1395

بررسی موقعیت اسیدهای آمینه آروماتیک آنزیم پراکسیداز تربکوهی واسرشته شده با فلز روی؛ آنالیز مشتق مرتبه دوم گراف‌های طیف سنجی[1]

محمدرضا رجبی[1]، نجمه هادی‌زاده شیرازی[2*]

چکیده

در تحقیق حاضر موقعیت اسیدهای آمینه آروماتیک به عنوان عناصر مهم در تشکیل و پایداری ساختار سوم آنزیم پراکسیداز تربکوهی دناتوره شده با فلز روی، با کمک آنالیز گرافهای مشتق مرتبه دوم داده های طیف سنجی مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور، مشتق مرتبه دوم گرافهای جذبی و نشری با ۱۰ تکرار در محدوده ماوراء بنفش مرئی از طیف سنجی دورنگنمایی دورانی و فلورسانس برای آنزیم در حضور ۵۰۰-۱۰۰ میکرومولار کلرید روی با کمک نرم افزار متلب تهیه و مطالعه شده است. نتایج نشان می دهد که یون روی فشردگی میکروساختارهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک را بویژه برای تریپتوفان کاهش داده است با اینحال حتی با غلظت ۵۰۰ میکرو مولار روی، تریپتوفان مستقیما در معرض حلال آبدوست قرار نمی گیرد. بطورکلی به نظر می رسد که در واسرشتگی آنزیم توسط فلز روی، تریپتوفان اهمیت بیشتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه آروماتیک دارد.

واژه‌های کلیدی: تریپتوفان، ساختار سوم پروتئین، واسرشتگی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
۲- استادیار گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
*(نویسنده مسئول: nhadizade@riau.ac.ir)

۱- این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجو محمد رضا رجبی با راهنمایی دکتر نجمه هادی زاده شیرازی عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن بوده است.

مقدمه

پراکسیداز ترب کوهی ((Horseradish peroxidase (HRP)) (EC 1.11.1.7) عضو مهمی از گروه پراکسیدازهای گیاهی است که اکسیداسیون و پراکسیداسیون انواع ترکیبات آلی و غیرآلی را کاتالیز میکند. چندین ایزوآنزیم اسیدی، خنثی و قلیایی برای HRP شناسایی و طبقه بندی شده‌اند که در میان آنها HRP-C شناخته شده‌ترین و پرکاربردترین ایزو آنزیم از نظر صنعتی و تحقیقاتی است (Thomas *et al*., 2010). این ایزوآنزیم یک گلیکوپروتئین مونومر با وزن مولکولی ۴۴۰۰۰ دالتون است که به صورت غیرکووالان به هشت زنجیره‌ی کربوهیدرات و یک گروه هِم متصل می شود (Lopez *et al*., 2014). گروه هم که به عنوان گروه پروستتیک آنزیم نیز شناخته می شود از یک گروه پورفیرین همراه با یک یون آهن سه ظرفیتی تشکیل شده و در فعالیت اکسیداسیون و احیا دخالت می کند. به‌صورتی که تغییر قدرت پیوندهای موجود در حلقه‌های پورفیرین و یا اتصالات بین یون آهن و پورفیرین منجر به تغییر فعالیت آنزیم می شود(Sun *et al*., 2010, Vlasits *et al*., 2010). تحقیقات نشان داده اند که وجود سایر عناصر واسطه در محیط اطراف پروتئین، فعالیت آنزیم را به شدت تحت تاثیر قرار می دهد. وجود یونهای مس با غلظت یک میکرومولار منجر به کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز در تربچه (Raphanus sativus) می شود (Chen *et al*., 2002). همچنین این نتیجه برای اثرات مهارکنندگی فلزاتی مانند کبالت، سرب، نیکل، آلومینیوم و مولیبدن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز دو گونه‌ی Rosmarinus officinalis و Eruca sativ تایید شده است (Atrooz *et al*., 2016).

با توجه به نقش آنزیمهای پراکسیداز در تنفس سلولی، مطالعه‌ی تاخوردگی و واسرشتگی این آنزیمها در حضور مهارکننده‌ها از اهمیت فراوانی برخوردار است (Khan *et al*., 2014). بر اساس نظریات تاخوردگی پروتئین، اسیدهای آمینه آروماتیک و به ویژه تریپتوفان نقش اصلی را در تشکیل هسته مرکزی ساختار سه بعدی پروتئین دارند (Sanchez *et al*., 2008). به منظور بررسی فشردگی هسته مرکزی تاخوردگی، تغییرات ساختاری به کمک اندازه‌گیری فلورسانس ذاتی و یا فلورسانس القایی با کمک ۸- آنیلینو ا- نفتالن سولفونیک اسید (ANS) توسط دانشمندان مختلف انجام شده است (Saud *et al*., 2019, Sáez-Jiménez *et al*, 2016). با این حال به‌دلیل وجود تنها یک اسید آمینه تریپتوفان در توالی اسید آمینه HRP (W ۱۱۷) شدت نشر فلورسانس این آنزیم در محدوده‌ی ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر نسبت به سایر پروتئین‌ها بسیار کمتر است (Ohlsson *et al*., 1986). بعلاوه گروه پروستتیک هم در ساختار این آنزیم به عنوان یک خاموشگر عمل می‌کند و شدت نشر فلورسانس ذاتی را برای این آنزیم به صورت قابل توجهی کاهش می دهد (Lasagna *et al*., 1999).

ساختار کریستالوگرافی HRP نشان‌دهنده‌ی آن است که فاصله تقریبی اسید آمینه تریپتوفان با جایگاه فعال و گروه هم ۱۸-۱۲ آنگستروم است (Das & Mazumdar, 1995). بنابراین ردیابی موقعیت قرارگیری میکرومحیط های اطراف تریپتوفان می تواند شاخصی از وضعیت واسرشتگی و یا تغییر فعالیت آنزیم در شرایط مختلف باشد (Lasagna *et al*., 1999). علاوه بر طیف سنجی فلورسانس، تکنیک‌های دیگری مانند دورنگ نمایی دورانیCD (Circular Dichroism) نیز تغییرات ساختار پروتئین

در محل اسیدهای آمینه آروماتیک را نشان می دهد. بر این اساس برای حل محدودیت‌های طیف سنجی فلورسانس در مطالعه تغییرات ساختار سوم HRP می توان از مشتقات درجه دوم طیف جذب CD آنزیم نیز در محدوده طول موجی ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر استفاده کرد (Chudzik *et al*., 2017). در این روش، تغیرات جذب هر سه اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین به صورت مجزا و با کمک تجزیه طیف جذبی امکان پذیر است (Ohlsson *et al*., 1986). از آنجایی‌که شکل و مقدار مشتقات طیفها نه تنها به مقدار جذب بلکه به شکل طیف اولیه نیز بستگی دارد، روش آنالیز طیفهای جذبی ماکرومولکولها حساسیت و دقت بالاتری نسبت به آنالیز سنتی طیفهای جذبی خواهد داشت (Kendrick *et al*., 2020). طیف جذب پروتئین مجموع جذب فیزیکی و پراکندگی نور توسط کروموفورها است در حالی که مشتق دوم به طور موثری نویزهای حاصل از پراکندگی نور و سهم طیفی پیوندهای دی سولفید را از بین می برد (Dinh *et al*.,2014). به همین دلیل در این روش، طیفها و پیکهای تداخل یافته در طیف اصلی طی فرایند مشتق گیری از یکدیگر جدا می‌شوند و گراف حاصل قله های بیشتری نسبت به طیف اولیه خواهد داشت. استفاده از گرافهای مشتق مرتبه دوم برای طیف سنجی فلورسانس نیز مانند CD، موجب تفکیک پیک های نشری حاصل از اسیدهای آمینه آروماتیک می شود (Abbas *et al*, 2013).

مطالعات گذشته نشان داده است که یون روی، فعالیت آنزیم HRP را به‌صورت قابل‌توجهی کاهش می دهد (Shirazi *et al*., 2017). بعلاوه، این فلز همزمان موجب بروز تغییرات ساختاری در محل گروه پروستتیک هم و کاهش پایداری دمایی آنزیم می شود (Shirazi, 2019). با توجه به اهمیت اسیدهای آمینه آروماتیک بویژه تریپتوفان در ردیابی تغییرات ساختاری آنزیم HRP و نیز اثر مهارکنندگی فلز روی، این تحقیق با هدف درک تغییرات ساختاری محیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک در HRP مهار شده با فلز روی، صورت گرفت و نیز تأثیر غلظتهای مختلف کلرید روی بر مقدار جذب پرتوهای ماوراء بنفش در محدوده ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر توسط اسیدهای آمینه آروماتیک با کمک طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی اندازه گیری شده و تغییرات هیدروفوبیسیته و فشردگی میکرومحیطهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک با استفاده از آنالیز تهیه‌ی گراف مشتق درجه دوم از طیفهای جذبی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: پودر لیوفیلیزه آنزیم پراکسیداز ترب کوهی، فسفات پتاسیم و کلرید روی از شرکت سیگما خریداری شد. HRP با غلظت ۱mg/ml در بافر فسفات پتاسیم (pH ۶/۷=) حل شد و برای مطالعه های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به هم دار بودن آنزیم، به منظور تعیین درجه خلوص آنزیم از اندازه گیری Rz (Reinheitszahl) استفاده شده است. برای این منظور نسبت جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر (جذب ماکزیمم هم) به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر(جذب پروتئین) بررسی شده است. مقدار پارامتر برای محلول آنزیمی فوق بیشتر از ۳ بوده است که به معنی خلوص قابل قبول آنزیم میباشد.

نمک کلرید روی با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد با غلظت ۰/۱ مولار در آب دیونیزه حل و برای مطالعات ساختاری غلظت‌های ۵۰۰-۰ میکرومولار از محلول اولیه تهیه شد.

طیف سنجی فلورسانس: طیف های فلورسانس در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با کووت های کوارتز ۱ سانتی متر ثبت شد. طیف های فلورسانس در دستگاه طیف سنج فلورسانس PERKIN ELMER (ژاپن) ثبت شد. به منظور تحریک اسید آمینه تریپتوفان، آنزیم در طول موج ۲۹۵ نانومتر تهییج و طیف نشری در محدوده ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر ثبت شد. شکاف های تحریک و انتشار به ترتیب در ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد.

به منظور افزایش دقت در تهیه گرافهای مشتق درجه دوم، طیف فلورسانس HRP در حضور غلظتهای مختلف روی، ۱۰ مرتبه تکرار و قبل از مشتق‌گیری، نرمالیزه شدند. برای این منظور مقدار Z score برای تمامی داده ها محاسبه و به داده‌ی اصلی اضافه شد به این ترتیب گراف نرمالیزه شده تهیه شده است (Abbas et al.,2013). نرمالیزه کردن داده ها و تهیه گراف مشتق دوم فلورسانس با استفاده از نرم افزار متلب (Mathworks Matlab R2020b v9.9) و با کمک الگوریتم Savitzky و Golay محاسبه شده است.

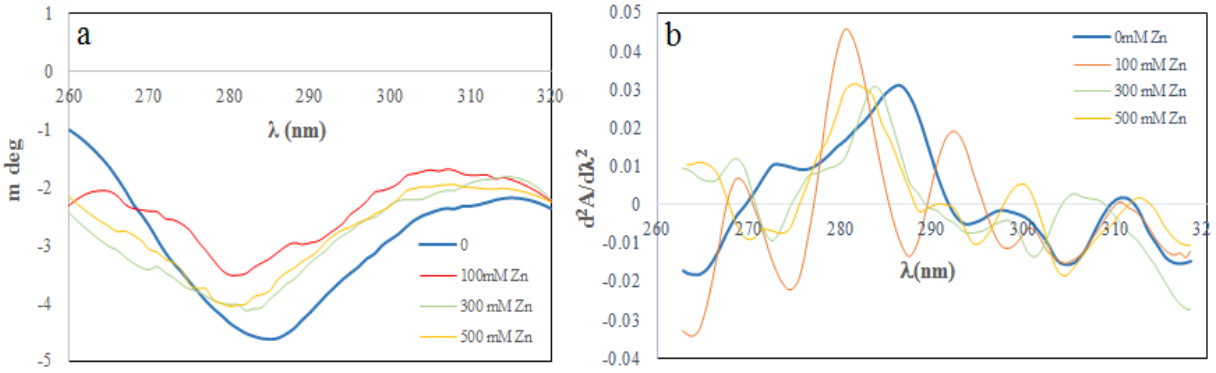
طیف سنجی دورنگ‌نمایی دورانی: در این تحقیق طیف CD توسط اسپکتروپلاریمتر Jasco-J-715 (ژاپن) و با کمک کووت ۱ میلی‌متری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ثبت گردید. تمامی داده ها به صورت پیوسته و با سرعت اسکن ۲۰ نانومتر بر دقیقه در محدوده طول موجی ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر اندازه گیری شده اند. غلظت پروتئین استفاده شده ۲ mg/ml در ۱۰۰ میلی مولار بافر پتاسیم فسفات و گراف CD بافر در هر تست از گراف نمونه کم شده است. به منظور افزایش دقت محاسبات، برای هر گراف ۱۰ تکرار تهیه و پس از میانگین‌گیری و نرمالیزه کردن، با کمک نرم افزار متلب مشتق گیری شده است.

نتایج

گراف دو رنگ‌نمایی دورانی در محدوده نور ماوراءبنفش نزدیک برای تغییرات ساختار سوم پروتئین پراکسیداز در نتیجه میانکنش با غلظتهای مختلف کلرید روی در تصویر۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داده اند که غلظت ۱۰۰ میلی مولار کلرید روی به صورت قابل توجهی ساختار سوم آنزیم را کاهش داده است با این حال این روند برای سایر غلظتها ادامه دار نبوده است و در غلظتهای ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی مولار ساختار آنزیم جذب بیشتری را در محل اسیدهای آمینه آروماتیک از خود نشان می دهد (تصویر 1a). همچنین آنزیم HRP در محدوده نور ۳۲۰-۲۵۰ نانومتر دارای یک قله در محدوده های ۳۱۰-۲۶۰ نانومتر است که λ_{max} آن در میانکنش با فلز روی به سمت طول موجهای کوتاه‌تر شیفت پیدا کرده است.

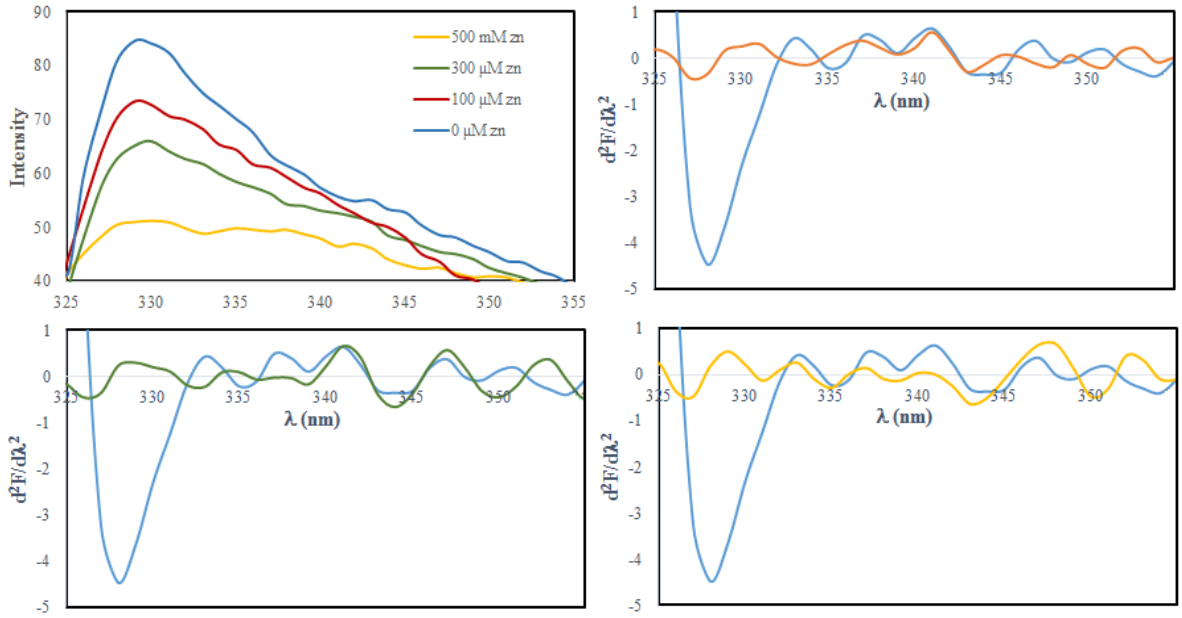
با توجه به دخالت سه اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین در شکل گیری گراف ساختار سوم در طیف سنجی CD و تداخل طیف جذبی این سه اسید آمینه در گراف ساختار سوم و برای درک و بررسی نقش هرکدام از این اسیدهای آمینه

در تغییرات ساختاری آنزیم، مشتقات درجه دوم گراف ۱a تهیه و مورد بررسی شد. درحالی که گراف ۱a تنها یک قله را نشان می دهد، گرافهای مشتق درجه دوم آن طیف جذبی هر کدام از اسیدهای آمینه آروماتیک را از یکدیگر جدا می‌کند و منجر به تشکیل چهار قله در محدوده های ۲۷۵-۲۶۰ نانومتر، ۲۹۳-۲۷۶ نانومتر، ۳۰۳-۲۹۳ نانومتر و ۳۱۵-۳۰۳ نانومتر می‌شود (تصویر ۱b). بررسی گرافهای مشتق درجه دوم نشاندهنده آن است که بیشترین تغییرات در محدوده ۳۰۰-۲۷۰ نانومتر است و شدت جذب در محدوده ۳۱۵-۳۰۰ نانومتر کمترین تغییرات را دارد.

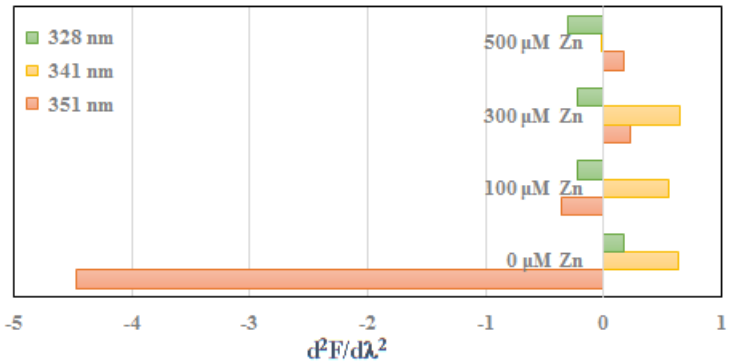


تصویر۱: گراف دورنگنمایی دورانی ساختار آنزیم پراکسیداز در حضور غلظتهای مختلف یون روی. a) گراف درجه اول دورنگنمایی دورانی. b) گراف مشتق درجه دوم دورنگنمایی دورانی

تکنیک طیف سنجی فلورسانس یکی از اختصاصی ترین روشها برای مطالعه و آنالیز میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک است. در طیف فلورسانس ذاتی اسید آمینه تریپتوفان آنزیم HRP، یک پیک در محدوده ۳۵۰-۳۲۵ نانومتر دیده می شود که با افزایش غلظت کلرید روی، شدت آن قویا کاهش پیدا می کند (تصویر ۲a). با کمک محاسبه مشتقات درجه دوم داده های فلورسانس ذاتی، گراف نشر تریپتوفان آنزیم تجزیه و به گرافی با یک مینیمم (۳۲۸ نانومتر) و چهار ماکزیمم (۳۳۳، ۳۳۷، ۳۴۱ و ۳۴۷ نانومتر) تبدیل شده است (تصاویر ۲b-d). شدت قله در ۳۲۸ نانومتر در تمامی غلظتهای کلرید روی کاهش قابل توجهی دارد درحالی که در سایر قله ها کاهش شدت نشر جزئی است با اینحال هیچکدام از پیکهای گراف در نتیجه دناتوراسیون با فلز روی حذف نشده اند (تصویر ۳). نگاهی دقیقتر به گرافهای مشتق درجه دوم گویای آن است که کاهش شدت نشر رابطه مستقیمی با غلظت کلرید روی داشته است و بعلاوه اندکی شیفت آبی نیز در گرافها دیده می شود.



تصویر ۲: a) گراف فلورسانس ذاتی تغییرات ساختار سوم آنزیم پراکسیداز در حضور یون روی. گراف مشتق درجه دوم فلورسانس ذاتی آنزیم در حضور ۱۰۰ میلی مولار (b)، ۳۰۰ میلی مولار (c) و ۵۰۰ میلی مولار روی (d).در تمامی گرافها، گراف آبی رنگ مشخصه آنزیم بدون حضور فلز روی است.



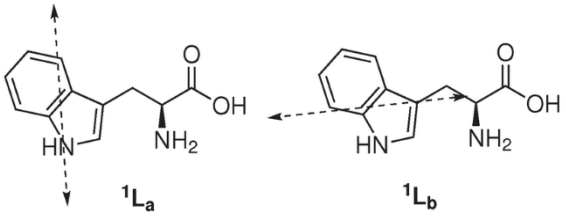
تصویر۳: " تغییرات شدت نشر فلورسانس تغییرات ساختار سوم آنزیم HRP در حضور یون روی حاصل از گراف مشتق دوم در طول موج‌های ۳۲۸، ۳۴۱، ۳۵۱ نانومتر.

بحث

ایزوآنزیم C پراکسیداز تربکوهی آنزیمی با ۳۰۸ اسید آمینه است که ساختاری مشتمل بر ۱۳ واحد هلیکس و یک صفحه کوتاه بتا را می سازند. در ساختار آنزیم ۴ پیوند دی سولفیدی، یک اسید آمینه تریپتوفان، ۲۰ اسید آمینه فنیل آلانین و پنج اسید آمینه تیروزین وجود دارد (Welinder *et al*., 1979). علی رغم وجود تنها یک اسید آمینه تریپتوفان در توالی آنزیم، این اسید آمینه به عنوان پروب اصلی فلورسانس در مطالعات ساختار سوم HRP در نظر گرفته می شود (Kumar *et al*., 2005).

با اینحال نمی توان اثر سایر اسیدهای آمینه آروماتیک را در شکل‌گیری گراف ساختار سوم و در دورنگنمایی دورانی و یا نشر فلورسانس نادیده گرفت. با کمک محاسبه مشتقات درجه دوم طیف جذبی می توان گراف جذبی هر کدام از اسیدهای آمینه آروماتیک را از یکدیگر جدا کرد. بطور کلی هرچه درجه مشتق گیری یک گراف نسبت به یک پارامتر مانند طول موج بیشتر شود به همان میزان رزولوشن گراف افزایش پیدا می کند. برای نمونه استفاده از مشتقات درجه دوم گرافهای جذبی پروتئینها در محدوده نور ماوراء بنفش نزدیک (۳۲۰-۲۵۰ نانومتر) می تواند جزئیات ساختاری فراوانی را برای محقق فراهم کند (Nayar *et al.*, 2002). این نوع از گرافها رزولوشن طیف های جذبی را بالا می برد به‌صورتی‌که در گراف مشتقات درجه دوم طیفهای جذبی (d^2A/dl^2)، گرافهای فنیل آلانین بین ۲۷۰-۲۴۵ نانومتر، تیروزین در محدوده ۲۸۵-۲۶۵ نانومتر و تریپتوفان بین ۲۹۵-۲۶۵ به صورت قله های جدا از هم دیده می شوند (Lucas *et al.*, 2006). این درحالی است که رزولوشن گرافهای جذبی در گراف درجه صفر این اسیدهای آمینه تنها ۲-۱ نانومتر رزولوشن دارند. از این رو تغییرات جذب اسیدهای آمینه آروماتیک بویژه تریپتوفان با کمک گراف مشتقات درجه دوم به‌خوبی قابل مطالعه می شود. بعلاوه درحالی که گراف مشتق درجه یک (dA/dl) تغییرات جذب را نسبت به تغییرات طول موج نشان می دهد، مشتق درجه دوم گرافهای جذبی، بیانگر سرعت این تغییرات خواهد بود. به همین دلیل این نوع از گرافها نسبت به تغییرات جزئی طیفهای جذبی نیز حساس است و شکل پر فراز و نشیب‌تری نسبت به گرافهای درجه صفر جذبی دارند(Chudzik *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه دورنگنمایی دورانی HRP در حضور کلرید روی نشان می‌دهد که یون روی به خوبی می تواند ساختار سوم آنزیم را تحت تاثیر قرار دهد و از فشردگی آن بکاهد (تصویر ۱a). این امر با نتایج حاصل از مطالعات گذشته مبنی بر اثر مهارکنندگی فلز روی بر آنزیم HRP مطابقت دارد (Shirazi, 2018). بطورکلی حلقه اندولی اسید آمینه تریپتوفان دارای ممان دوقطبی قوی است که به شدت تحت تاثیر شرایط فیزیکی بویژه میزان آبدوستی میکرو محیط اطراف خود قرار می گیرد (Vivian *et al*, 2001). بر اساس تصویر ۱b، تغییر فشردگی میکرومحیطهای اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک یکسان نیست و محیط اطراف اسید آمینه های آمینه تیروزین و تریپتوفان به ترتیب کمترین و بیشترین تغییر را از خود نشان داده اند. شکل طیف CD نور ماوراءبنفش نزدیک توسط تریپتوفان حاصل تداخل دو حالت ممان دوقطبی گذار L_a و L_b در گروه اندولی این اسید آمینه است (تصویر ۴) (Strickland., ۱۹۷۴).



تصویر۴: حالت ممان دوقطبی گذار La و L_b در گروه اندولی اسید آمینه تریپتوفان

گروه آمین موجود در محور ممان گذار L_a ، ممان دو قطبی بزرگی را بر این حالت گذار اعمال می کند و به همین دلیل L_a به شدت به قطبیت محیط حساس است و پیک بزرگی (در محدوده ۲۸۰ نانومتر) را در طیف جذبی می سازد درحالی که گذار L_b (در محدوده ۲۹۰ نانومتر) حساسیت کمتری به قطبیت محیط دارد اما به سادگی تحت تاثیر تغییرات انرژی ارتعاشی محیط قرار می گیرد (Strickland, 1974). مطالعات نشان داده اند که گراف جذبی L_a و تیروزین با یکدیگر تداخل دارند اما این امر برای L_b صدق نمی کند. نتایج این تحقیق نشان می دهد که طیف اختصاصی تیروزین بدون تغییر است و از این رو تغییرات طیف L_a عمدتا به تغییر قطبیت محیط اطراف تریپتوفان مربوط می شود (Gasymov *et al*., 2008, Gasymov *et al*., 2014, Strickland, 1974). با توجه به اینکه طیفهای جذبی در محدوده L_b تقریبا بدون تغییراند به نظر می رسد که در نتیجه واکنش HRP با یون روی، تنها قطبیت میکرومحیطها تغییر کرده و این میانکنش تاثیری بر انرژی های ارتعاشی نداشته است. تغییرات ممان دوقطبی تریپتوفان برای برخی پروتئینهای هم دار دیگر مانند بتا لاکتوگلوبولین نیز در نتیجه دناتوراسیون دمایی گزارش شده است (Halder et al., 2012). همچنین وجود شیفت قرمز در گراف L_a گویای آن است که قطبیت میکرومحیط اطراف اسیدهای آمینه تریپتوفان افزایش پیدا کرده است (Mozo-Villar, 2002). بر اساس مطالعه Ghisaidoobe و همکارانش (۲۰۱۴)، تغییرات سطوح انرژی و ممان دوقطبی تریپتوفان به شدت به حالت گذار La وابسته است و بخش بزرگی از تغییرات فلورسانس ذاتی این اسید آمینه به این دسته از تغییرات دینامیک مربوط می شود (Ghisaidoobe et al., 2014). مطالعات گذشته نشان داده اند که در فرایند دناتوراسیون و کاهش ساختار HRP، تریپتوفان بیشتر از سایر اسیدهای آمینه آروماتیک دخالت دارد. به نظر می رسد که این امر به دلیل نزدیکی این اسید آمینه به گروه پروستتیک هم در آنزیم باشد (Khan *et al*, 2014).

بررسی دقیق‌تر وضعیت اسید آمینه با کمک طیف سنجی فلورسانس ذاتی گویای آن است که نشر فلورسانس تحت تاثیر تمامی غلظت‌های یون روی به شدت کاهش پیدا می کند. مطالعه آنزیم ها یا تکنیک فلورسانس نسبت به تکنیکهای جذبی مانند CD مزایای بیشتری دارد که از آن جمله می توان به نسبت سیگنال به نویز بالاتر و یا حساسیت بیشتر سیگنالهای فلورسانس به ویژگیهای فیزیکی میکرومحیط‌های اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک (تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین) اشاره کرد . با توجه به طبیعت آبگریز اسیدهای آمینه آروماتیک، بویژه تریپتوفان، این اسیدهای آمینه در نواحی مرکزی‌تر پروتئین قرار می گیرد و موقعیت فضایی آن تا زمان دناتوراسیون پروتئین به همین صورت باقی می ماند. با کمک محاسبه مشتق درجه دوم، طیف نشری فلورسانس ناشی از تریپتوفان به سه دسته پیک تقسیم می شود که عبارتند از کلاسI (۳۳۰ نانومتر)، کلاس II (۳۴۰ نانومتر) و کلاس III (۳۵۰ نانومتر). پیک کلاس I به فشردگی میکرومحیطهای اطراف بستگی دارد و زمانی بروز می کند که میکرومحیطها کاملا فشرده باشند (Abbas *et al*., 2013). میانکنش تریپتوفان با اسیدهای آمینه قطبی سطحی و آب در پیک کلاس II دیده می‌شود ولی هنگامی که تریپتوفان به صورت کامل در تماس با آب محیط قرار می‌گیرد پیک کلاس III با شدت

خود را نشان می‌دهد و نسبت به پروتئین طبیعی شیفت قرمز پیدا می کند (Sun *et al.*, 2010). آنزیم HRP سه کلاس خود را در ۳۲۸ نانومتر، ۳۴۱ نانومتر و ۳۵۱ نانومتر نشان می دهد. همانطور که در گراف ۲ دیده می شود، شدت نشر در هر سه طول موج کاهش داشته است اما کاهش نشر در کلاس I قابل توجه تر از سایر طول موجها است. چنین تغییرات ساختاری برای دناتوراسیون انزیم HRP در حضور پراکسید هیدروژن نیز گزارش شده است (Ke *et al.*, 2016). بر اساس این تحقیق ساختار سوم در محل اسید آمینه تریپتوفان دچار واسرشتگی جزئی شده و پیک کلاس I در طول موج ۳۲۹ نانومتر بیشتر از سایرین دستخوش تغییر شده است. لازم به ذکر است که در صورت واسرشتگی کامل آنزیم، یک یا دو کلاس از پیکهای مشتق درجه دوم در گراف حذف خواهند شد (Abbas *et al.*, 2013). بر اساس مطالعات Sun و همکاران (۲۰۱۰)، این فرایند کاهش و شیف λ_{max} در نشر فلورسانس، ناشی از میانکنش تریپتوفان با حلال قطبی می باشد (Sun et al., 2010). بررسی تغییرات فلورسانس اسید آمینه تریپتوفان در میانکنش انزیم HRP با ماتریکسهای سول-ژل نیز نتایج فوق را تایید می کند (Ferrer *et al.*, 2003). به این ترتیب می توان نتیجه گرفت که در میانکنش HRP با فلز روی، ساختار آنزیم به صورت کامل واسرشته نشده است و تنها از شدت فشردگی ساختار در محل اسیدآمینه تریپتوفان کاسته می شود. این یافته ها با نتایج سایر تحقیقات مبنی بر واسرشتگی ناقص HRP در حضور ترکیبات شیمیایی مختلف همخوانی دارد. نتایج تحقیقات Putrugal و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده است که در اولترافیلتراسیون غشائی آنزیم HRP، میانکنش ترکیبات غشایی با گروههای آهن و کلسیم موجود در آنزیم، منجر به تغییرات ساختاری در محل اسیدآمینه تریپتوفان و به دنبال آن کاهش فعالیت آنزیم می شود (Purtugal et al., 2006).

نتیجه‌گیری

آنزیمHRP یکی از آنزیمهای کلیدی در تنفس سلولی است که فعالیت ان به‌شدت تحت تاثیر یونهای فلزی قرار می‌گیرد. با کمک تهیه گرافهای مشتق درجه دوم از گرافهای اصلی اسپکتروفوتومتری این آنزیم در حضور فلز روی، میانکنش اسیدهای آمینه آروماتیک و نیز تغییرات میکرومحیطهای اطراف اسید آمینه تریپتوفان مورد برررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داده است که یون روی فشردگی ساختار سوم آنزیم در محل اسیدهای آمینه آروماتیک را کاهش می‌دهد و این امر برای اسید آمینه تریپتوفان از سایر اسیدهای آمینه آروماتیک بیشتر است. بعلاوه در نتیجه میانکنش آنزیم با فلز روی، فشردگی میکرومحیطهای اطراف تریپتوفان کاهش پیدا می کند اما حتی با غلظت ۵۰۰ میکرو مولار روی، اسید آمینه تریپتوفان مستقیما در معرض حلال آبدوست قرار نمی گیرد و آنزیم به صورت جزئی واسرشته می شود.

منابع

Abbas SA., Gaspar G., Sharma VK., Patapoff TW., Kalonia D. (2013). Application of second-derivative fluorescence spectroscopy to monitor subtle changes in a monoclonal antibody structure. Journal of Pharmaceutical Sciences,102: 52-61.

Atrooz PO., Manar A., Ibrahim A. (2016). Heavy Metals Effect on the Activity and Kinetics of Peroxidase Enzyme in Crude Extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Eruca sativa*. International Journal of Biochemistry Research & Review, 15:1-8.

Chen EL., Chen YA., Chen LM., Liu ZH. (2002). Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. Plant Physiology and Biochemistry, 40(5) 439-444.

Chudzik M., Macia M¸ ek-Jurczyk Z., Pawełczak B., Sułkowska A. (2016). Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin. Molecules, 2017: 22, 34.

Das TK., Mazumdar S. (1995). pH-Induced conformational perturbation in horseradish peroxidase. Picosecond tryptophan fluorescence studies on native and cyanide-modified enzymes. European Journal of Biochemistry, 227:823– 828.

Dinh NN., Winn BC., Arthur KK., Gabrielson JP. (2014).Quantitative spectral comparison by weighted spectral difference for protein higher order structure confirmation. Analytical Biochemistry,464:60-62.

Ferrer ML., del Monte F., Mateo CR (2003) Denaturation and Leaching Study of Horseradish Peroxidase Encapsulated in Sol-Gel Matrices. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 26:1169–1172.

Gasymov OK., Abduragimov AR., Glasgow BJ. (2008). Site-Directed Circular Dichroism of Proteins: 1Lb Bands of Trp Resolve Position- Specific Features in Tear Lipocalin. Analytical Biochemistry, 374:386 395.

Gasymov OK., Abduragimov AR., Glasgow BJ. (2014). Probing Tertiary Structure of Proteins Using Single Trp Mutations with Circular Dichroism at Low Temperature. Journal of Physical Chemistry, B118: 986-995.

Ghisaidoobe AB., Chung SJ. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. International journal of molecular sciences, 15(12), 22518–22538.

Halder UC., Chakraborty J., Das N., Bose S (2012) Tryptophan dynamics in the exploration of micro-conformational changes of refolded β-lactoglobulin after thermal exposure: A steady state and time-resolved fluorescence approach, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 109:50-57.

Ke Z., Ma S., Li L., Huang Q (2016) A fluorescence approach to the unfolding thermodynamics of horseradish peroxidase based on heme degradation by hydrogen peroxide. Chemical Physics Letters, 657:49–52.

Khan AA., Rahmani AH., Aldebasi YH., Aly SM. (2014). Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. Global journal of health science, 6(5), 87–98.

Kendrick BS., Gabrielson JP., Solsberg CW., Ma E., Wang L. (2020). Determining Spectroscopic Quantitation Limits for Misfolded Structures. Journal of Pharmaceutical Sciences, 109:933-936.

Kumar V., Sharma VK., Kalonia DS. (2005). Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. International Journal of Pharmaceutics, 294:193–199.

Lasagna M., Gratton E., Jameson DM., Brunet JE. (1999). Apo horseradish Peroxidase Unfolding and Refolding: Intrinsic Tryptophan Fluorescence Studies. Biophysical Journal, 76:443–450.

Lopez GR., Pinto DC. (2014). Silva Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. RSC Advances, 4: 37244-37265.

Lucas LH., Erosy BA., Kueltzo LE., Joshi., SB., Brandau DT. (2006). Probing protein structure and dynamics by Second - derivative ultraviolet absorption analysis of cation–p interactions. Protein Science, 15:2228–22.

Mozo-Villar´A. (2002). Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins. Journal of Biochemistry and Biophysics Methods, 50: 163–178.

Hadizadeh Shirazi N (2019). Inhibition kinetic and thermal inactivation of horseradish peroxidase in the presence of $Zn2^{+}$ ion. Journal of Food Biochemistry, e12724

Hadizadeh Shirazi N., Keihan AM., Sajjadi S. (2017). Evaluation of oxidative activity of horseradish peroxidase in the presence of zinc ion; spectroscopic and molecular docking study. New cellular and. Molecular. Biotechnology Journal, 27:47-54.

Nayar S., Brahma A., Mukherjee C (2002) Second derivatives fluorescence spectra of indole compounds. Journal of Biochemistry, 131:427-435.

Ohlsson PI., Horie T., Vanderkooi JM., Paul KG (1986) Tryptophan in horseradish peroxidase. Acta Chemica Scandinavica part B.;40(4):257-61.

Saud AM., Shahnawaz Khan M., Alhasan IM. (2019). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). Saudi Journal of Biological Sciences ,26(2):301-307.

Sáez-Jiménez V., Rencoret J., Rodríguez-Carvajal MA. (2016). Role of surface tryptophan for peroxidase oxidation of nonphenolic lignin. Biotechnology and Biofuels, 9:198-203.

Sanchez KM., Gable JE., Schlamadinger DE., Kim JE. (2008). Effects of tryptophan microenvironment, soluble domain, and vesicle size on the thermodynamics of membrane protein folding: lessons from the transmembrane protein OmpA. Biochemistry, 47(48):12844-12852.

Strickland EH. (1974). Aromatic Contributions to Circular Dichroism Spectra of Proteins. Critical Reviews in Biochemistry, 2: 113-175.

Sun F., Zong W., Liu R., Chai J., Liu Y. (2010). Micro environmental influences on the fluorescence of tryptophan. Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 76:142–145.

Thomas L., Poulos L. (2010). Thirty years of heme peroxidase structural biology. Archives of Biochemistry and Biophysics, 500: 3–12.

Vivian JT., Callis PR (2001) Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins, Biophysical Journal, 80(5): 2093-2109.

Vlasits J., Jakopitsch Ch., Bernroitner M., Zamocky M., Furtmüller P G. (2010). Heme peroxidases, mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 500:74–81.

Welinder K .(1979) .Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C. European Journal of Biochemistry, Y6:483-502.

Evaluation of the aromatic amino acids microenvironments of zinc-denatured horseradish peroxidase; second- derivatives spectra analysis

M. R. Rajabi[1], N. Hadizadeh Shirazi[2*]

Received:2020.11.30
Accepted:2021.3.10

Abstract

In the present study, the position of aromatic amino acids as important elements in the formation and stability of the tertiary structure of zinc-denatured peroxidase has been investigated with the help of second-derivative graph analysis of spectroscopic data. For this purpose, the second- derivative of absorption and emission graphs with 10 replications in the visible UV range of circular dichroism and fluorescence spectroscopy for the enzyme in the presence of 500-100 µM zinc chloride was prepared and studied with the help of MATLAB software. The results show that zinc ions reduce the compaction of microstructures around aromatic amino acids, especially for tryptophan. However, even at a concentration of 500 µM zinc, tryptophan is not directly exposed to the hydrophilic solvent. In general, tryptophan seems to be more important than other aromatic amino acids in inhibiting the enzyme by zinc metal.

Keywords: *Tryptophan, Tertiary Structure, Unfolding*

1- MSc student, Department of biology, Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
2- Assistant professor, Department of biology, Roudehen branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
*(Corresponding author: nhadizade@riau.ac.ir)

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۸۳-۹۴
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 83-94
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۴
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.33969.1390

توسعه‌ی نرم‌افزار اندازه‌گیری سطح برگ و مقایسه‌ی آن با روش‌های مرسوم

هومن شریف نسب*[۱]، فریبرز عباسی[۲]

چکیده

سطح برگ نقش مهمی در تجزیه و تحلیل رشد و فتوسنتز دارد. به طور سنتی سطح برگ با استفاده از معادله رگرسیون، روش شمارش شبکه، روش توزین و پلانی‌متری اندازه‌گیری می‌شود. در این مقاله یک الگوریتم ساده، سریع، غیرمخرب و دقیق برای اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از پردازش تصویر، پیاده‌سازی شده است. تصویر از دوربین تلفن همراه به دست می‌آید و در فرمت JPEG ذخیره می‌شود. سپس در نرم‌افزار تدوین و به فرمت Bitmap تبدیل می‌شود. تصویر تبدیل شده‌ی رنگی با استفاده از روش آستانه(threshold) تقسیم‌بندی می‌شود. نویزهای تصویر در منطقه برگ و مقیاس با استفاده از تکنیک انتخاب رنگ منطقه حذف می‌گردد. تعداد پیکسل‌ها در جسم مربع (مقیاس) و منطقه‌ی برگ محاسبه و سطح برگ با شمارش تعداد پیکسل‌ها و با توجه به مقیاس، تعیین می‌شود. در این تحقیق، از ۶ گیاه مختلف پهن‌برگ، باریک‌برگ، پنجه‌ای و کشیده (انگور، آلو، گردو، انجیر، ذرت و نعناع) برای آزمون نرم‌افزار پیشنهادی استفاده شد. از هر گیاه مساحت ۱۰ برگ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت، استفاده از الگوریتم فوق در سطح اطمینان ۹۹٪ با سایر روشهای اندازه‌گیری (پویشگر ثابت، ترسیم بر کاغذ و استفاده از ابزار مساحت‌سنجی مرسوم) تفاوت معنی‌داری نداشت.

واژه‌های کلیدی: پویشگر، تلفن همراه، دوربین، غیرمخرب

۱- استادیار موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
*(نویسنده مسئول: hsharifnasab@yahoo.com)
۲- استاد موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مقدمه

با توجه به اینکه کشاورزی در اقتصاد تاثیر زیادی دارد، لازم است که تولید کشاورزی افزایش یابد و مورد پایش قرار گیرد. تولید محصول بستگی به رشد گیاه دارد که تحت تاثیر نور، دما، مواد غذایی آب و مواد معدنی قرار می‌گیرد. رشد گیاه بستگی به سطح برگ، تعداد برگ و ساقه، عرض ساقه و ارتفاع گیاه دارد. از آنجا که سطوح برگ قسمت اصلی مبادلات انرژی و جرم هستند، فرایندهای مهم مانند پایش سطح سبز، تعرق و فتوسنتز به‌طور مستقیم با شاخص سطح برگ متناسب هستند. مساحت برگ نقش مهمی در تجزیه و تحلیل رشد و فتوسنتز دارد. مساحت برگ با استفاده از روش‌های مختلف مخرب و غیرمخرب اندازه‌گیری می‌شود. در روش‌های مخرب، برگ از گیاه حذف می‌شود و سپس اندازه گیری انجام می‌شود. در روش‌های غیرمخرب ابعاد برگ بدون حذف برگ اندازه‌گیری می‌شود. به طور سنتی سطح برگ با استفاده از معادله رگرسیون، روش شمارش شبکه، روش گرانش و پلانی متری اندازه‌گیری می‌شود. مونتگومری (Montgomery, 1911) رابطه (۱) را برای اندازه گیری سطح برگ پیشنهاد داده است:

$$A = b \times l \times w \qquad (۱)$$

که در آن، b ضریب شکل برگ، l طول برگ و w عرض برگ است. این روش غیرمخرب، سریع و آسان است. اما ایراد آن این است که روابط این چنین برای همه گیاهان یکنواخت نیست، زیرا ضریب b در بین گونه‌ها متفاوت است. در روش شمارش شبکه (Caldas *et al*., 1992) ابتدا برگ از گیاه حذف می شود و بر روی کاغذ شبکه قرار می‌گیرد. خطوط برگ با استفاده از مداد بر روی کاغذ شبکه ساخته شده است. در نهایت سطح برگ با شمارش شبکه‌های تحت پوشش برگ اندازه‌گیری می‌شود. این روش دقیق اما دشوار و وقت‌گیر است که در تعداد زیادی از برگ استفاده می شود. روش توزین نیز برای اندازه‌گیری سطح برگ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ross & Ross, 1995). در این روش برگ از گیاه جدا می‌شود و روی کاغذ سفید قرار می گیرد. کاغذ بر اساس شکل برگ بریده می شود. وزن کاغذ بریده شده با وزن یک کاغذ کامل (با ابعاد مشخص) مقایسه می شود. این روش نیز در هنگام استفاده از برگ های بزرگ دشوار و وقت‌گیر است. پلانیمتر روش سریعتری است، اما دقت آن به ویژه برای برگ‌های نسبتا کوچک محدود است (Caldas *et al*., 1992). برخی از محققان از تکنیک های پردازش تصویر برای اندازه گیری سریع و دقیق سطح برگ استفاده کرده‌اند (Chaohui *et al*., 2010, Sanjay *et al*.,2011a). از اولین تلاش‌ها برای اندازه گیری سطح برگ با کمک پردازش تصویر، می‌توان به تحقیقی که در سال ۱۹۸۸ در امریکا انجام شد، اشاره نمود. در این تحقیق با استفاده از یک رایانه IBM مجهز به یک دیجیتایزر تصویر برگ تهیه و در قالب کدهای ASCII پردازش شد که زمان لازم آن برای نمایش تصویر بر صفحه نمایش بالغ بر ۲۰ ثانیه طول می‌کشید. خطای اندازه‌گیری مساحت برگ‌ها با پیچیده شدن شکل آن‌ها به شدت افزایش می‌یافت به گونه‌ای که مثلاً برای ساده‌ترین شکل برگ میزان خطا ۰/۵±۰/۵٪ و برای برگ‌های کمی پیچیده‌تر میزان خطا ۰/۵۹± ۰/۸ ٪ و برای برگ‌ها با شکل‌های پیچیده‌تر میزان خطا۲/۱±۰/۶۴٪ گزارش شد (William, &

(Crossly, 1988). مساحت برگ با استفاده از مراحل زیر اندازه‌گیری می‌شود: گرفتن تصویر، پیش‌پردازش تصویر، تقسیم منطقه برگ، حذف نویزها و محاسبه‌ی محدوده. برخی از محققان از روش استخراج کانتور (Chaohui. *et al*., Hajjdiab *et al*., Feng *et al*.,2010) برای تقسیم‌بندی منطقه‌ی برگ استفاده می‌کنند و دیگران از تقسیم‌بندی آستانه استفاده می‌کنند (Sanjay *et al*., 2011a). در تحقیقی که در کشور هندوستان انجام شد، برای شناسایی اثرات لک‌های ناشی از بیماری بر روی برگ گیاه، از روش پردازش تصویر استفاده شد که برای شناسایی مساحت برگ از روش آستانه (threshold) ساده و برای شناسایی منطقه بیماری از روش آستانه مثلثی بهره گرفته شد. در این تحقیق با دقت ۹۸/۶٪ بیماریها درست شناسایی شدند (Sanjay *et al*., 2011b). در تحقیق دیگری در سال ۱۹۹۲ در برزیل با استفاده از یک پویشگر دستی و تصویربرداری با کیفیت‌های مختلف بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ نقطه بر اینچ، مساحت برگها اندازه گیری شد. در این تحقیق برای هر میزان دقت یک معادله واسنجی مورد استفاده قرار گرفت. مثلاً برای تصویربرداری با کیفیت ۱۰۰ نقطه بر اینچ رابطه واسنجی (۲) ارائه شد.

$$S_a=1/001* R_a-0.0621 \quad (۲)$$

که در آن، S_a مساحت اندازه گیری شده توسط پویشگر و R_a مساحت واقعی جسم مقیاس می‌باشد. در این رابطه ضریب تبیین $R^2=1$ گزارش شده‌است (Caldas *et al*., 1992).

در سال ۲۰۱۴ در کشور هندوستان محققان نرم‌افزار رایگانی را توسعه دادند که با استفاده از یک پویشگر رومیزی مساحت برگ گیاه را اندازه‌گیری می‌کرد. این نرم‌افزار مساحت برگ‌های کنده شده از گیاه را در بستر Dotnet framework با استفاده از SQL Serverاندازه گیری می‌کرد. مساحت‌های اندازه‌گیری شده با این نرم‌افزار با مقادیر اندازه‌گیری شده با دستگاه Leaf Area Meter ساخت شرکت Disha Infoway هند مقایسه شد و نتیجه گرفتند که برای گونه‌های کلم، زردچوبه، سویا و برگ گندم، میزان خطا کمتر از ۲٪ ± است (Kaur *et al*., 2015). در تحقیقی، محققان از شبکه‌های عصبی برای اندازه‌گیری سطح برگ کمک گرفتند. در این پژوهش، اطلاعاتی که از برگ‌ها در اختیار بود و معمولاً نیز برای تخمین سطح برگ به‌کار می‌رود عبارتند از: طول، عرض، وزن تر و وزن خشک برگ به عنوان ورودی و سطح برگ به‌عنوان خروجی مورد نظر. در این پژوهش اطلاعات مربوط به ۸۰ برگ در اختیار بود و به‌کار رفته‌اند. با استفاده از مشخصاتی که از برگ‌ها در اختیار بود و تلفیق این مشخصات، ورودی‌های لازم برای شبکه‌های عصبی ساخته شد. از این ۸۰ زوج ورودی/خروجی، تعدادی از آنها به‌صورت تصادفی و با احتمال ۰/۷به‌عنوان الگوهای آموزشی و مابقی به عنوان الگوی تست به‌کار رفتند. شبکه عصبی بکار رفته از نوع پرسپترون چند لایه با دولایه مخفی بود که تعداد نورن‌های لایه‌های مخفی ۶ و ۴ انتخاب شد. خروجی شبکه یک نورن داشت که مساحت برگ بود. همه‌ی اطلاعات نرمالیزه شدند. برای رسیدن به بهترین و سریعترین روش، از چهار پارامتر اندازه‌گیری

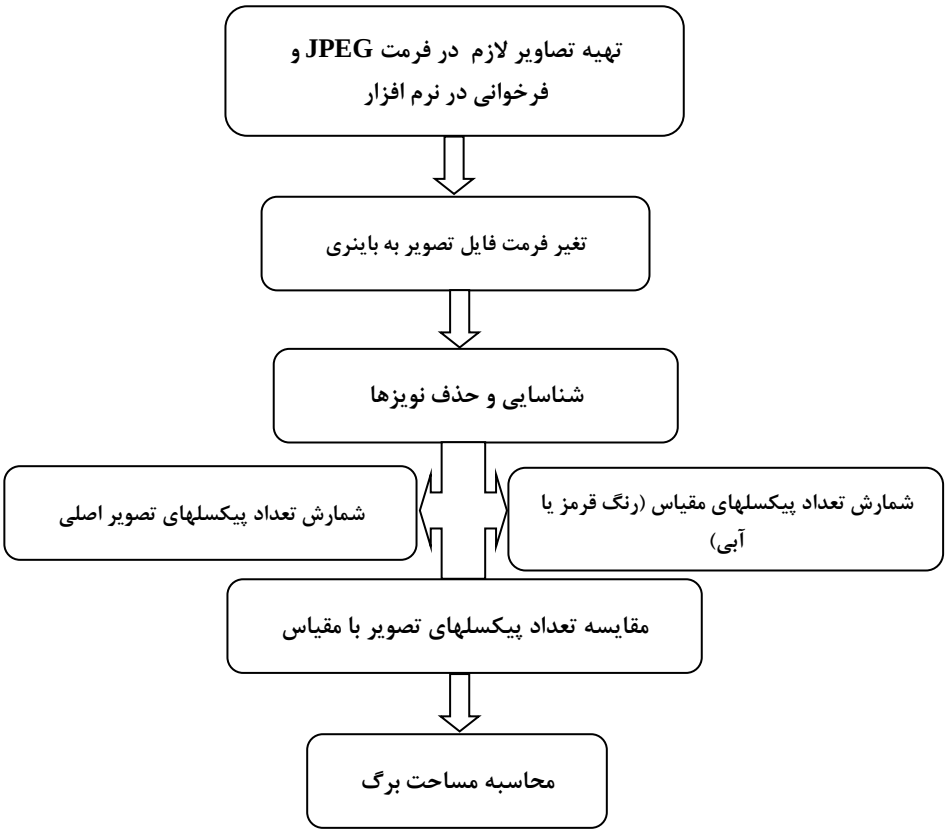
شده به روش‌های مختلـف در تخمین سطح برگ به کمک شبکه‌های عـصبی اسـتفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که بهترین حالت از نظـر دقت و غیرمخرب بودن، استفاده از طول، عـرض و طـول در عرض در ۰/۷ است (موحدیان و همکاران ،۱۳۸۶).

همچنین یک شرکت ایتالیایی نرم‌افزار تحت اندروید را برای تخمین سطح برگ توسعه داده است که بر روی تلفن‌های همراه قابل استفاده است (Confalonieri *et al*., 2014). در تحقیق دیگری برگ‌های ذرت مورد اندازه‌گیری غیرمخرب قرار گرفتند (Sezer *et al*., 2007).

در پژوهشی از عکسبرداری دیجیتال برای برآورد مقدار پوشش گیاهی، شاخص سطح برگ و نیتروژن جذب شده به‌وسیله چغندرقند استفاده شد. عکس‌ها در طول فصل رشد و به‌وسیله دوربین دیجیتال مـدل Canon تهیه شد. با استفاده از نرم‌افزار ILWIS باندهای اصلی شامل قرمز، سبز و آبی (RGB) از عکسها استخراج و ترکیب‌های مختلف باندهای اصلی تهیه شد. نتایج نشان داد که رابطه‌ی شاخص (GMR) (باند سبز منهای باند قرمز) همبستگی مناسبی (۰/۸۴) با مقدار نیتروژن جذب شده توسط چغندرقند داشت. با استفاده از نرم‌افزار MATLAB درصد پوشش سـبز گیـاه چغندرقنـد به‌دست آمد و همبستگی آن با ترکیب به‌دست آمده (GMR) با مقدار ضریب تبیین۰/۷۸مشخص شد. همچنـین بـا اسـتفاده از رابطه‌ای که بین درصد پوشش و ضریب خاموشی وجود داشت، مقدار ضریب خاموشی برای دوره ابتدایی رشد چغندرقند برابـر ۰/۴۹ تخمین زده‌شد (Kamali, *et al*., 2015). در پژوهشی دیگر از یک دوربین دیجیتال اصلاح شده برای تعیین دقیق توزیع مکانی شاخص سطح برگ در یک مزرعه‌ی ذرت علوفه‌ای استفاده شد. با توجه به رزولوشن بالای این سامانه‌ی تصویربرداری (در حد سانتی‌متر) تفکیک پیکسل‌های دارای پوشش گیاهی از پیکسل‌های بدون پوشش گیاهی در تصاویر استخراج شده، به خوبی انجام شد و این موضوع در تعیین درصد پوشش گیاهی (تراکم رشد محصول) موثر بود. شاخص سطح برگ بیشترین همبستگی را با درصد پوشش گیاهی (R^2 =۰/۹۱۹) و بعد از آن با باند طیفی مادون‌قرمز نزدیک (R^2 =۰/۷۴۱) داشت. همبستگی بالایی بین دو باند طیفی قرمز و سبز با باند طیفی مادون قرمز نزدیک وجود داشت. این همبستگی باعث شد اثر این دو باند طیفی در کنار باند طیفی مادون قرمز نزدیک، در مدل‌سازی شاخص سطح برگ معنادار نشود. در نتیجه مدلسازی شاخص سطح برگ تنها با دو پارامتر درصد پوشش گیاهی و باند طیفی مادون قرمز نزدیک، انجام شد. ضریب تعیین تعدیل شده در مدل ۰/۹۶۶ به‌دست آمد که نشان داد ۹۶/۶ ٪ از تغییرات شاخص سطح برگ در سطح مزرعه، توسط دو متغیر درصد پوشش گیاهی و باند طیفی مادون‌قرمز نزدیک وارد شده به مدل تبیین می‌شود (Gooyandeh *et al*., 2018). ملاحظه می‌شود که روش‌های مختلفی با دقت و هزینه‌های متفاوت برای اندازه‌گیری سطح برگ در منابع وجود دارد. در این مقاله الگوریتم پردازش تصویر به‌عنوان یک روش ارزان و غیرمخرب برای اندازه‌گیری سطح برگ پیشنهاد شده است.

مواد و روش‌ها

سخت‌افزار مورد استفاده، یک دوربین گوشی همراه، یک مربع رنگی (قرمز و یا آبی) به مساحت ۲۰ × ۲۰ میلی‌متر مربع، یک کامپیوتر و کاغذ سفید است. برگ بدون آنکه از گیاه جدا شود، جسم مربع (مقیاس) بر روی ورقه کاغذ سفید قرار داده می‌شود و تصویر با استفاده از دوربین دیجیتال (دوربین گوشی همراه) تهیه می‌شود. نرم‌افزار با زبان Delphi نوشته شده است. آزمایشات بر روی۶ نوع برگ (انگور، آلو، گردو، انجیر، ذرت و نعناع) و از هرکدام ۱۰ تکرار، انجام شد. نمونه برگ‌های انتخاب شده در شکل و اندازه متفاوت بودند. شکل ۱ مراحل مربوط به اندازه‌گیری سطح برگ را نشان می‌دهد. تصاویر از برگ‌های گیاهان با استفاده از دوربین تلفن همراه تهیه شدند. تمام تصاویر در فرمت JPEG ذخیره و سپس به فضای باینری تبدیل می‌شوند. در آخر، سطح برگ با استفاده از شمارش پیکسل‌های منطقه‌ی برگ و مقایسه با تعداد پیکسل‌های مقیاس، محاسبه می‌شود.



شکل۱. فلوچارت مساحت‌سنجی برگ با استفاده از پردازش تصویر

تصاویر لازم از برگ‌های گیاهان مختلف، با استفاده از دوربین رنگی گوشی تلفن همراه با قابلیت تفکیک ۸ مگاپیکسل تهیه و توسط نرم افزار CamScanner موجود بر روی گوشی تلفن همراه ذخیره می‌شود. برگ‌ها از گیاهان موجود در فضای سبز موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی انتخاب شدند. برخی از برگ‌های نمونه در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای تهیه‌ی تصویر، برگ گیاه روی کاغذ سفید با یک مربع رنگی ۲x۲ سانتی‌متر مربع قرار داده شد که در شکل ۲ نشان داده شده است. همه تصاویر در قالب JPEG ذخیره می‌شوند. برای تهیه تصاویر هیچ آسیبی به گیاه وارد نمی‌شود.

شکل۲: روش تهیه تصاویر با دوربین تلفن همراه

پس از فراخوانی تصاویر به نرم‌افزار پیشنهادی، با انتخاب یک رنگ خاص (توسط اشاره‌گر موس)، شماره کد RGB رنگ مورد نظر استخراج می‌گردد و رنگ‌های مشابه رنگ مورد نظر در سراسر تصویر انتخاب و تعداد پیکسل‌های آنها شمارش می‌شود. همانگونه که در تمام تصاویر مرسوم است، انتخاب یک رنگ ویژه به درستی بیان کننده‌ی کل آن رنگ در سراسر تصویر نیست و نیاز است که طیف رنگ مفروض مورد توجه قرار گیرد (Mirtavoosi, 2012). این کار با روش زیر در این پروژه مورد توجه قرار گرفته است:

برای بیان طیف رنگ قرمز که با عبارت (R.G.B) تعیین شده است، از عبارت (R±α.G . B) استفاده می شود.
برای بیان طیف رنگ سبز که با عبارت (R.G.B) تعیین شده است، از عبارت (R.G±α . B) استفاده می شود.
برای بیان طیف رنگ آبی که با عبارت (R.G.B) تعیین شده است، از عبارت (R.G . B±α) استفاده می شود.

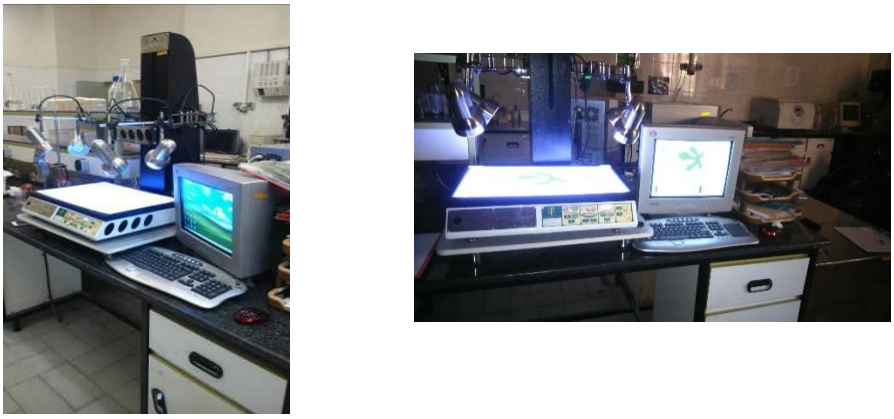
به منظور تعیین میزان دقت در انتخاب رنگ طیف، ممکن است بازه انتخابی α را بزرگتر و یا کوچکتر انتخاب نمود؛ به بیان دیگر هرچه میزان α را بزرگتر انتخاب کنیم، دامنه وسیعتری از طیف مورد نظر را در بر خواهد گرفت.

ابتدا تعداد پیکسل‌های منطقه برگ و همچنین منطقه شیء شناخته شده (مقیاس) محاسبه می‌شود. در این مقاله شیء مقیاس یک مربع رنگی ۲۰ میلی‌متر در ۲۰ میلی‌متر است. بنابراین، مساحت واقعی جسم مربع $۴۰۰mm^2$ است. اکنون سطح برگ با استفاده از رابطه (۳) محاسبه می‌شود.

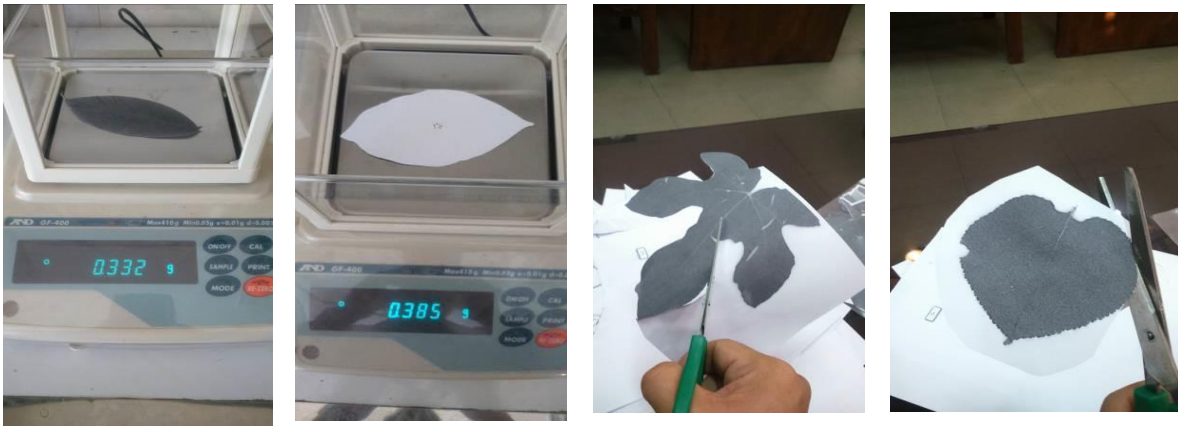
$$A_l = \frac{p_l}{p_s} \times A_s \qquad (۳)$$

که در آن، As مساحت مربع است (که ۴۰۰ میلی‌متر مربع می‌باشد)، Ps با شمارش تعداد پیکسل‌ها در جسم مربع و Pl توسط شمارش تعداد پیکسل‌ها در منطقه برگ حاصل می‌شود. Al بیان کننده سطح برگ می‌باشد.

اندازه‌گیری‌ها بر روی برگ‌های گیاهان با شکل‌های مختلف انجام شد. مساحت برگها با استفاده از الگوریتم پیشنهادی (تصویربرداری با دوربین تلفن همراه و مساحت‌سنجی با نرم‌افزار تدوین شده) محاسبه شد و نتایج با تصویربرداری با دستگاه تخصصی مساحت‌سنجی WinArea-UT-10 مطابق شکل ۳، تصویربرداری با پویشگر رومیزی مسطح مدل CanoScan LiDE 220 و تصویربرداری با دستگاه زیراکس پیش رفته مطابق شکل ۴ مقایسه شد.

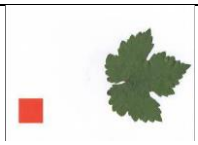


شکل۳. مساحت سنجی با دستگاه WinArea-UT-10



شکل۴. برش تصویر برگ‌ها روی کاغذ و توزین آن‌ها

جدول ۱: معرفی گیاهان نمونه برداری شده

ردیف	گیاه انتخابی	نمونه تصویر برگ	تعداد نمونه
۱	انگور		۱۰
۲	آلو		۱۰
۳	گردو		۱۰
۴	انجیر		۱۰
۵	ذرت		۱۰
۶	نعناع		۱۰

نتایج و بحث

مطابق جدول ۲، روش‌های مختلف اندازه‌گیری سطح برگ شامل ۱) اندازه‌گیری مساحت برگ با استفاده از دستگاه تخصصی مساحت‌سنجی WinArea در آزمایشگاه، ۲) توزین وزن کاغذ بریده شده با مقیاس یک به یک برگ و مقایسه با وزن مساحت مشخص سطح کاغذ ۳) تصویربرداری از برگ با پویشگر رومیزی و استفاده از نرم افزار توسعه داده شده ۴) استفاده از دوربین تلفن همراه و ارسال تصویر به نرم افزار توسعه داده شده، در سطح اطمینان ۹۹٪ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند. این بدان معنی است که با توجه به سرعت زیاد، اندک بودن هزینه و همچنین دقت قابل قبول، استفاده از تصویربرداری با دوربین گوشی تلفن همراه و مساحت سنجی با نرم افزار تدوین شده، قابل توصیه می باشد.

جدول ۲: جدول همبستگی روش‌های مختلف مساحت سنجی

		دستگاه تخصصی مساحت سنجی (mm^2)	فتوکپی تصویر بر کاغذ (mm^2)	دوربین گوشی همراه (mm^2)	پویشگر رومیزی مسطح (mm^2)
دستگاه تخصصی مساحت سنجی (mm^2)	ضریب پیرسون	۱	۱/۰۰۰**	۰/۷۹۵**	۱/۰۰۰**
	Sig. (2-tailed)		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	تعداد نمونه	۶۴	۵۶	۶۴	۶۴
فتوکپی تصویر بر کاغذ (mm^2)	ضریب پیرسون	۱/۰۰۰**	۱	۰/۷۸۷**	۱/۰۰۰**
	Sig. (2-tailed)	۰/۰۰۰		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	تعداد نمونه	۵۶	۵۶	۵۶	۵۶
دوربین گوشی همراه (روش پیشنهادی) (mm^2)	ضریب پیرسون	۰/۷۹۵**	۰/۷۸۷**	۱	۰/۷۹۹**
	Sig. (2-tailed)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		۰/۰۰۰
	تعداد نمونه	۶۴	۵۶	۶۴	۶۴
پویشگر رومیزی مسطح (mm^2)	ضریب پیرسون	۱/۰۰۰**	۱/۰۰۰**	۰/۷۹۹**	۱
	Sig. (2-tailed)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	
	تعداد نمونه	۶۴	۵۶	۶۴	۶۴

** معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹٪

برای واسنجی مساحت اندازه‌گیری شده توسط یک ابزار و مقایسه با ابزارهای دیگر می توان از روابط جدول (۳) استفاده نمود. همانگونه که مشخص است، ضریب تبیین R^2 در تمام روابط بیش از ۹۹ درصد است و تمام روابط از درجه اول هستند. چنانچه روش اندازه گیری با دستگاه تخصصی WinArea به عنوان ملاک سنجش (X) قرار گیرد (دقیق‌ترین روش اندازه‌گیری)، مقایسه سایر روش‌ها (Y) با آن از روابط برابری جدول (۳) به دست می‌آیند. در تمام روابط مقدار به دست آمده X تقریباً برابر با Y می‌باشد و عرض از مبدا به آن اضافه می‌گردد. مقدار عرض از مبدا در مقایسه‌ی دستگاه اندازه‌گیری تخصصی WinArea با دوربین تلفن همراه و استفاده از نرم‌افزار تدوین شده، معادل ۱۴۶/۴۱ می‌باشد. این موضوع بدین معنی است که چنانچه مساحت هر برگ را با تصویربرداری با استفاده از گوشی تلفن همراه تهیه و در نرم‌افزار تدوین شده بارگذاری و مساحت‌سنجی کنیم، در مقایسه با دستگاه تخصصی، لازم است عدد ۱۴۶/۴۱ میلی‌متر مربع به آن افزوده گردد. نکته جالب توجه، نزدیک بودن مساحت به‌دست آمده در روش تهیه تصویر با دوربین تلفن همراه و تهیه تصویر با استفاده از دستگاه پویشگر رومیزی است که عرض از مبدا آن ۵۳/۰۹۶ میلی‌متر مربع می‌باشد.

جدول۳: روابط واسنجی ابزارهای مختلف با یکدیگر

دستگاه شاخص	دستگاه اندازه‌گیری	رابطه برابری	R^2
دستگاه تخصصیWinArea	زیراکس و توزین	Y= ۱/۰۰۹۲X+۱۴۱/۰۶	۰/۹۹۸۸
دستگاه تخصصیWinArea	دوربین تلفن همراه (روش پیشنهادی)	Y=۱/۰۵۰۲X+ ۱۴۶/۴۱	۰/۹۹۴۲
دستگاه تخصصیWinArea	پویشگر مسطح رومیزی	Y=۱/۰۱۲۱ X + ۱۶۱/۸	۰/۹۹۹
دوربین تلفن همراه (روش پیشنهادی)	پویشگر مسطح رومیزی	Y= ۰/۹۵۸۵ X+ ۵۳/۰۹۶	۰/۹۹۴

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که در استفاده از تصویربرداری با دوربین تلفن همراه و مساحت‌سنجی با نرم‌افزار تدوین شده در مقایسه با ابزارها و روش‌های مختلف اندازه‌گیری مساحت برگ (پویشگر ثابت، ترسیم بر کاغذ و استفاده از ابزار مساحت سنجی مرسوم) در سطح اطمینان ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، لذا توصیه می‌شود با استفاده از نرم‌افزار CamScanner گوشی همراه تصویربرداری از برگ صورت پذیرد و پس از انتقال تصاویر به نرم‌افزار پیشنهادی، مساحت‌سنجی انجام گیرد. استفاده از روش مزبور نه تنها بسیار ساده است، بلکه ارزان قیمت است و تقریباً هیچ ابزار اضافی (بجز رایانه و گوشی همراه) نیاز ندارد و از سرعت بالایی نیز برخوردار است.

منابع

Caldas, L.S., Bravo, C., Piccolo, H., Rachel, C., Faria, S.M., (1992). Measurement of leaf area with a hand-scanner linked to a microcomputer. R. Bras. Fisiol. 4(1): pp. 17-20.

Chaohui, L., Ren, H., Zhang, Y., Shen, Y. (2010). Leaf area measurement based on image processing. IEEE International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation. pp. 580-582.

Confalonieri, R. ,Francone, C. & ,Foi, M .(2014). *The pocket LAI smartphone app: an alternative method for leaf area index estimation* .International Environmental Modelling and Software Society (iEMSs) 7_{th} Intl. Congress on Env. Modelling and Software (pp. 1-6) .San Diego, CA, USA: Retrieved from http://www.iemss.org/society/index.php/iemss-2014-proceedings.

Feng, T., Chun, W., (2010). Calculating the leaf-area based on non-loss correction algorithm. International Conference of Information Science and Management Engineering, IEEE, pp.75-78.

Gooyandeh, M., Mirlatifi, S.M., Akbari, M., (2018). Estimating Leaf Area Index of a Corn Silage Field Using a Modified Commercial Digital Camera. Iranian Journal of Irrigation and Drainage, 6(12), pp. 1396-1406. (In Persian)

Hajjdiab, H., Obaid, A., (2010). A vision-based approach for nondestructive leaf area estimation. 2_{nd} Conference on Environmental Science and Information Application Technology, IEEE, pp.53-56.

Kamali. H.R, Zand Parsa, S., Zare, M., (2015). Estimation of canopy cover, leaf area index and leaf nitrogen content in sugar beet using digital photography. Sugar beet,32(2), pp.123-133. (In Persian)

Kaur, G., Din, S., Singh Brar, A., (2014). Scanner Image Analysis to Estimate Leaf Area. International Journal of Computer Applications, 107(3)

Mirtavoosi, S. A. (2012). Digital Image Processing. Niaze Danesh Publication.640 pp. (In Persian)

Montgomery, EG., (1911). Correlation studies in corn. Nebraska. Agr Exp Sta Annu Rep 24, pp.108–159.

Movahedian, M., Hosseini, S. A., Ghorbanzadeh, M., (2007). Estimation of leaf area using neural networks. Third Conference on Information and Knowledge Technology (pp. 1-6). Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)

Ross, J., Ross, V., (1995). Photometrical characteristics of the willow plantation at Toravere. joint Swedish–Estonian Seminar, 24–26 September 1995. Swedish Univ. Agric. Sci. Uppsala, report 57, pp. 133–145.

Sanjay, B.P., Shrikant, D., Bodhe, K., (2011a). Betel leaf area measurement using image processing. International Journal on Computer Science and Engineering (IJCSE), 3: pp. 2656-2660.

Sanjay, B.P, Shrikant, D., Bodhe, K., (2011b). Leaf disease severity measurement using image processing. International Journal of Engineering and Technology.3: pp. 297-301.

Sezer, I., Fathi, O., Mut.Z., (2009). Non-destructive leaf area measurement in maize .Journal of Environmental Biology 5(30): pp. 785-790.

William, W.H., Crossly, D.A., (1988). Video digitizer for the rapid measurement of leaf area lost to herbivorous insects. Annals of the Entomological Society of America

Development of software of measuring the surface area of the leaves and comparing it with conventional methods

H. Sharifnasab[1*], F. Abbasi[2]

Received:2020.11.17
Accepted:2021.2.2

Abstract

The leaf area plays an important role in growth and Photosynthetic analysis. Traditionally, leaf area is measured by using the regression equation, network counting method, weighing and planimeter methods. In this paper, a simple, fast and accurate algorithm is implemented to measure the leaf area by using image processing. The images are obtained from the mobile camera and stored in JPEG format. Then it is converted into Bitmap format in the software. The converted color image is subdivided by using the threshold method. Image noise is removed in the area of the leaf and scale through using the region color picker technique. The number of pixels in the square object (scale) and the leaf area are calculated and the leaf area is determined by counting the number of pixels and according to the scale. In this research, six different leafy, clawed and pulled leaves (grapes, plums, walnuts, figs, corn and peppermint) were used and from each plant, the area of 10 leaves were measured. Using the proposed algorithm at 99% confidence level, had no significant differences with other measurement methods (constant scanner, drawing on paper and using conventional area measurements).

Keywords: *Camera, Mobile phone, Non-destructive, Scanner*

1- Assistant Professor of Agricultural Engineering Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization
*(Corresponding author: hsharifnasab@yahoo.com)
2- Professor of Agricultural Engineering Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 95-111
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۹۵-۱۱۱
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.31100.1366

ارزیابی محتوای کاروتنوئید تام و زیست‌توده‌ی میکروبی تولیدشده توسط *Deinococcus radiodurans R1* در پاسخ به منابع نیتروژنی و کربنی مختلف

عاطفه صالحی بختیاری[۱]، زهرا اعتمادی فر*[۱]، ماتیا سادات برهانی[۲]

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر، اثر منابع کربنی و نیتروژنی مختلف بر زیست‌توده و رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی Deinococcus radiodurans به‌عنوان یکی از مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها به اشعه، با استفاده از رهیافت یک فاکتور در یک‌زمان موردبررسی قرار گرفت. همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و فعالیت ضدمیکروبی رنگیزه نیز بررسی شدند. رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی دارای نصف حداکثر غلظت مؤثر (EC_{50}= Half-maximal effective concentration) برابر با ۲۰/۱۹ µg/mL و ۳/۲۸mg/mL به ترتیب در تست‌های قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن فریک و به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد بود. بر اساس رهیافت یک فاکتور در یک زمان، شرایط بهینه‌ی تولید کاروتنوئید به میزان ۳۷mg/L رنگیزه در محیط کشت حاوی منبع کربنی ۱ g/L گلوکز و منبع نیتروژنی۱g/L عصاره‌ی مخمر به‌دست آمد. همچنین این رنگیزه اثر سمی یا مهاری بر روی سلول‌های فیبروبلاستی انسان و بر روی دو باکتری Staphylococcus epidermidis و Escherichia coli نداشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بهینه‌سازی، رنگیزه، رادیوفیل

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
*(نویسنده مسئول: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir; zetemadifar@gmail.com)
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان، ایران

۱- این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوئی خانم عاطفه صالحی بختیاری به راهنمایی دکتر زهرا اعتمادی فر و همکاری خانم ماتیا سادات برهانی در دانشگاه اصفهان صورت گرفته است.

مقدمه

کاروتنوئیدها، رنگیزه‌های آلی ایزوپرنوئیدی به رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز می‌باشند. کاروتنوئیدها، از طریق شیمیایی و یا به‌صورت طبیعی توسط موجودات مختلف ازجمله باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. در سال‌های اخیر، کاروتنوئیدهای طبیعی به دلیل این‌که برخلاف کاروتنوئیدهای شیمیایی، اثرات جانبی بر سلامتی انسان ندارند و منجر به آلودگی‌های زیست‌محیطی نمی‌شوند، بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند. از کاروتنوئیدها در صنایع گوناگون مانند صنایع غذایی، غذای دام، داروئی، آرایشی و پزشکی استفاده می‌شود (Delgado-Vargas *et al*., 2000). بازار جهانی کاروتنوئیدها در حدود یک میلیارد دلار در سال ۲۰۱۰ بوده است و در حال حاضر نیز روند افزایشی قابل‌توجهی داشته است (Sandmann, 2014). بیش از ۱۱۰۰ نوع کاروتنوئید مختلف تاکنون گزارش‌شده است؛ هرچند، جستجو برای یافتن سویه‌های میکروبی با تولید بیشتر کاروتنوئید و یا تولید کاروتنوئیدهای منحصربه‌فرد ادامه دارد (Oliver & Palou, 2000).

میکروارگانیسم‌های اکسترموفیل مقاوم به اشعه، متابولیت‌های اولیه و ثانویه‌ی جالبی ازجمله کاروتنوئیدها را برای مقابله با پرتوها تولید می‌کنند؛ بنابراین، محتمل‌تر است که نسبت به سویه‌های میکروبی دیگر، کاروتنوئیدهای بیشتر و منحصربه‌فردی تولید کنند (Gabani& Singh, 2013). باکتری *Deinococcus radiodurans* یک میکروارگانیسم پلی‌اکسترموفیل و یکی از مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر اشعه‌های یونیزان و غیریونیزان است. این باکتری می‌تواند چیزی حدود ۵۰۰۰ گری (Grey) از پرتوهای یونیزان را بدون از دست دادن توانایی زنده ماندن تحمل کند (Ito *et al*., 1983). همچنین، باکتری*Deinococcus radiodurans R1* تولیدکننده‌ی رنگیزه‌ی قرمزرنگی به نام Deinoxanthin (داینوگزانتین) است. داینوگزانتین دارای ساختمان شیمیایی (۱ و ۲-دی هیدروکسی -۳ و ۴-دی هیدرو -۱ و ۲-دی هیدرو-βوψ-کاروتن) می‌باشد. بر اساس تحقیقات، نشان داده شده است که سویه‌های جهش‌یافته این باکتری، فاقد این رنگیزه و نسبت به اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های آزاد حساس هستند. این ویژگی نشان‌دهنده نقش مؤثر کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans* در مقاومت نسبت به تنش اکسیداتیو و حفاظت از DNA در مقابل آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (Tian *et al*., 2009).

علاوه بر انتخاب مناسب سویه‌ی میکروبی مولد کاروتنوئید، بهینه سازی شرایط کشت مانند منابع کربنی، نیتروژنی، pH محیط کشت، دمای انکوباسیون، سرعت همزنی محیط کشت، میزان مایه تلقیح اولیه و ... در تولید کاروتنوئیدها بسیار حائز اهمیت است (Cabral *et al*. 2011; Kirti *et al*. 2014). از آن‌جائی که تولید متابولیت‌های ثانویه توسط هر سویه میکروبی وابستگی زیادی به نوع سویه و همچنین نیازمندی‌های غذایی خاص آن و نوع محیط کشت دارد، بنابراین ضرورت دارد که برای هر سویه میکروبی شرایط بهینه‌ی تولید یک محصول مورد بررسی قرار گیرد (Rajeswari *et al*. 2015).

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات شرایط مختلف کشت ازجمله منابع کربنی و نیتروژنی در تولید زیست‌توده و کاروتنوئید توسط باکتری *Deinococcus radiodurans R1* بوده است. به‌علاوه فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و سمیت سلولی کاروتنوئید تولیدی توسط این سویه نیز موردبررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم، شرایط کشت، و تهیه مایه تلقیح

سویه‌ی موردبررسی در مطالعه‌ی حاضر به نام *Deinococcus radiodurans R1* با شماره‌ی دسترسی ATCC 13939 و IBRC-M10806 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده است. کشت خالص این باکتری، در محیط کشت تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر آگار (pH۷/۲)، حاوی ۵ گرم بر لیتر تریپتون، ۱ گرم بر لیتر گلوکز، ۵ گرم بر لیتر عصاره‌ی مخمر و ۱۵ گرم بر لیتر آگار با استفاده از کشت خطی به‌دست آمد (Basha *et al*., 2009). سپس برای تهیه مایه تلقیح یک لوپ پر از باکتری در ۵mL محیط کشت مایع تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر تلقیح و در دمای ۳۰C° گرمخانه گذاری شد تا کدورت محیط کشت معادل نیم مک فارلند یعنی CFU/mL $۱-۲ \times ۱۰^{۸}$ گردد. از این محیط برای تلقیح محیط‌های مختلف تولید کاروتنوئید، به میزان ۱ v/v درصد استفاده گردید.

بهینه‌سازی تولید کاروتنوئید

در مطالعه‌ی حاضر، منابع کربنی مانند گلوکز، سوکروز، مالتوز، نشاسته، زایلوز، سوربیتول و رافینوزو منابع نیتروژنی آلی و معدنی مانند عصاره‌ی مخمر، تریپتون، پپتون، کازئین، سولفات آمونیوم، نیترات کلسیم، نیترات پتاسیم و نیترات آمونیوم موردبررسی قرار گرفتند. محیط کشت بررسی اثر منابع کربنی بر تولید زیست‌توده و کاروتنوئید سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1*، یک محیط کشت مایع پایه حاوی ۱g/L عصاره مخمر، ۰/۱g/L پتاسیم دی فسفات (KH_2PO_4) و۱g/L از هر منبع کربنی است. همچنین، محیط کشت بررسی منابع نیتروژنی شامل ۱g/L گلوکز، ۰/۱g/L پتاسیم دی فسفات (KH_2PO_4) و ۱g/L از هر منبع نیتروژنی است. به علاوه، زیست‌توده و تولید کاروتنوئید سویه موردمطالعه در یک محیط کشت مقرون‌به‌صرفه یعنی محیط کشت آب‌پنیر (شرکت پگاه) در غلظت‌های ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم بر لیتر نیز موردبررسی قرار گرفت. سترون کردن و پروتئین‌زدایی این محیط کشت در سه مرحله‌ی زیر انجام گرفت. ابتدا یک تیمار حرارتی به‌منظور پروتئین زدایی این محیط کشت در دمای ۱۱۰ C° به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو انجام شد. سپس با استفاده از کاغذ فیلتر شماره‌ی ۴۰ واتمن و همچنین با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، رسوبات پروتئینی از مابقی محیط کشت جدا شدند؛ سپس محیط کشت حاصل، در دمای ۱۱۰ C° به مدت ۱۵ دقیقه دوباره اتوکلاو شد. سپس محیط های کشت آب پنیر مختلف، به میزان ۱ v/v درصد با

باکتری آماده شده (در بخش ۲-۱) تلقیح شد. در نهایت، تولید کاروتنوئید و میزان زیست‌توده‌ی میکروبی، پس از گذشت ۵ روز در انکوباتور ۳۰C° و با سرعت همزنی ۱۲۰rpm موردبررسی قرار گرفت (Khodaiyanet al., 2008).

استخراج کاروتنوئید

حلال‌های مختلف، شامل استون، متانول، کلروفورم، اتانول و N-هگزان برای جداسازی رنگیزه‌ی کاروتنوئید سویه موردمطالعه استفاده شدند. بدین منظور *Deinococcus radiodurans R1* در محیط کشت مایع تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر تلقیح و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ C° و سرعت همزنی ۱۲۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد. سپس رسوب باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. به رسوب باکتریایی به‌دست‌آمده حلال اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس و سپس در۱۰C° به مدت ۴۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس مخلوط حلال و رسوب باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جمع‌آوری گردید و به باقی‌مانده رسوب باکتریایی دوباره حلال اضافه شد. مراحل ذکرشده بعد از افزودن حلال دوباره تکرار گردید تا زمانی که رسوب باکتریایی بی‌رنگ شود. سپس مایع رویی (Supernatants) در۴۰C° خشک و در یخچال۴°C ذخیره‌سازی شد تا مورد سنجش قرار گیرد (Zamanian& Etemadifar, 2017). طیف جذبی عصاره کاروتنوئیدی به‌دست‌آمده توسط اسپکتروفوتومتر UV/Vis (Biochrom WPA BiowaveII, ZEISS Specord, Germany) در طول‌موج محدوده ۶۰۰nm-۳۰۰ به‌دست آمد تا تأیید شود با استفاده از کدام حلال بالاترین بازده کاروتنوئید بدون تغییر در ساختار اصلی به‌دست‌آمده است. به‌علاوه کروماتوگرافی لایه‌نازک (silica gel GF254 plate; Merck, Germany) نیز با استفاده از نسبت حلال ۲:۸ اتیل استات و N-هگزان انجام شد تا فرآیند استخراج کاروتنوئید تأیید گردد (Squillaci et al., 2017).

اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و زیست‌توده‌ی میکروبی

به‌منظور تعیین زیست‌توده‌ی میکروبی در محیط کشت آب‌پنیر، ۱۰۰ml از محیط کشت مربوطه، به میزان ۱ v/v درصد کشت باکتری آماده شده (در بخش ۱-۲) تلقیح شد و همچنین ۱۰۰ml از محیط کشت کنترل که حاوی تمام ترکیبات محیط کشت فوق اما بدون تلقیح باکتری است، به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل از هر دو محیط کشت در دمای ۷۰C° به مدت ۷۲ ساعت خشک گردید. سپس رسوبات حاصله وزن شدند. زیست‌توده‌ی میکروبی از تفاضل وزن رسوب حاصل از محیط کشت حاوی سویه‌ی باکتریایی و وزن رسوب حاصل از محیط کشت کنترل به دست آمد.

میزان کاروتنوئید تولیدشده در محیط‌های کشت مختلف ازنظر منابع کربنی و نیتروژنی، با استفاده از ۱۰ml محیط کشت تلقیح شده و بر اساس معادله شماره ۱ به دست آمد (NasriNasrabadi&Razavi, 2010).

$$Total\ cartonoides\ \left(\frac{\mu g}{L}\right) = \frac{(A_{474}) \times (V_S) \times (10^9)}{(A^{\%1}_{1\,cm}) \times (100)} \qquad (1)$$

در معادله شماره ۱، $A_{474}Vs$، و $A^{1\%}_{1\,cm}$ به‌ترتیب برابر با حداکثر جذب کاروتنوئید تام در اتانول در طول‌موج ۴۷۴nm، حجم نمونه و ضریب جذب ویژه‌ی کاروتنوئید تام در محلول ۱ درصد آن در اتانول و در یک کووت یک سانتی‌متری (برابر با ۲۲۰۰) می‌باشد.

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی سویه‌ی موردمطالعه، با استفاده از تست‌های به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن بر طبق روش کار منابع ذکرشده با اندکی تغییرات بررسی شد (Benzie & Szeto,1999; Sharma & Bhat, 2009).

به‌منظور انجام تست به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، از رادیکال‌های ترکیبی به نام ۲و ۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH=diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals-2 ,2) استفاده شد. DPPH یک رادیکال آزاد لیپوفیل است که حداکثر جذب آن در ۵۱۷ nm است. این تست بر این اصل استوار است که محلول متانولی DPPH که به رنگ بنفش است، با استفاده از توانایی الکترون دهندگی و یا آنتی‌اکسیدانی رنگیزه‌ی مورد آزمایش، به زرد تغییر می‌کند و بنابراین حداکثر جذب آن در ۵۱۷ nm به‌صورت خطی کاهش می‌یابد. به‌منظور انجام تست به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، غلظت‌های مختلف رنگیزه استخراج‌شده (۰/۰۵-۱۰ mg⁄ml) در۱mL آب دوبار تقطیر حل و سپس به آن‌ها ۱ml از محلول متانولی DPPH در غلظت ۰/۱mM اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت و درنهایت جذب محلول در ۵۱۷nm اندازه‌گیری شد (Ferreira et al., 2007).

روش احیای آهن، روشی سریع و مناسب برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی ترکیبات است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورداستفاده قرار گیرد. توانایی رنگیزه‌ها برای احیای آهن سه‌ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی در این تست سنجیده می‌شود. عوامل احیا کننده (آنتی‌اکسیدان)، منجر به احیای کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس (Fe^{2+}) می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاکنندگی رنگیزه‌های مورد بررسی، با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های آبی همراه است. به‌منظور بررسی قدرت احیاکنندگی به میزان ۰/۵-۱۰ µg⁄ml رنگیزه به ۱ml آب دو بار تقطیر افزوده شد و همراه ۲/۵ml بافر سدیم فسفات ۲۰۰ mM(pH۶/۶) و ۲/۵ml پتاسیم فری سیانید ۱ درصد و به مدت ۲۰ دقیقه در۵۰C° گرم‌خانه گذاری شدند. بعد از گذشت زمان گرم‌خانه گذاری، ۲/۵ml تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۵ ml از محلول رویی به یک فالکون تازه منتقل و با ۵ ml آب دو بار تقطیر استریل و ۱ ml کلرید فریک ۰/۱ درصد مخلوط شد و بلافاصله جذب آن در

nm ۷۰۰ قرائت شد. افزایش جذب نسبت به محلول شاهد، نشان‌دهنده‌ی قدرت احیاکنندگی رنگیزه است. هرچه میزان جذب خوانده شد بیشتر باشد، قدرت احیاکنندگی نیز بیشتر خواهد بود (Tsai et al., 2006).

در هر دو تست، آسکوربیک اسید به‌عنوان نمونه کنترل مورداستفاده قرار گرفت. همچنین در هر دو تست، غلظتی از رنگیزه که توانائی مهار رادیکالی و یا احیای یون آهن به میزان ۵۰ درصد را دارا بود، توسط نموداری که محور افقی آن شامل غلظت‌های مختلف رنگیزه‌ی موردبررسی و محور عمودی آن بیانگر میزان مهار رادیکالی و یا احیای یون آهن بود، محاسبه گردید و به‌عنوان EC_{50} (Half-maximaleffective concentration) بررسی شد. بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه بیشتر است (Sasidharan et al., 2013; Tsai et al. 2006).

بررسی خاصیت ضد میکروبی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی

در این مطالعه از *Staphylococcus epidermidis PTCC 1114* و *Escherichia coli ATTCC 25922* برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی از روش انتشار در چاهک استفاده شد. بدین منظور µl ۱۰۰ از محیط کشت مایع که باکتری در آن تلقیح شد و کدورتی معادل نیم مک فارلند داشت (معادل CFU/ml ۱×۱۰^{۸}-۲) بر روی پلیت حاوی مولرهینتون آگار به‌صورت کشت چمنی پخش و سپس چاهک گذاری گردید. سپس µl ۵۰ از رنگیزه‌ی استخراج‌شده درون چاهک اضافه گردید. از متانول به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای °۳۷C گرمخانه‌گذاری شد. درنهایت قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه‌گیری و گزارش شد (Manimala and Murugeston, 2014).

بررسی خاصیت سمیت سلولی رنگیزه کاروتنوئیدی

به‌منظور بررسی خاصیت سمیت سلولی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی، از تستMTT (3--2,5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide) و رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی (HFB) موجود در آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه اصفهان استفاده گردید. در این تست، قابلیت زنده ماندن سلول‌ها در حضور یک ترکیب شیمیایی، با استفاده از توانایی آنزیم‌های میتوکندریایی اکسیدوردوکتاز وابسته به NAD(P)H سلول، در احیای یک رنگ تترازولیوم به نام MTT و تبدیل آن به فرم نامحلول بنفش‌رنگ به نام فورمازان، تخمین زده می‌شود و به‌این‌ترتیب خاصیت سمی ترکیب موردنظر، سنجیده می‌شود. بدین منظور، $۱۰^{۴}$ سلول به همراه µl ۲۰۰ محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای °۳۷C و ۵ درصد CO_2، گرمخانه‌گذاری شد تا سلول‌ها رشد داشته باشند. غلظت‌های مختلف رنگیزه‌ی استخراج‌شده از *Deinococcus*

radiodurans R1 (۵۰۰µg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰)، با استفاده از محیط کشت استریل رقیق‌سازی و برای تیمار سلول‌ها استفاده گردید.

به‌منظور بررسی آماری نتایج برای هر تیمار سه تکرار (چاهک) در نظر گرفته شد. سه چاهک حاوی سلول‌های بدون هرگونه تیمار نیز به‌عنوان کنترل استفاده شدند. پس از گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷C° و ۵ درصد گاز CO_2، محیط کشت چاهک‌ها جدا و به‌جای آن ۱۰۰ µL محلول MTT (با غلظت ۰/۵mg/ml) به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها دوباره درون گرمخانهCO_2دار به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷C° گرمخانه‌گذاری شدند تا کریستال‌های نامحلول فورمازان درون چاهک‌ها تشکیل شود. سپس، چاهک‌ها به‌دقت تخلیه شد و به هر چاهک ۱۵۰ µl DMSO اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازان حل گردد. درنهایت، میزان جذب هر چاهک در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه خواننده میکروپلیت اندازه‌گیری شد. از نسبت میزان جذب سلول‌های تیمار شده به میزان جذب سلول‌های کنترل (تیمار نشده) برای محاسبه‌ی قابلیت زنده ماندن سلول‌ها استفاده شد (Rezaeeyan*et al*., 2017).

آنالیزهای آماری

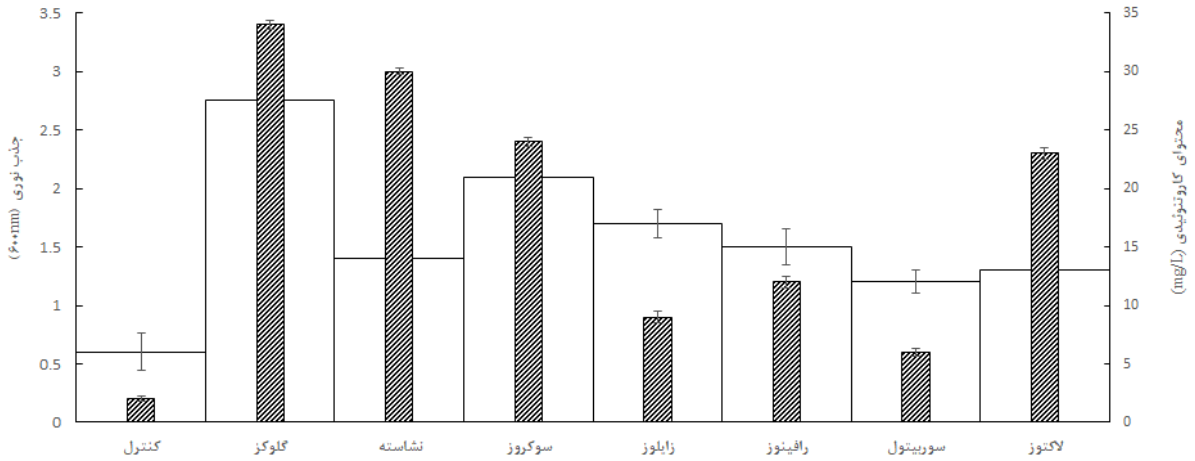
تست آنالیز واریانس و تست دامنه چندگانه دانکن (Duncan multiple range) توسط نرم افزار SPSS با سطح معنادار آماری ۹۵درصد به‌منظور بررسی معنادار بودن تفاوت‌های مشاهده‌شده بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده مورداستفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها به‌منظور بررسی‌های آماری به‌صورت سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

امروزه کاروتنوئیدها به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند. این ترکیبات به دلیل خواص درمانی، ضد سرطانی، ضد انگلی، ضد باکتریائی، ضد آلرژی و همچنین به دلیل رنگ‌زا بودن، دارای اهمیت فراوانی در میان سایر ترکیبات ایزوپرنوئیدی می‌باشند (da Costa Cardoso et al., 2017; Briton and Khachik 2009; Chiste et al., 2014). عوامل مختلفی در تولید کاروتنوئیدها مؤثرند که از بین آن‌ها منابع کربنی و نیتروژنی و به‌طورکلی ترکیب محیط کشت بسیار اهمیت دارد (Shariati *et al*., 2019)؛ بنابراین در این مطالعه، به بررسی بهترین منبع کربنی و نیتروژنی که بتواند تولید کاروتنوئید را در سویه اکسترموفیل مقاوم به اشعه *Deinococcus radiodurans R1* افزایش دهد، پرداخته شده است.

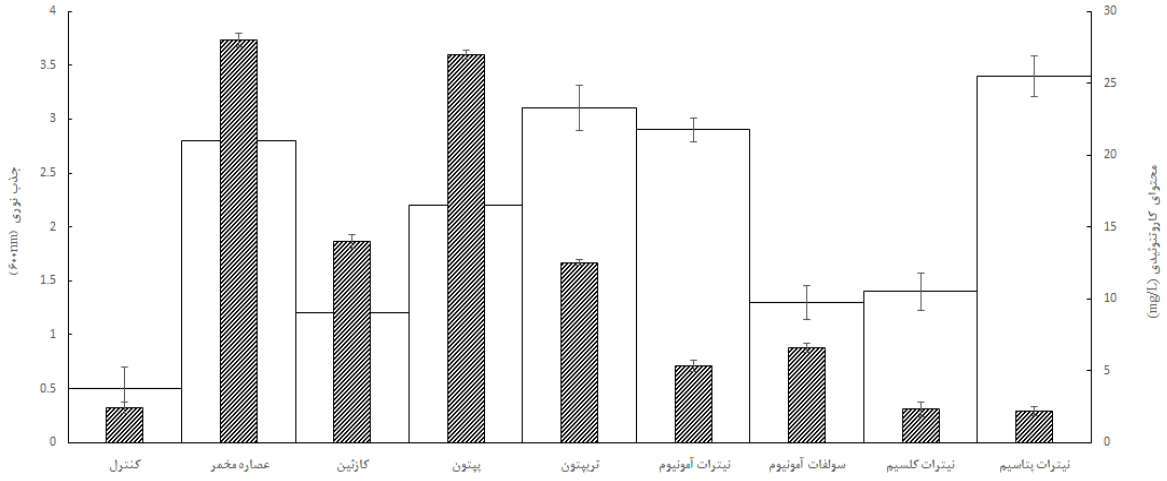
تمامی منابع کربن موردبررسی در این مطالعه، بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* اثر معناداری از نظر آماری داشته‌اند. هرچند در مقایسه با کنترل، اثر گلوکز، سوکروز و گزیلوز بر روی زیست‌توده و همچنین اثرگلوکز، نشاسته و زایلوز بر روی تولید کاروتنوئید این سویه نسبت به بقیه منابع کربنی چشمگیرتر بوده است (شکل ۱).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بااینکه نشاسته نسبت به سوکروز و زایلوز اثر افزایشی کمتری بر روی زیست‌توده‌ی باکتری داشته است، اما بیش از سوکروز و زایلوز منجر به افزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی موردمطالعه شده است. در بین منابع کربنی، سوربیتول کمترین اثر مثبت را بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* داشته است.



شکل ۱: اثر منابع کربنی مختلف بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند.

نتایج بررسی منابع نیتروژن آلی و معدنی بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* در شکل ۲ آورده شده است. تمام منابع نیتروژنی از نظر آماری بر روی زیست‌توده‌ی *Deinococcus radiodurans* اثر معناداری در سطح p-value <0.05 داشته‌اند. بااین‌حال، تولید کاروتنوئید توسط *Deinococcus radiodurans R1* در حضور نیترات پتاسیم و نیترات کلسیم افزایش معنادار آماری نشان نداده است. در مقایسه با کنترل، اثر نیترات پتاسیم، تریپتون، عصاره مخمر و نیترات آمونیوم بر روی زیست‌توده‌ی سویه‌ی موردبررسی و اثر عصاره مخمر و پپتون بر روی تولید کاروتنوئید چشمگیرتر بوده است.



شکل ۲: اثر منابع نیتروژنی مختلف بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مورد نشاسته و نیترات پتاسیم بر سویه‌ی موردبررسی، می‌توان بیان کرد که ارتباط مستقیمی بین میزان تولید زیست‌توده‌ی میکروبی و تولید کاروتنوئید وجود ندارد. هرچند، وجود یک رابطه مستقیم بین میزان زیست‌توده‌ی میکروبی و تولید کاروتنوئید در مطالعات قبلی گزارش‌شده و به نظر منطقی می‌رسد (El-Banna *et al*., 2012).

از میان منابع کربنی و نیتروژنی موردبررسی، به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بیشترین افزایش را در تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* داشتند. حداکثر میزان تولید کاروتنوئید به ترتیب در محیط کشت حاوی گلوکز (۳۴ mg/L)> نشاسته (۳۰ mg/L)>عصاره مخمر (۲۸ mg/L) > و پپتون (۲۷ mg/L) بوده است؛ بنابراین از بین منابع کربنی و نیتروژنی، می‌توان گفت به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بیش از منابع موردبررسی دیگر تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* را افزایش داده‌اند. نتیجه مشابهی در مطالعه Zhao و همکاران (۲۰۰۲) بر روی سویه‌ی مخمری *Rhodotorula* sp. RY1801 مشاهده‌شده است (Zhao *et al*., 2002).

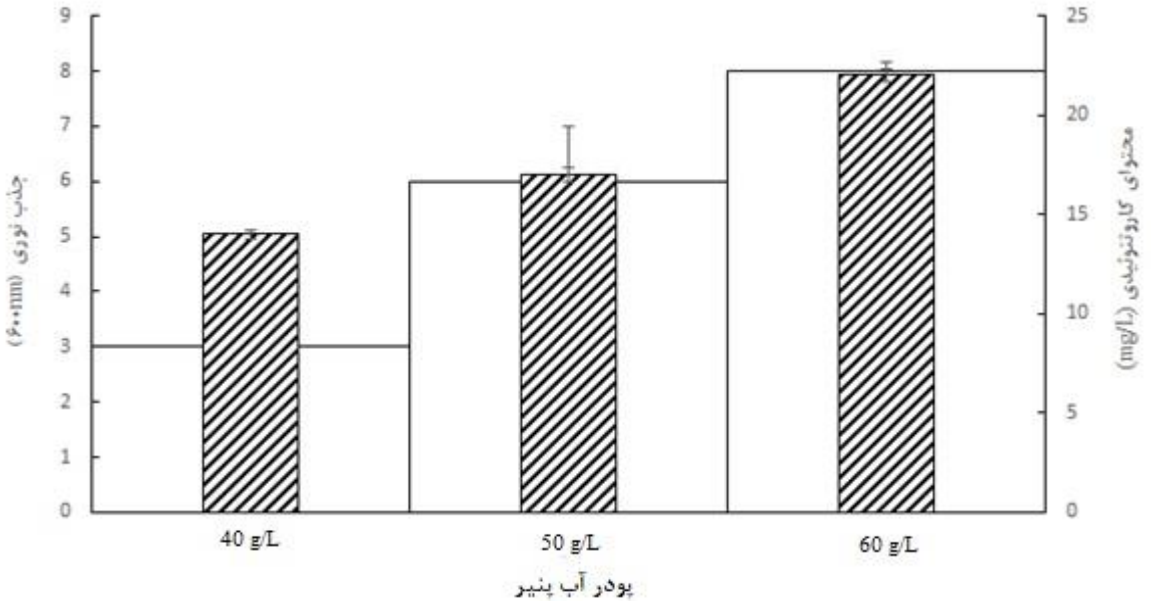
در مجموع می‌توان گفت منابع کربنی و به عبارت بهتر گلوکز بیشتر از منابع نیتروژنی برافزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* اثرگذار بودند. به‌طوری‌که افزودن گلوکز در محیط تخمیر اولیه، تولید کاروتنوئید را تا ۱۷ برابر افزایش داده است. این نتیجه برخلاف نتایج قبلی گزارش‌شده پیرامون مهار کاتابولیتی گلوکز بر سنتز کاروتنوئید است. برای مثال Gmoser و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که تولید کاروتنوئید توسط *Neurospora Intermedia* در حضور گلوکز به‌شدت کاهش می‌یابد (Gmoser *et al*., 2018)؛ اما مطالعات قبلی دیگری نیز بوده‌اند که نشان داده‌اند مهار کاتابولیتی گلوکز بر روی کاروتنوئید سنتز شده توسط سویه‌های میکروبی موردبررسی، وجود نداشته است (Alcaíno*et al*., 2016; Mitra *et al*., 2015).

همچنین از بین منابع نیتروژنی آلی و معدنی، منابع نیتروژنی آلی بیشتر از منابع نیتروژنی معدنی، منجر به افزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی R1 شدند. از طرفی با توجه به شکل ۲ می‌توان دریافت یون‌های مختلف نیترات مانند نیترات آمونیوم، نیترات کلسیم و نیترات پتاسیم اثرهای متفاوتی بر تولید کاروتنوئید و زیست‌توده‌ی سویه میکروبی داشتند. درحالی‌که از میان منابع نیتروژنی معدنی، آمونیوم سولفات بیشتراز بقیه‌ی منابع نیتروژنی معدنی منجر به افزایش تولید کاروتنوئید شده است. نتیجه‌ی مشابهی در مطالعه‌ی El-Banna و همکاران (۲۰۱۲) بر روی سویه‌ی *Rhodotorula glutinis* به‌دست‌آمده است (El-Banna *et al*., 2012)؛ بنابراین همان‌طور که مشاهده می‌شود در دو سویه‌ی *Rhodotorula* sp. RY1801 و *Rhodotorula glutinis* به ترتیب بهترین منبع نیتروژنی مؤثر بر تولید کاروتنوئید عصاره مخمر و آمونیوم سولفات است. از طرفی، هرچند نیترات پتاسیم اثر کمی در افزایش تولید کاروتنوئید سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* داشته است، اما این منبع نیتروژنی بهترین منبع نیتروژنی برای سویه‌های مولد کاروتنوئید از *Micrococcus* بوده است (Mohana *et al*., 2013)؛ بنابراین، می‌توان گفت در مورد هر سویه‌ی میکروبی ممکن است منبع کربنی یا نیتروژنی متفاوتی برای تولید کاروتنوئید مؤثر باشد و نیازمندی هر سویه‌ی میکروبی با وجود اینکه ممکن است ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکی با هم داشته باشند، بسیار متفاوت است.

بررسی تولید کاروتنوئید در محیط کشت حاوی منبع کربنی ۱ g/L گلوکز و منبع نیتروژنی۱g/L عصاره‌ی مخمر نشان داد که تولید کاروتنوئید به میزان ۳۷mg/L رسیده و بنابراین به عنوان محیط کشت بهینه‌ی تولید کاروتنوئید بر اساس رهیافت یک فاکتور در یک زمان در نظر گرفته شد.

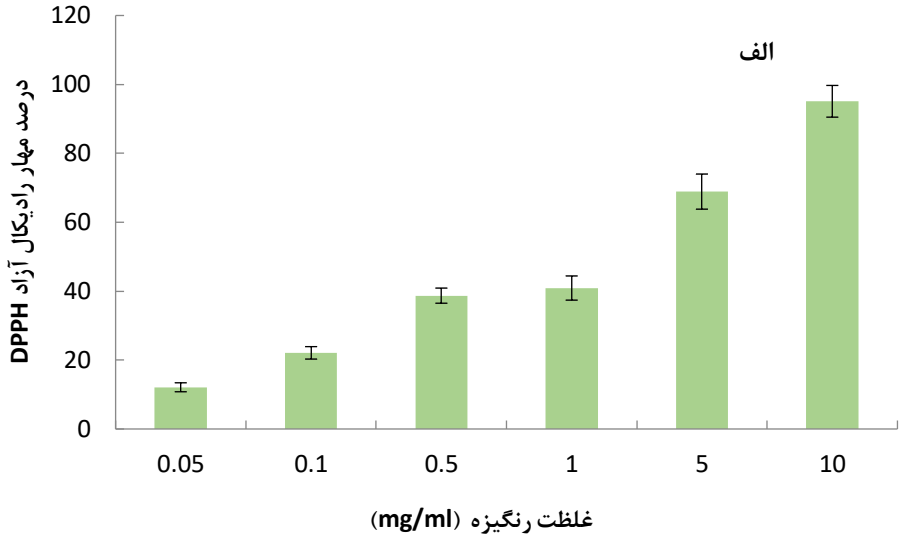
در مطالعه‌ی حاضر از محیط کشت آب‌پنیر نیز به‌عنوان محیط کشت تخمیری اولیه استفاده شده است. علاوه بر مقرون به صرفه بودن، که لازمه‌ی انتخاب محیط کشت برای تولید صنعتی یک محصول صنعتی است، این محیط کشت حاوی مواد مغذی فراوانی به‌منظور تولید زیست‌توده و تولید محصولات تجاری پیچیده می‌باشد. نتایج مربوط به میزان تولید زیست‌توده و کاروتنوئید درمحیط کشت آب‌پنیر در شکل ۳ به نمایش درآمده است. با توجه به این شکل، حداکثر میزان تولید هم از نظر زیست‌توده و هم ازنظر تولید کاروتنوئید در غلظت۶۰g/L محیط کشت پودرآب‌پنیر بوده است. محیط کشت آب‌پنیر، حاوی ۴/۵ درصد لاکتوز و ۰/۸ درصد کازئین می‌باشد (Siso, 1996)؛ بنابراین محیط کشت پودرآب‌پنیرg/L ۶۰ حدود ۲/۷ گرم لاکتوز به‌عنوان منبع کربن و ۰/۴۸ گرم کازئین به‌عنوان منبع نیتروژن در هرml ۱۰۰دارد و تقریباً محیط کشتی غنی از منابع کربنی و نیتروژنی محسوب می‌شود. از طرفی، نتایج این مطالعه نشان داده است که هم لاکتوز و هم کازئین بر افزایش تولید کاروتنوئید اثر مثبتی داشته‌اند (شکل ۱ و ۲) اگرچه میزان کاروتنوئید تولیدی در محیط کشتg/L ۶۰ پودرآب‌پنیر (۲۲ mg/L) کمتر از محیط کشت پایه حاوی گلوکز (۳۴mg/L) بوده است، استفاده از محیط کشت آب‌پنیر به‌منظور تولید مقرون‌به‌صرفه برای تولید صنعتی این کاروتنوئید پیشنهاد می‌گردد. از طرف دیگر، آب‌پنیر یک محصول جانبی در صنایع لبنی است که دورریزی آن

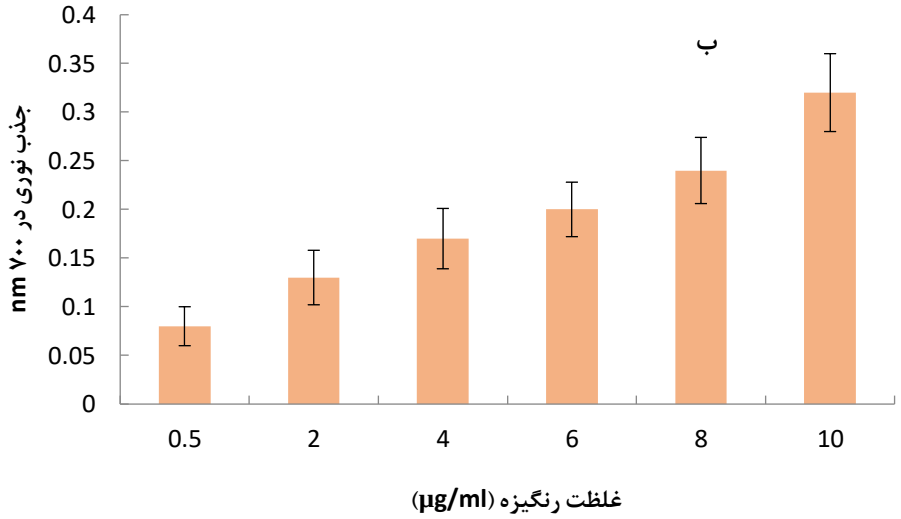
می‌تواند منجر به افزایش آلودگی‌های محیطی به دلیل افزایش مواد آلی در منابع آبی گردد؛ بنابراین استفاده از آب‌پنیر به حفظ محیط‌زیست نیز کمک خواهد کرد (Kanzy *et al*., 2015).



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف محیط کشت آب‌پنیر بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند

در مقایسه با دیگر سویه‌های میکروبی مولد کاروتنوئید که در مطالعات قبلی گزارش‌شده‌اند میزان کاروتنوئید تولیدی توسط سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* در این مطالعه بیشتر بوده است (El-Banna*et al*., 2012; Mohana *et al*., 2013; Zhao *et al*., 2002). علت این امر می‌تواند مربوط به مقاومت این سویه در برابر اشعه‌های یونیزان و غیر یونیزان و اثر حفاظتی رنگیزه در برابر تنش‌های فوق باشد. به علاوه، رنگیزه‌ی تولیدی توسط این باکتری در تست‌های مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز نتایج خوبی را نشان داد (شکل ۴). نتیجه بررسی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی تولیدشده توسط *Deinococcus radiodurans R1*، *درتست* قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن فریک دارای EC_{50} (نصف حداکثر غلظت مؤثر) برابر با ۲۰/۱۹ µg/ml و در تست به دام اندازی رادیکال‌های آزاد برابر با ۳/۲۸mg/ml بوده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئید سویه R1 از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید به‌عنوان شاهد بیشتر بود.



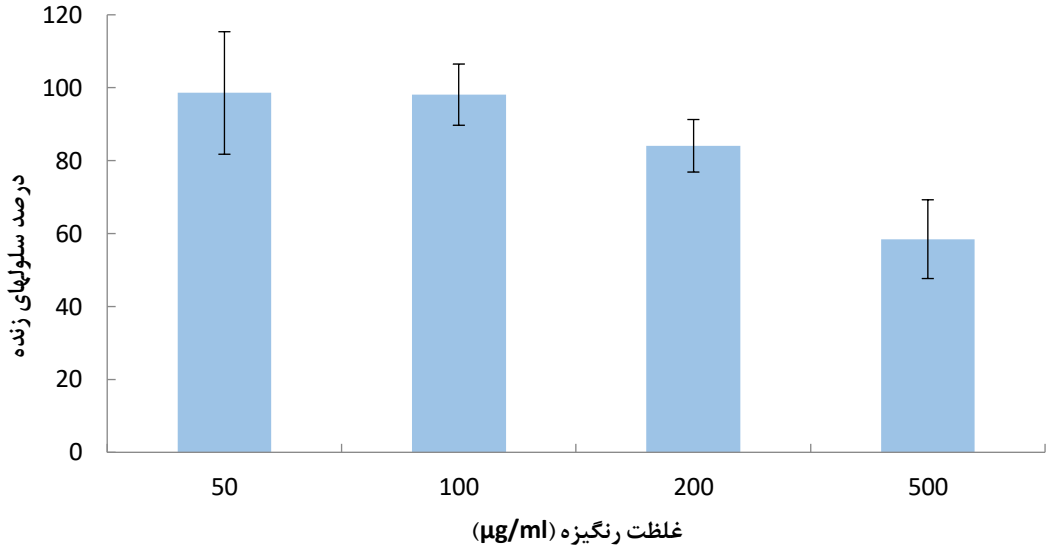


شکل ۴: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه کاروتنوئیدی *Deinococcus radiodurans R1* توسط تست‌های مهار رادیکال-های آزاد DPPH (الف) و بررسی میزان احیاکنندگی آهن فریک (ب)

با توجه به شکل ۴ –الف، با افزایش غلظت رنگیزه کاروتنوئیدی مورد مطالعه، میزان مهار رادیکال‌های آزاد در تست DPPH افزایش یافته است. به نحوی که در غلظت ۱۰ mg/mL این رنگیزه حداکثر مهار حاصل گردید. نتایج مشابهی نیز در مورد تست احیای یون‌های فریک مشاهده می‌شود (شکل ۴-ب). هر دو تست، نتایج تست آنالیز واریانس را تأیید می‌کند و با افزایش غلظت کاروتنوئید، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز به طور معناداری افزایش می‌یابد.

نتایج تست MTT به منظور بررسی خاصیت سمیت سلولی، رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی تولیدی توسط سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* بر روی رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی نشان داد که در غلظت‌های ۲۰۰ µg/ml≥ کاروتنوئید،

میزان زنده ماندن سلول‌های کشت در حضور رنگیزه‌ی مورد بررسی، بالاتر از ۶۰ درصد بوده است و در نتیجه در این محدوده‌ی غلظت، رنگیزه‌ی مورد مطالعه، اثرات مهاری چندانی بر رشد رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی نشان نداده است (شکل ۵).



شکل ۵: نتایج بررسی سمیت سلولی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی *Deinococcus radiodurans R1* بر روی رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی با استفاده از تست MTT

همچنین رنگیزه‌ی مورد مطالعه، خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis* و *Escherichia coli* از خود نشان نداد و هاله‌ی عدم رشد تشکیل نگردید. این نتیجه تایید کننده این مطلب است که در صورت استفاده از این رنگیزه در صنایع غذایی یا در محصولات آرایشی، فلور طبیعی بدن در پوست و گوارش تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

حداکثر میزان تولید کاروتنوئید توسط *Deinococcus radiodurans R1* به ترتیب توسط منبع کربنی و نیتروژنی ۱g/L گلوکز (۳۴ mg/L) و ۱g/L عصاره مخمر (۲۸ mg/L) به دست آمد. عصاره کاروتنوئیدی حاصل از سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیر بوده است. به‌علاوه، با توجه به نتایج این مطالعه، از مزایای دیگر این کاروتنوئید می‌توان به عدم سمیت آن بر روی سلول‌های نرمال بدن انسان و بر روی دو باکتری فلور میکروبی بدن اشاره کرد؛ بنابراین سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* را می‌توان به‌عنوان کاندیدی مناسب در تولید رنگیزه‌ی موردنیاز صنایع غذایی و دام و یا به‌عنوان تولید کننده‌ی رنگیزه‌ی موردنیاز در تهیه کرم‌های ضد آفتاب معرفی کرد.

سپاسگزاری: حمایت مالی این تحقیق، توسط دانشگاه اصفهان بوده است. همچنین از خانم سیده نرجس زمانیان برای انجام تست آنتی‌اکسیدان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A. E., Contreras, G., Barahona, S., and Cifuentes, V. (2016). The involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in catabolic repression: an active mechanism contributing to the regulation of carotenoid production. PloS one, 11(9): e0162838-62.

Basha, N. S., Rekha R., Komala M., and Ruby S. (2009). Production of extracellular anti-leukaemic enzyme lasparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: Purification and characterisation. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8(4): 353-360.

Benzie, I. F., and Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of agricultural and food chemistry, 47(2): 633-636.

Britton, G., and Khachik, F. (2009). Carotenoids in food. Carotenoids, 45-66.

Cabral, M. M. S., Cence, K., Zeni, J., Tsai, S. M., Durrer, A., Foltran, L. L., ... and Treichel, H. (2011). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. European Food Research and Technology, 233(1), 159-166.

Chisté, R.C., Freitas, M., Mercadante, A.Z., and Fernandes, E. (2014). Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. Life Sciences 99, 52-60.

da Costa Cardoso, L.A., Kanno, K.Y.F., and Karp, S.G. (2017). Microbial production of carotenoids A review. African Journal of Biotechnology 16, 139-146.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical reviews in food science and nutrition, *40*(3): 173-289.

El-Banna, A. A., El-Razek, A. M. A., and El-Mahdy, A. R. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. glutinis. Food and Nutrition Sciences, 3(01): 64-71.

Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, et al. (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. Food Chemistry 103: 188-195

Gabani, P., and Singh, O. V. (2013). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. Applied microbiology and biotechnology, 97(3): 993-1004.

Gmoser, R., Ferreira, J., Lundin, M., Taherzadeh, M., and Lennartsson, P. (2018). Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora intermedia*. Fermentation, 4(1): 11-26.

Ito, H., Watanabe, H., Takehisa, M., and Iizuka, H. (1983). Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the genus *Deinococcus* from sewage sludges and animal feeds. Agricultural and biological chemistry, *47*(6): 1239-1247.

Khodaiyan, F., Razavi, S.H., and Mousavi, S.M. (2008). Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods. Biochemical Engineering Journal. 40, 415-422.

Kanzy, H. M., Nasr, N. F., El-Shaz, H. A. M., and Barakat, O. S. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(1): 456-469.

Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., and Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. Advances in Biology, 2014.

Manimala MR, and Murugesan R. (2014). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. Journal of Applied and Natural Science. 6(2): 649-653.

Mitra, R., Samanta, A. K., Chaudhuri, S., and Dutta, D. (2015). Growth kinetics and carotenoid production of a newly isolated bacterium on glucose as a carbon source during batch fermentation. 5th Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BioTech 2015), 13-15 March, Kanpur, India.

Mohana, D., Thippeswamy, S., andAbhishe, R. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. Radiation Protection and Environment, 36(4): 168-174.

Nasri Nasrabadi, M. R., and Razavi, S. H. (2010). Enhancement of canthaxanthin production from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 in a fed-batch process using trace elements and statistical methods. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 27(4): 517-529.

Oliver, J., and Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. Journal of chromatography A, 881(1-2): 543-555.

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., &Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. Frontiers in Microbiology, 5, 753.

Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Amoozegar, M. A., Babavalian, H., Tebyanian, H., andShakeri, F. (2017). High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. Excli journal, 16: 840-851.

Sandmann, G. (2014). Carotenoids of biotechnological importance. Pages 449-467 in Biotechnology of Isoprenoids, Springer.

Sasidharan P, Raja R, Karthik C, Ranandkumar S, and Indra Arulselvi P. (2013) Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. Journal of Biochemical Technology 4(4): 632-635.

Shariati, S., Zare, D., &Mirdamadi, S. (2019). Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakesleatrispora*. Food science and biotechnology, 28(2), 469-479.

Sharma, O. P., and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113(4): 1202-1205.

Siso, M. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, 57(1), 1-11.

Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., and Morana, A. (2017). Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: Identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, *21*(5): 933-945.

Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., and Hua, Y. (2009). Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. Letters in applied microbiology, 49(6): 689-694.

Tsai S-Y., Huang S-J., and Mau J-L., (2006) Antioxidant properties of hot water extracts from Agrocybecylindracea. Food Chemistry 98: 670-677.

Zhao, J. H., Bai, F. Y., Guo, L. D., and Jia, J. H. (2002). *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from xylem of pine twigs. FEMS yeast research, 2(2): 159-163.

Zamanian, S. N., and Etemadifar, Z. (2017). Radical scavengering of pigments from novel strains of *Dietzia schimae* and *Microbacteriumest eraromaticum.* Progress in Biological Sciences, 6(2): 159-170.

Evaluation of Biomass and Total Carotenoids Content of *Deinococcus radiodurans R1* in Response to Different Carbon and Nitrogen Sources

A. Salehi Bakhtiyari[1], Z. Etemadifar[1*], M. S. Borhani[2]

Received:2020.4.20
Accepted:2021.1.27

Abstract

In the present study, the effect of different carbon and nitrogen sources on the microbial biomass and carotenoid production of *Deinococcus radiodurans*, one of the most radiation-resistant microorganisms, was evaluated using one-factor-at-a-time approach. The antioxidant, cytotoxicity and antibacterial properties of the pigment were also evaluated. The carotenoid pigment had EC_{50} (Half maximal effective concentration) of 20.19µg/mL and EC_{50} =3.28mg/mL in the ferric reducing antioxidant power and free radical scavenging assay, respectively. The maximum amount of carotenoid pigment was achieved in the presence of 1g/L glucose (34 mg/L) and 1g/L yeast extract (28 mg/L). Based on the approach of one factor at a time, the optimal conditions for carotenoid production were obtained as 37 mg/L pigment in culture medium containing 1 g/L glucose carbon source and 1 g/L nitrogen source of yeast extract. Besides, the pigment had no toxic or inhibitory effects on the human fibroblast cell line and two bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Antioxidant, Optimization, Pigment, Radiophile*

1- Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
*(Corresponding author: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir)
2- Department of Biology, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۱۱۲-۱۲۸
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 112-128
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۹

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2020.29199.1339

اثر ترکیبات فنلی سنتزی و استخراج شده از علف‌هرز سوروف (Echino crus-galli (L.) Beauv) بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیای گیاهچه‌های برنج رقم دمسیاه

ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری*[۱]، امیر قربانی[۲]، حسین صبوری[۳]، میثم حبیبی[۴]، عبدالله عطایی[۲]

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های برنج رقم دمسیاه به غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۲۴، ۰/۰۴۸، ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار) ترکیبات فنلی استخراج شده از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف در محیط کشت هیدروپونیک بود. در آزمایش دیگری، غلظت‌های مختلف فنل سنتزی (۰، ۱/۵۱۴، ۳/۰۵۴، ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی‌مولار) نیز بر این رقم اعمال گردید. مطابق نتایج، صفات طول ریشه، عرض بزرگ‌ترین برگ، درصد رطوبت نسبی برگ، محتوای پروتئین و فنل‌کل برنج با افزایش غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی سوروف نسبت به شاهد افزایش یافت. بر اساس نتایج، اثر کاهشی غلظت‌های مختلف عصاره ترکیبات فنلی سنتزی علاوه بر صفات مورد بررسی بر سطح برگ در بوته و محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی، بیش از تیمارهای طبیعی آن در سوروف بود. بنابراین با توجه به اثر منفی ترکیبات فنلی سوروف بر گیاهچه‌های برنج و وجود مقادیر قابل ملاحظه فنل سنتزی در ساختار سموم، پیشنهاد به کاشت ارقام مقاوم و مصرف حداقلی علفکش‌ها است.

واژه‌های کلیدی: برنج رقم دمسیاه، رنگیزه کلروفیلی، سطح برگ، عصاره فنل سنتزی، علف‌هرز سوروف، کشت هیدروپونیک.

۱- استادیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس
*(نویسنده مسئول: eg.alamdari@gonbad.ac.ir)
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم علف‌های هرز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس
۳- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس
۴- مربی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان است که غذای بیش از ۳ میلیارد نفر از مردم جهان را تأمین می‌کند (Bao *et al*., 2019). علف‌های هرز مهم‌ترین عامل محدودکننده عملکرد در تولید برنج هستند (Weerakoon *et al*., 2011). در میان تمامی گونه‌های علف‌هرز مزارع برنج، دو علف‌هرز سوروف (*Echinocloa crus-galli* (L.) Beauv) و اویارسلام (*Cyperus difformis* L.) از مهم‌ترین علف‌های هرز مزارع برنج مازندران معرفی شدند (محضری و همکاران، ۱۳۹۱). در پژوهشی گزارش شده است که دو علف‌هرز سوروف و اویارسلام بـــه دلایـــل شـــباهت مورفولـــوژیکی و اکولوژیکی که با برنج دارند، خـسارت قابـــل تـــوجهی را به این گیاه وارد می‌سازند. خسارت این علف‌های هرز در مزارع برنج تا ۶۰ درصـد گزارش شـده است (عرفانی، ۱۳۸۱). در پژوهشی دیگر، خسارت گونه‌های هرز به برنج تا ۵۰ درصد گزارش شده است (محضری و همکاران، ۱۳۹۱). اساس بر مطالعات انجام شده، اگر علف‌های هرز کنترل نشوند، عملکرد گیاهان زراعی بسته به توانایی رقابت علف‌های هرز بین ۱۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش می‌یابد (Weisany *et al*., 2016). رقابت شامل مجموعه‌ای از فرآیندهای پویا است که عرضه، تقاضا، جذب و بهره‌وری منابع را تحت تأثیر قرار می‌دهند. گیاهان از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در پاسخ به محیط اطراف خود بسیار انعطاف هستند و این مسئله منجر به بروز پاسخ‌های متفاوتی از سوی گیاهان خواهد شد (Fuente *et al*., 2014; Gronle *et al*., 2015; Ren *et al*., 2016). معمولاً تصور بر این است که خسارت ایجاد شده توسط علف‌های هرز، نتیجه تأثیرات مستقیم رقابتی و آللوپاتیکی و یا مجموع این عوامل باشد (Alam *et al*., 2001). پدیده آللوپاتی به‌علت ایجاد ترکیبات فعال زیستی به‌وسیله گیاهان و یا بقایای به‌جامانده از آن‌ها ایجاد می‌گردد. این ترکیبات پس از تبدیل به مواد ثانویه و ورود به محیط رشد گیاه در مزرعه و یا دیگر اکوسیستم‌ها ممکن است جوانه‌زنی، رشد و نمو سایر گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند. هرچند، این تأثیرات ممکن است به‌صورت مثبت و یا منفی بروز پیدا کند (Marinov-Serafimov, 2010; Azadbakht *et al*., 2013; Ravlic *et al*., 2015). متابولیت‌های ثانویه به سه گروه شیمیایی مجزا ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و ترکیبات نیتروژن‌دار تقسیم‌بندی می‌شوند. میزان فراوانی ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و نیتروژن‌دار در طبیعت به‌ترتیب در حدود ۵۵، ۱۸ و ۲۷ درصد است (Ramawat & Merillon, 2013). ترکیبات آللوشیمیایی به مواد شیمیایی گفته می‌شود که از گیاهان تولید می‌شوند، این گونه ترکیبات دارای خصوصیات ردوکس و یا فیتوتوکسیته بوده و احتمالاً می‌توانند گیاهان، میکروب‌ها و یا حتی برخی عملکردهای جانوری را تحت تأثیر تاثیر خود قرار دهند (Cartea *et al*., 2010; Vasilakoglou *et al*., 2013; Saxena *et al*., 2016). ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانوی هستند که از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنل‌های ساده، فنلیک اسیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، تانن‌های متراکم (پروسیانیدین‌ها)، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها تقسیم می‌شوند (Karaman *et al*., 2010). این ترکیبات به‌دلیل خصوصیات ردوکس، خود می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهنده‌ی دهنده‌های پروتون در پاکسازی اکسیژن یکتایی (O2) دخالت کرده و به‌دلیل ساختار شیمیایی متنوع، تفاوت‌هایی را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان

دهند (Karaman *et al*., 2010; Tawaha *et al*., 2007). البته تاثیر آللوکمیکال‌ها بسته به غلظت آن‌ها تغییر می‌یابد. دسترس و همکاران (۱۳۹۳) گزارش نمودند که تأثیر مواد دگرآسیب روی گیاهان همیشه منفی نیست بلکه مواد دگرآسیب دارای اثرات تحریک‌کننده و یا خنثی هستند. غلامعلی‌پور علمداری و دئوکله (Gholamalipour Alamdar & Deokule, 2013) با استفاده از روش پیشرفته کروماتوگرافی با لایه نازک (High Performance Thin Layer chrogatography)، ترکیبات ثانویه فنلی، ترپنوئیدها و کومارین‌ها را در اندام‌های ریشه، ساقه و برگ علف‌هرز سوروف مورد شناسایی قرار دادند. هم‌چنین در تحقیقی دیگر، غلامعلی‌پور علمداری و همکاران (۱۳۹۴) با مقایسه ترکیبات فنلی علف‌های هرز رایج در گنبد کاووس گزارش نمودند که دو علف‌هرز سوروف و قیاق در مقایسه با سایر علف‌های هرز در مرحله رسیدگی، از مقادیر مناسبی از ترکیبات فنلی برخوردار هستند. نظر به اهمیت، پراکنش و غالبیت بالای علف‌هرز سوروف در شالیزارهای استان مازندران و دارا بودن قابلیت تداخل بالا، خسارت قابل توجهی به شالیکاران هر ساله وارد می‌نماید. لذا کشاورزان مجبور به استفاده زیاد از علف‌کش‌های شیمیایی هستند که این امر موجب شکل‌گیری بیوتیپ‌های مقاوم سوروف به علف‌کش‌ها و آلودگی زیست محیطی شدید خواهد شد. لذا از آنجایی‌که اطلاعات اندکی در خصوص بررسی واکنش ارقام برنج به‌ویژه رقم بومی و محلی برنج دمسیاه نسبت به ترکیبات فنلی سوروف و به‌ویژه سنتزی آن در دسترس است، بنابراین این امکان را برای محققین مهیا می‌کند تا در صورت تداخل این علف‌هرز در شالیزارها بتوان اثرات منفی این گیاهان و نیز میزان مصرف علف‌کش‌ها را به حداقل رساند. بنابراین هدف از آزمایش حاضر، مقایسه اثر ترکیبات فنلی سنتزی و استخراج شده از علف‌هرز سوروف (*Echino crus-galli* (L.) Beauv) بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیای گیاهچه‌های برنج رقم دمسیاه در شرایط محیط کشت هیدروپونیک بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گونه علف‌هرز سوروف (*E. crus-galli*)

در این آزمایش، اندام‌های نمونه گیاهی علف‌هرز سوروف در مرحله رویشی (نیمه اول اردیبهشت) از شالیزارهای روستای تسبیح‌کلا از توابع منطقـه شهر چمستان نور استان مازندران در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. نمونه علف‌هرز سوروف به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران منتقل و از لحاظ گیاه‌شناسی به‌وسیله کارشناس سیستماتیک خبره به‌طور دقیق مورد شناسایی قرار گرفت. البته نمونه هرباریومی علف‌هرز سوروف منطقه مورد بررسی به‌همراه سایر علف‌های هرز مزارع برنج با کد هرباریومی No. BSI/WCT/Tech/2008/689 در مرکز شناسایی نمونه‌های هرباریومی شهرستان پونای هندوستان در سال ۱۳۸۷ مورد شناسایی قرار گرفته بود.

آماده‌سازی علف‌هرز سوروف

کل اندام علف‌هرز سوروف پس از جمع‌آوری در شرایط سایه پژمرده شد و سپس با کمک آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. نمونه‌های حاصل توسط آسیاب با مش ۸ به قطعات بسیار ریز پودر و سپس نمونه‌ها تا قبل از آزمایش در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند.

روش استخراج ترکیبات فنلی از علف‌هرز سوروف

با توجه به این‌که بهترین روش برای استخراج ترکیبات فنلی، استفاده از حلال متانول: آب (۸۰:۲۰) و قرار دادن سوسپانسیون (پودر و حلال) در حمام آب جوش به‌مدت ۲ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد است، بنابراین از استخراج گرم استفاده شد (حاجی مهدی‌پور و همکاران، ۱۳۸۸). عموماً عصاره آلی متانولی علف‌هرز سوروف دارای حداکثر قابلیت استخراج ترکیب فنلی نسبت به سایر حلال‌ها است (Sathis Kumar *et al.*, 2013)، این در حالی‌است که حلال آب از کمترین قابلیت جهت استخراج این ترکیب برخوردار است (داوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۶). بدین منظور، ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از پودر گیاه به دقت توزین شد و سپس بر آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ریخته و مخلوط حاصل به‌مدت ۶ ساعت در دستگاه لرزاننده قرار داده شد. در ادامه سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۲ ساعت در حمام آب جوش با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت دو ساعت، عصاره‌ها توسط کاغذ صافی فیلتر و در بالن ژوژه دو میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شدند.

آزمایش‌های آللوپاتیکی

برای آزمایش‌های آللوپاتی، ترکیبات فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف (*E. crus-galli*)، در غلظت‌های ۰/۰۲۴، ۰/۰۴۸، ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار و شاهد (بدون متانول) تهیه شد و بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فنل‌کل گیاهچه‌های برنج رقم بومی محلی دمسیاه در مرحله اولیه رشدی تحت کشت هیدروپونیک اعمال گردید. برای زیست‌سنجی، متانول موجود در عصاره از طریق تفاوت نقطه جوش خارج گردید، نقطه جوش متانول و فنل به‌ترتیب ۶۵ و ۱۸۱/۷ درجه سانتی‌گراد است. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصافی با سه تکرار در آزمایشگاه علوم علف‌های‌هرز دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد. هم‌چنین در آزمایش دیگری عصاره فنل سنتزی (هیدروکسی‌بنزن) در غلظت‌های مختلف ۱/۵۱۴، ۳/۰۵۴، ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی مولار و شاهد بر رقم برنج مورد نظر اعمال شد. فنل مورد نظر با فرمول شیمیایی C_6H_5OH از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص ۹۹ درصد و وزن ملکولی ۱۱/۹۴ گرم بر مول تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره سنتزی فنل

برای تهیه عصاره سنتزی فنل، ابتدا غلظت‌های مشابه عصاره طبیعی تهیه و سپس به‌طور آزمایشی بر گیاهچه‌ها در محیط هیدروپونیک اعمال شد. با توجه به نتایج حاصل در کم‌ترین غلظت اعمال شده حدود ۳۰ درصد گیاهچه‌ها سالم ماندند. بنابراین کم‌ترین غلظت به نسبت یک چهارم، دو چهارم، سه چهارم و کامل به‌همراه شاهد بر گیاهچه‌های برنج به‌ترتیب ۰، ۰/۵۸، ۱/۱۵، ۱/۷۲ و ۲/۳۱ میلی‌گرم (۰، ۱/۵۱۴، ۳/۰۵۴، ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی مولار) در چهار لیتر آب اعمال شد.

آماده‌سازی گیاهچه‌های برنج

آماده‌سازی گیاهچه‌های برنج در حضور غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی بدین شکل بود که بذرهای ضدعفونی شده رقم دمسیاه در پتری‌دیش جوانه‌زده و ریشه گیاهچه‌های ۷ روزه از داخل توری‌های تعبیه شده در دهانه هر تشت حاوی چهار لیتر محلول غذایی یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) منتقل شدند. پس از اعمال تیمارها (۶۰ میلی‌لیتر عصاره در چهار لیتر محلول غذایی)، گیاهچه‌ها به‌مدت دو هفته در این شرایط نگه‌داری شدند. گیاهچه‌های برنج در دمای محیط ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، اتاقک رشد با روشنایی ۱۴۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگه‌داری شدند (Cadho & Rajender, 1995). محلول یوشیدا به فاصله هر ۷ روز یک‌بار تعویض و تیمارها مجدداً با غلظت قبلی اعمال شدند (Enteshari & Ahrabi, 2011). میزان pH هر دو روز یک‌بار تنظیم شد. در انتهای آزمایش برخی از صفات نظیر طول ریشه، تعداد ریشه، طول و عرض بزرگ‌ترین برگ (در هر بوته بزرگ‌ترین برگ انتخاب و سپس میانگین آن با اندازه‌گیری سه قسمت بالایی، میانی و پایینی برگ گزارش گردید)، سطح برگ در بوته (با دستگاه سطح برگ سنج Leaf area meter با مدل Delta- t)، و ارتفاع بوته تحت عصاره فنلی حاصل از علف‌هرز مورد بررسی و به‌علاوه عصاره سنتزی فنل به‌طور جداگانه برآورد شد. در این مطالعه، درصد رطوبت نسبی برگ، محتوای کلروفیل a، b و کل (Arnon, 1949)، محتوای پروتئین در ماده خشک (Lowery *et al.*, 1951)، محتوای نشاسته در ماده خشک (Thayumanavan & Sadasivam, 1984) محتوای فنل کل در ماده خشک (Malick& ,Singh 1980) اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab با نسخه ۱۴ مورد آزمون قرار گرفت. سپس تجزیه واریانس داده‌ها با کمک نرم افزار SAS با نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار حفاظت شده (Protected Least Significant Difference) (در جایی‌که آماره F معنی‌دار) است در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف بر صفات مورفولوژیکی برنج رقم دمسیاه

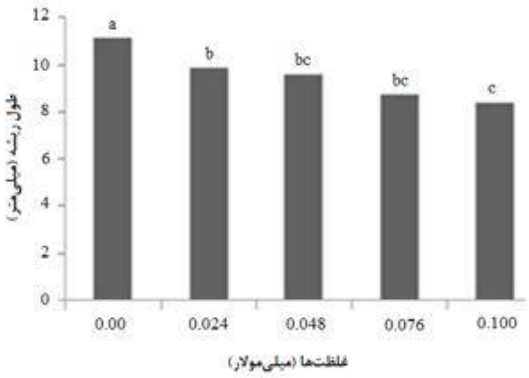
مطابق نتایج، غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف اثرات معنی‌داری بر صفات طول ریشه، عرض بزرگ‌ترین برگ در سطح احتمال یک درصد و صفات سطح برگ و طول بوته برنج رقم دمسیاه در سطح احتمال پنج درصد داشتند. بر اساس نتایج، صفات تعداد ریشه در بوته و طول بزرگ‌ترین برگ تحت غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد، طول ریشه گیاهچه‌های برنج با افزایش غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی سوروف به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد کاهش یافت. بیشترین کاهش طول ریشه گیاهچه‌های برنج مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد بود، اگرچه از لحاظ آماری با غلظت‌های ۰/۰۷۶ و ۰/۰۴۸ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (شکل ۱). در این مطالعه، عرض بزرگ‌ترین برگ گیاهچه‌های برنج تحت غلظت‌های ۰/۰۴۸، ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد، بیشترین کاهش معنی‌دار از لحاظ آماری به دو تیمار ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار تعلق داشت (شکل ۲). در مورد سطح برگ، غلظت ۰/۰۲۴ میلی‌مولار ترکیب فنلی عصاره علف‌هرز سوروف و و فراتر از آن به‌ترتیب اثر افزایشی و کاهشی بر این مشخصه نشان دادند، اما از لحاظ آماری تفاوت آن‌ها با شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین هم‌چنین نشان داد که دامنه تغییرات طول بوته گیاهچه‌های برنج در غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف بین ۲۵/۳۶ تا ۳۰/۰۹ میلی‌متر متغیر بود. کم‌ترین و بیش‌ترین طول بوته به‌ترتیب مربوط به شاهد و تیمار ۰/۱ میلی مولار عصاره فنلی این علف‌هرز بود (شکل ۴). این مطالعه بیانگر این است که واکنش صفات مورفولوژیکی گیاهچه‌های برنج بسته به میزان غلظت مواد آللوپاتیک ترکیبات فنلی سوروف و نوع اندام متغیر است. این یافته‌ها با گزارش‌های دیگر محققین مطابقت دارد. رامدان و همکاران (Ramadan *et al.*, 2018) گزارش نمودند اثرات مثبت و یا منفی ترکیبات آللوپاتیک به نوع آللوشیمیایی، غلظت مواد آللوشیمیایی و حساسیت گیاه هدف وابسته است. مجید و همکاران (Majeed *et al*., 2012) و سیار و همکاران (Siyar *et al.*, 2019) گزارش نمودند که سنتز و غلظت آللوکمیکال‌ها در گیاهان بستگی به عوامل مختلفی نظیر نوع گونه گیاهی، اندام‌ها، تنش‌های زنده و غیرزنده دارد. همان‌طوری‌که نتایج این مطالعه نشان داد صفت طول بوته در غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی و صفت سطح برگ تنها در غلظت ۰/۰۲۴ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این بیانگر عدم محدودکنندگی تیمارهای مورد مطالعه ترکیبات فنلی بر طول بوته در غلظت‌های مورد بررسی است که این مطالعه مطابق یافته‌های حسین و همکاران (Hussain *et al.*, 2017) است. این محققین گزارش نمودند گیاهانی که حاوی مواد آللوپاتیک هستند، به‌عنوان منبع بزرگی از کودهای زیستی توصیف شده‌اند. فاروق و همکاران (Farooq *et al.*, 2013) نیز گزارش نمودند که ترکیبات زیادی از فنلیک اسیدها و آلکالوئیدها شناسایی شده‌اند که با تسریع فرآیندهای

فیزیولوژیکی در گیاهان سبب تحریک رشد گیاهان در غلظت‌های پایین می‌گردند. در حقیقت ترکیب‌های فنلی ویژگی‌های احیایی دارند که به آن‌ها اجازه می‌دهد به‌عنوان احیاءکننده، دهنده هیدروژن و فرونشاننده اکسیژن یکتایی وارد عمل شوند (Henriques *et al.*, 2012).

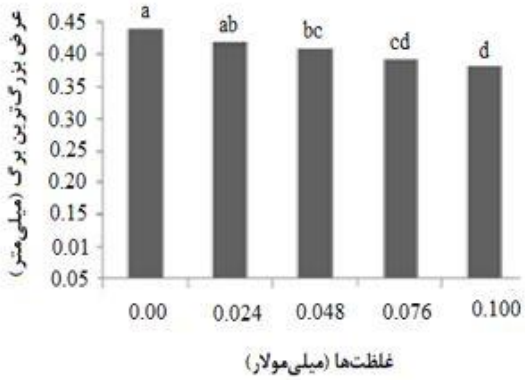
جدول ۱: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف بر صفات مورفولوژیکی برنج رقم دمسیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	تعداد ریشه در بوته	طول بزرگ‌ترین برگ	عرض بزرگ‌ترین برگ	سطح برگ در بوته	طول بوته
تیمار	۴	۳/۴۳۵**	۰/۸۹۲۱ ns	۳/۹۶۹ns	۰/۰۰۱۵**	۰/۳۵۰۰*	۱۰/۹۲*
خطا	۱۰	۰/۴۷۸۱	۰/۵۱۱۹	۱/۲۷۷	۰/۰۰۰۲	۰/۰۷۲۵	۲/۵۲۰
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷/۲۴۸	۱۰/۶۲	۶/۰۷۷	۳/۷۷۴	۵/۳۵۰	۵/۵۸۰

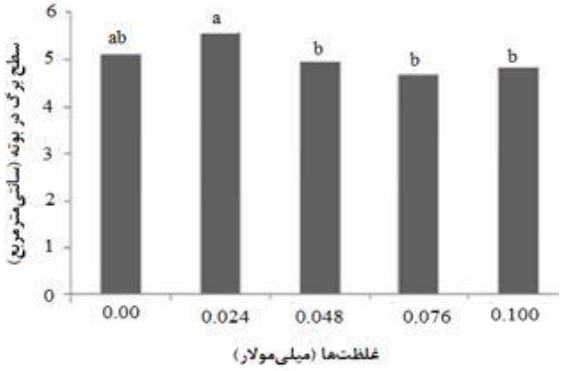
**،*: به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک و پنج درصد می‌باشد. ns: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار



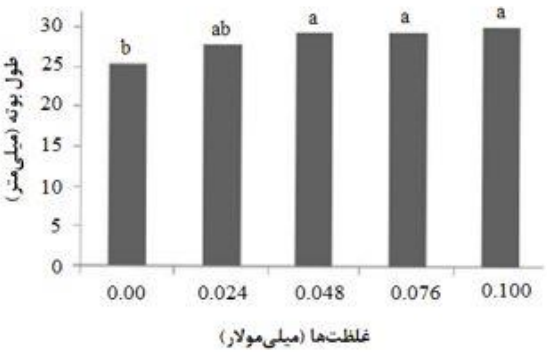
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر طول ریشه برنج رقم دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر عرض بزرگ‌ترین برگ برنج رقم دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر سطح برگ در بوته برنج رقم دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر طول بوته برنج رقم دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برنج رقم دمسیاه

در این مطالعه، غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف اثر معنی‌داری بر درصد رطوبت نسبی برگ و محتوای فنل‌کل در سطح احتمال یک درصد و میزان پروتئین برنج در سطح احتمال پنج درصد داشتند، درحالی‌که اثر معنی‌داری بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی و نشاسته نشان ندادند (جدول ۲). مطابق نتایج، دامنه تغییرات درصد رطوبت نسبی برگ برنج تحت غلظت‌های مختلف فنلی علف‌هرز سوروف بین ۵۸/۷۵ و ۳۵/۶۲ میلی‌گرم بر گرم بود. کم‌ترین این مقدار مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌مولار بود که تفاوت آن با تیمارهای ۰/۰۴۸ و ۰/۰۷۶ میلی‌مولار معنی‌دار نبود. اما بیش‌ترین محتوای پروتئین به شاهد اختصاص داشت، به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری با تیمار ترکیب فنلی سوروف در کمترین غلظت نشان نداد (شکل ۵). مطابق نتایج، محتوای پروتئین برنج تحت غلظت‌های ۰/۰۴۸، ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار از عصاره فنلی سوروف با سطح معنی‌داری یکسانی کاهش نشان داد. هم‌چنین با کاربرد غلظت ۰/۰۲۴ میلی‌مولار از ترکیب فنلی سوروف، محتوای پروتئین در مقایسه با شاهد کاهش یافت، اما تفاوت آن با شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۶).

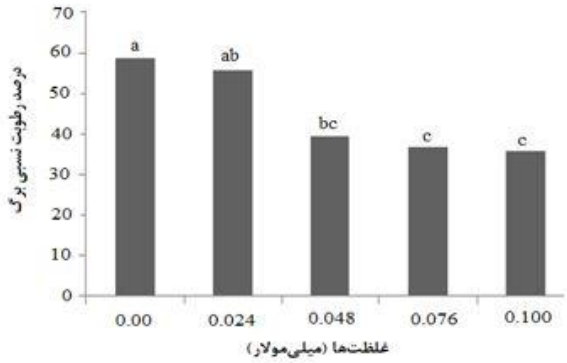
مقایسه میانگین داده‌ها هم‌چنین نشان داد که محتوای فنل کل برنج با افزایش مقادیر مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف به‌طوری معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین و کمترین کاهش به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰/۰۲۴ و ۰/۱ میلی‌مولار بود (شکل ۷). کاهش محتوای پروتئین، فنل کل و درصد رطوبت نسبی برگ برنج می‌تواند به‌واسطه کاهش پتانسیل اسمزی ناشی از تنش آللوپاتیک ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف باشد. دایپومانکا و همکاران (Daiponmaka *et al.*, 2010) اظهار داشتند که تنش اسمزی در برنج موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی آن می‌شود. شو و راستین (Xu & Rothstein, 2018)

نیز بیان نمودند که تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان از استراتژی‌های مناسب برای جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد، تخریب غشای سیتوپلاسمی و ماکروملکول‌ها در برابر تنش‌های اسمزی است.

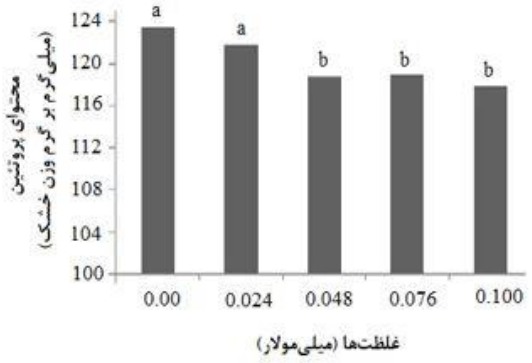
جدول ۲: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف بر صفات فیزیولوژیکی و فنل کل برنج رقم دمسیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد رطوبت نسبی برگ	محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل b	محتوای کلروفیل کل	محتوای پروتئین	محتوای نشاسته	محتوای فنل کل
تیمار	۴	۱۶/۸۶**	۰/۰۱۱۶ns	۰/۰۰۸۶ns	۰/۰۴۰۱ns	۳۶۵/۳*	۲۹۴ ns	۹۱۶/۵**
خطا	۱۰	۱/۵۱۴	۰/۰۳۸۸	۰/۰۵۱۲	۰/۱۰۱۹	۹۶/۸۶	۲۳۳/۶	۰/۷۷۰۴
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱/۰۲۴	۷/۹۱۴	۱۳/۵۵	۹/۳۹۷	۲۱/۷۴	۷/۵۱۷	۴/۴۹۲

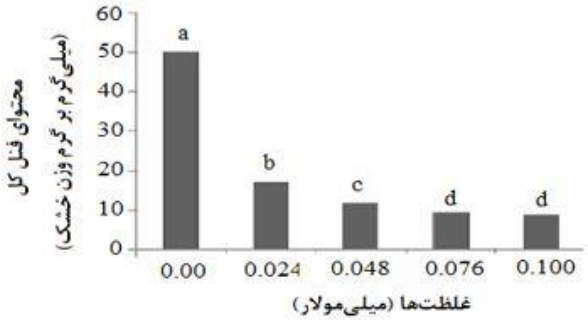
**، *: به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک و پنج درصد می‌باشد. ns: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر درصد رطوبت نسبی برگ برنج رقم دمسیاه حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار)



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر محتوای پروتئین برگ برنج رقم دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار)



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر میزان فنل کل رقم بومی محلی برنج دمسیاه (حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار)

نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره فنل سنتزی بر صفات مورفولوژیکی برنج رقم دمسیاه

اثر غلظت‌های مختلف حاصل از عصاره فنل سنتزی بر صفات مورفولوژیکی برنج نشان داد که تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر طول ریشه، تعداد ریشه در بوته، عرض بزرگ‌ترین برگ، سطح برگ در بوته، طول بوته نشان دادند (جدول ۳). مطابق نتایج، طول ریشه گیاه برنج تنها در دو غلظت ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت (جدول ۴). تعداد ریشه در بوته برنج تنها در غلظت ۱/۵۱۴ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد، اما تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. در حالی‌که در سایر غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری از روند کاهشی برخوردار بود (جدول ۴). در مورد طول بزرگ‌ترین برگ، این مشخصه با افزایش غلظت عصاره فنل سنتزی، کاهش نشان داد (جدول ۴). در این مطالعه، عرض بزرگ‌ترین برگ برنج، تنها در دو غلظت بالای ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب ۱۳/۱۵ و ۵۵/۲۶ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۴). سطح برگ در بوته و طول برنج تحت غلظت ۱/۵۱۴ میلی‌مولار از فنل سنتزی به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافتند، اما در غلظت‌های ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی‌مولار از روند کاهشی معنی‌دار برخوردار بودند (جدول ۴). انتشاری و اهربی (Enteshari &Ahrabi, 2011) گزارش نمودند آللوکمیکال‌ها ترکیباتی متنوع از لحاظ ساختمانی با مکانیسم‌های عمل متفاوت هستند که از تغییر در فراساختار غشایی تا تغییر در کنترل بیان ژن‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و رنگیزه‌ها را می‌توانند در برگیرند و موجب ایجاد برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متفاوت گردند که در نهایت موجب افزایش و یا کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای گیاهان می‌گردند.

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف حاصل از عصاره فنل سنتزی بر صفات مورفولوژیکی برنج رقم دمسیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	تعداد ریشه در بوته	طول بزرگ‌ترین برگ	عرض بزرگ‌ترین برگ	سطح برگ در بوته	طول بوته
تیمار	۴	۳/۶۲۱**	۱/۲۲۴**	۷۰/۴۷**	۰/۰۲۱۴**	۶/۹۷۶**	۹۷/۳۹**
خطا	۱۰	۰/۵۷۸۳	۰/۱۳۱۰	۱/۱۳۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۶۳۵	۱/۴۶۶
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷/۸۷۹	۷/۹۹۹	۷/۶۷۸	۵/۷۳۴	۷/۶۰۸	۶/۲۹۰

**: نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد

جدول ۴: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره فنل سنتزی بر صفات مورفولوژیکی برنج رقم دمسیاه

غلظت‌ها (میلی‌مولار)	طول ریشه (میلی‌متر)	تعداد ریشه در بوته	طول بزرگ‌ترین برگ (میلی‌متر)	عرض بزرگ‌ترین برگ (میلی‌متر)	سطح برگ در بوته (سانتی‌متر مربع)	طول بوته (میلی‌متر)
۰ (شاهد)	۱۰/۵۶^{a}	۵/۱۳۳^{a}	۱۷/۸۱^{a}	۰/۳۸۶۶^{a}	۳/۷۰۶^{b}	۲۱/۳۳^{b}
۱/۵۱۴	۱۰/۵۷^{a}	۵/۱۵۰^{a}	۱۷/۷۶^{a}	۰/۳۶۰۰^{ab}	۴/۷۸۰^{a}	۲۵/۱۷^{a}
۳/۰۵۴	۱۰^{ab}	۴/۳۸۶^{b}	۱۵/۲۷^{b}	۰/۳۶۳۳^{ab}	۴/۱۶۰^{b}	۲۱/۹۹^{b}
۴/۵۶۹	۹/۱۴۶^{bc}	۴/۳۴۰^{b}	۱۲/۳۱^{c}	۰/۳۳۶۶^{b}	۳/۱۰۰^{c}	۱۷/۴۲^{c}
۶/۱۳۶	۷/۹۸۳^{c}	۳/۶۲۰^{c}	۶/۱۹۳^{d}	۰/۱۷۶۶^{c}	۰/۸۱۶۷^{d}	۱۰/۳۳^{d}
PLSD5%	۱/۳۸۳	۰/۶۵۸۷	۱/۹۳۷	۰/۰۳۳۹	۰/۴۵۸۶	۲/۲۰۲

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون PLSD

نتایج اثر غلظت‌های مختلف عصاره فنل سنتزی بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فنل کل رقم برنج رقم دمسیاه

مطابق نتایج، تیمارهای مختلف اثر معنی‌داری بر درصد رطوبت نسبی برگ، محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کل در سطح احتمال یک درصد و محتوای پروتئین در سطح احتمال پنج درصد نشان دادند. در حالی‌که اثر تیمارها بر صفات محتوای نشاسته و محتوای فنل کل معنی‌دار نبود (جدول ۵). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که رطوبت نسبی برگ برنج با افزایش غلظت عصاره فنل سنتزی، افزایش یافت. بیش‌ترین افزایش مربوط به غلظت ۶/۱۳۶ میلی‌مولار نسبت به شاهد بود، اما تفاوت آن با تیمار ۴/۵۶۹ میلی‌مولار معنی‌دار نبود (جدول ۶). در مورد محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی، کلروفیل a، b و کل گیاه برنج با افزایش غلظت عصاره فنل سنتزی به‌جزء غلظت ۱/۵۱۴ میلی‌مولار در مورد کلروفیل a و کل کاهش نشان داد (جدول ۶). کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی تحت تنش عصاره سنتزی فنلی می‌تواند نتیجه تخریب ساختار کلروپلاست توسط گونه‌های فعال اکسیژن (Noreen & Ashraf, 2009)، تغییر نسبت چربی- پروتئین رنگیزه‌ها، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و بمراتب کاهش سنتز رنگیزه‌های کلروفیلی باشد (طالع احمد و حداد، ۱۳۸۹). در مورد محتوای پروتئین، این مشخصه تنها در تیمارهای ۴/۵۶۹ و ۶/۱۳۶ میلی‌مولار به‌ترتیب ۳۶/۸۶ و ۳۲/۵۶ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این در حالی است که سایر تیمارها تأثیر معنی‌دار بر این مشخصه نشان ندادند (جدول ۶). کاهش درصد رطوبت نسبی برگ و محتوای رنگیزه‌های کلروفیل تحت عصاره فنل سنتزی نشان‌دهنده حساسیت گیاه برنج به تنش عصاره سنتزی فنلی است. هم‌چنین گیاه برنج با افزایش محتوای پروتئین‌های محلول به نوعی به تنش پاسخ می‌دهد. در حقیقت، تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی سلول منجر به افزایش پروتئین‌های محلول می‌گردد. اشرف و هریس (Ashraf & Hariss, 2004)

گزارش نمودند که گیاهان در پاسخ به تنش ممکن است شکلی از پروتئین‌ها را سنتز نمایند و یا این‌که به‌طور ذاتی در غلظت‌های پایین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض تنش قرار می گیرند، غلظت آن‌ها افزایش یابد.

جدول ۵: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف عصاره فنل سنتزی بر صفات فیزیولوژیکی و فنل کل برنج رقم دمسیاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد رطوبت نسبی برگ	محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل b	محتوای کلروفیل کل	محتوای پروتئین	محتوای نشاسته	محتوای فنل کل
تیمار	۴	۱۹۵/۳**	۰/۹۹۴۶**	۰/۴۳۵۰**	۱/۸۶۸**	۱۴۱۲*	۴۴۲/۸ns	۵۲/۱۹ns
خطا	۱۰	۲۲/۸۲	۰/۰۰۸۹	۰/۰۰۴۱	۰/۱۵۹۵	۲۹۸/۷	۴۶۶/۸	۱۷۷/۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۹/۰۳۹	۴/۱۰۶	۶/۴۳۳	۱۲/۶۶	۱۲/۱۸	۹/۸۲۲	۲۲/۳۹

**،*: به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک و پنج درصد می‌باشد. ns: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار

جدول ۶: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف فنل سنتزی بر صفات فیزیولوژیکی برنج رقم دمسیاه

غلظت‌ها (میلی مولار)	درصد رطوبت نسبی برگ	محتوای کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	محتوای کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	محتوای کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	محتوای پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)
(شاهد)	۴۴/۳۲c	۲/۷۶۶a	۱/۴۰۶a	۳/۷۶۶a	۱۲۰/۷b
۱/۵۱۴	۴۵/۸۶c	۲/۸۳۰a	۱/۳۴۶a	۳/۸۳۳a	۱۱۸/۳b
۳/۰۵۴	۵۲/۴۹bc	۲/۵۳۳b	۰/۹۹۶۶b	۳/۵۳۰a	۱۴۴/۷ab
۴/۵۶۹	۵۸/۲۳ab	۱/۸۲۰c	۰/۷۴۶۶c	۲/۵۶۶b	۱۶۵/۲a
۶/۱۳۶	۶۳/۳۲a	۱/۵۶۳d	۰/۵۲۰۰d	۲/۰۷۳b	۱۶۰a
PLSD5%	۸/۶۹۱	۰/۱۷۲	۰/۱۱۷۴	۰/۷۲۶۷	۳۱/۴۴

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون PLSD

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج آزمایش، اثرات غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از علف‌هرز سوروف و سنتزی آن بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های برنج رقم دمسیاه متفاوت بود. مطابق نتایج، مشخصه‌های مورد بررسی این رقم به غلظت‌های مختلف عصاره فنل سنتزی در مقایسه با عصاره ترکیب فنلی علف‌هرز سوروف حساس‌تر بود، به‌طوری‌که مشخصه‌های مورد بررسی در غلظت‌های بالا بیشتر تحت تاثیر دگرآسیب فنل سنتزی قرار گرفت. با توجه به اثر دگرآسیب ترکیبات فنلی علف‌هرز سوروف بر مولفه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برنج، پیشنهاد به کاشت ارقام مقاوم برنج به‌ویژه در مراحل اولیه رشد در جایی‌که این علف‌هرز غالب باشد، است. این امر نیازمند به درکی عمیق‌تر از ساز و کارهای مولکولی

بیان ژن‌های برنج در حضور ترکیبات دگرآسیب سوروف است. هم‌چنین با توجه به این که اجزای اولیه ساختمان اکثر علف‌کش‌های آلی زنجیره‌ای از کربن با گروه‌های آلیفاتیک و آروماتیک مشتقات بنزن نظیر ترکیبات فنلی هستند، لذا پیشنهاد به کاشت ارقام مقاوم و مصرف حداقلی علف‌کش‌ها است. با توجه به زیست‌توده تولیدی بالای علف‌هرز سوروف و غالبیت آن‌ها در شالیزارها و عدم بهره‌برداری از آن‌ها پیشنهاد به بهره‌برداری از ترکیبات موثره موجود در آن بر علیه علف‌های هرز دیگر و یا انتقال ژن‌های عامل از طریق مهندسی ژنتیک به ارقام برنج است.

منابع

حاجی مهدی‌پور، ه.، خانوی، م.، شکرچی، م.، عابدی، ز.، پیرعلی همدانی، م. ۱۳۸۸. بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه گیاهان دارویی، ۸(۴): ۱۵۲-۱۴۵.

داوری‌نژاد، غ.ح.، تقی‌زاده، س.ف. و اصیلی، ج. (۱۳۹۶). تاثیر حلال‌های مختلف بر میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه عناب (*Zizyphus jujube* Miller). مجله علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)، ۳۱(۱): ۱۶۶-۱۵۸.

دسترس، ع.، صفاری، م. و مقصودی‌مود، ع.ا. (۱۳۹۳). شناسایی و بررسی پتانسیل آللوپاتیک آلکالوئیدهای داتوره (*Datura stramonium*) بر ویژگی‌های جوانه‌زنی ارقام ذرت. فصلنامه علوم و تحقیقات بذر ایران، ۱(۱): ۲۸-۱۷.

طالع احمد، س. و حداد، ر. ۱۳۸۹. اثر سیلیکن بر آنزیم‌های ضد اکسنده و محتوای تنظیم کننده‌های اسمزی در ژنوتیپ گندم نان تحت شرایط تنش خشکی. مجله به زراعی و نهال بذر، ۲-۲۶ (۲): ۲۲۵-۲۰۷.

عرفانی، ر. (۱۳۸۱). جمع‌آوری و شناسایی علف‌های هرز مزارع برنج و روش‌های کنترل معمول در مازندران. موسسه تحقیقات برنج مازندران، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، ۱۲ صفحه.

غلامعلی‌پور علمداری، ا.، بیات کوهسار، ج.، قربانی ا.، خوجه ع.م. و حسنعلی‌زاده چاری، ف. (۱۳۹۴). آنالیز کمی و کیفی برخی متابولیت های اولیه و ثانویه علف‌های هرز رایج منطقه گنبد کاووس. فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی). ۱۰(۲۳۸): ۸۱-۶۸.

Alam, S.M., Ala, S.A., Azmi, A.R., Kan, M.A. and Ansari, R. (2001). Allelopathy and its role in agriculture. Journal of Biology and Science, 1(5): 308-315.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Journal. Plant physiology, 24: 1-5.

Ashraf, M. and Hariss, P.J.C. (2004). Potential biochemical indicator of salinity tolerance in plants. Plant Science, 166: 3-16.

Azadbakht, A., Mahmoodi, S., Amraie, R., Amraei, B. and Nasrollahi, H. (2013). Evaluation the allelopathic effects of aerial and underground extract of sunflower (*Helianthus annus* L.) on germination charactristics and seedling growth of Hoary cress (*Cardaria draba*). Annals of Biological Research, 4(5):188-195.

Bao, J.S., Corke, H., Ping, H. and Li-Huang, Z. (2019). Analysis of QTL for starch properties of rice based on an RIL population. Acta Botanica Sinica, 45 (8): 986-994.

Cadho, K.L. and Rajender, G. (1995). Advances in horticulture medicinal and aromatic plants. Vol. 11, Maldorta Publication. New Delhi.

Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P. and Velasco, P. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. Molecules, 16(1): 251-80.

Daiponmaka, W., Theerakulpisutb, P., Thanonkaoc, P., Vanavichitd, A. and Prathephaa, P. (2010). Changes of anthocyanin cyanidin-3-glucoside content and antioxidant activity in Thai rice varieties under salinity stress. Science Asia, 36: 286-291.

Enteshari, S.h. and Ahrabi, F. (2011). Effect of the coumarin on some physiological and biochemical indexes of Conola-Hiola variety. Journal of Plant Biology, 3(10): 26-23.

Farooq, M., Bajwa, A.A., Cheema, S.A. and Cheema, Z.A. (2013). Application of allelopathy in crop production. International Journal of Agriculture and Biology, 15: 1367–1378.

Fuente, E.B., Suárez, S.A., Lenardis, A.E. and Poggio, S.L. (2014). Intercropping sunflower and soybean in intensive farming systems: Evaluating yield advantage and effect on weed and insect assemblages. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences, 165:1-6.

Gholamalipour Alamdari, E. and Deokule, S.S. (2013). Phytochemical studies and screening the allelopathic potential of some paddy weeds in pot culture. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(7): 1568- 1573.

Gronle, A., Lux, G., Böhm, H., Schmidtke, K., Wild, M.., Demmel, M., Brandhuber, R., Wilbois, K. and Heß, J. (2015). Effect of ploughing depth and mechanical soil loading on soil physical properties, weed infestation, yield performance and grain quality in sole and intercrops of pea and oat in organic farming. Soil and Tillage Research, 148: 59–73.

Henriques, F., Guine, R. and Barroca, M.J. (2012). Chemical properties of pumpkin dried by different methods. Croatian journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 7: 98-105.

Hussain, N., Abbasi, T. and Abbasi, S.A. (2017). Toxic and allelopathic ipomoea yields plant-friendly organic fertilizer. Journal of Cleaner Production, 148: 826-835.

Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K.S. and Apak, R. (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. Journal of Food chemistry, 120: 1201-1209.

Lowery, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 193-256.

Majeed, A., Chaudhry, Z. and Muhammad, Z. (2012). Allelopathic assessment of fresh aqueous extracts of *Chenopodium album* L. for growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). Pakistan Journal of Botany, 44(1): 165-167.

Malick, C.P. and Singh, M.B. (1980). In plant Enzymology and Histo Enzymologhy, Kalyani Publishers, New Dehli.

Marinov-Serafimov, P. (2010). Determination of allelopathic effect of some invasive weed species on germination and initial development of grain legume crops. Pesticides and Phytomedicine, 25(3), 251-259.

Noreen, Z. and Ashraf, M. (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salttreated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. Journal of Plant Physiology, 166: 1764-1774.

Ramadan, T., Amro, A. and Alazazi, S.M.A. (2018). Comparative allelopathic potential of ten field weeds against seed germination of three economic plants. Biological forum – An International Journal, 10(1): 168-181.

Ramawat, K.G. and Merillon, J.M. (2013). Natural products photochemistry, Botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Springer– Verlag Berlin Heidelberge, 4242p.

Ravlic, M., Balicevic, B., Nikolic, M. and Sarajlic, A. (2015). Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sageon weed species hoary cress (*Lepidium draba*). Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 44(1): 48-52.

Ren, Y., Liuc, J., Wangd, Z. and Zhanga, S. (2016). Planting density and sowing proportions of maize– soybean intercrops affected competitive interactions and water-use efficiencies on the Loess Plateau, China. European Journal of Agronomy, 72: 70-79.

Sathis Kumar, D., Banji, D., Harani, A., Tirupathi Rao, A., Nageswar Rao, S., Pavan Kumar, CH. and Santhi Krupa, D. (2013). Screening of polyphenolic compounds in *Echinochloa crusgalli* Roxb extracts by various analytical techniques. Asian Journal of Chemistry, 25(17): 9848- 9852.

Saxena, R., Tomar, R.S. and Kumar, M. (2016). Allelopathy: A green approach for weed management and crop production. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, 3(4): 43-50.

Siyar, S., Majeed, A., Muhammad, Z., Ali, H. and Inayat, N. (2019). Allelopathic effect of aqueous extracts of three weed species on the growth and leaf chlorophyll content of bread wheat. Acta Ecologica Sinica, 39(1), 63-68.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Journal of Food chemistry, 104: 1372-8.

Thayumanavan, B. and Sadasivam, S. (1984). Qual plant foods. Num Nutr. Pp. 34-253.

Vasilakoglou, I., Dhima, K., Paschalidis, K. and Ritzoulis, C. (2013). Herbicidal components and their synergy. Journal of Essential Oil Research, 25(1): 1-10.

Weerakoon, W.M.W., Mutunayake, M.M.P., Bandara, C., Rao, A.N., Bhandari, D.C. and Ladha, J.K. (2011). Direct-seeded rice culture in Sri Lanka. Field Crops Research, 121:53-63.

Weisany, W., Zehtab-Salmasia, S., Raeia, Y., Sohrabib, Y. and Ghassemi-Golezani, K. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi improve competitive ability of dill + common bean intercrops against weeds? European Journal of Agronomy, 75: 60-71.

Xu, Z. and Rothstein, S.J. (2018). ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in Arabidopsis. Plant Signaling and Behavior, 13: 1364-1377.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice IRRI, Los Banos, Philippines.

Comparision of synthesis phenolic compounds and extracted from barnyard grass weed *(*Echinochloa crus-galli (L.) Beauv*)* on morphological and biochemical characteristics of rice seedlings- Domsia cultivar

E. Gholamalipour Alamdari[1*], A. Ghorbani[2], H. Sabouri[3], M. Habibi[4], A. Ataie[2]

Received:2019.11.24
Accepted:2020.12.19

Abstract

The purpose of this study was eavaluation of morphological and biochemical haracteristics of rice seedlings–Domsia cultivar to various concentrations (0, 0.024, 0.048, 0.076 and 0.1 mM) of extracted phenolic compounds of barnyard grass (*Echino crus-galli* (L.) Beauv). The experiment was performed based on a completely randomized design in three replications in hydroponic culture. Methanol was used to extraction of the phenolic compounds. In other experiment, different concentrations of hydroxyl benzene synthesis (0, 1.514, 3.054, 4.569 and 6.136 mM) also was applied on this cultivar. According to the results, effects of different concentrations of phenolic compounds of barnyard grass on charactristics of root length, width of largest leaf, relative water content of leaf, protein and total phenols of rice seedlings were significant at 5% probability level. So that, the extent of negative impact on these traits were increased with increasing concentrations of phenolic compouds of barntyard grass in comparison with control. The greatest reduction of these traits was related to 0.1 Mm of phenolic compounds concentration, although there was no significant difference between this treatment and some treatments. According to the results, significant reduction effect of synthetic phenolic compounds concentrations on studied traits in addition to leaf area in plant and content of chlorophyll a, b and total especially at higher concentrations was more than treatments of its natral concentrations in barnyard grass. Due to the observed negative impact of phenolic compounds of barntyardgrass on rice seedlings–Domsia cultivar and also exstance of considerable amount of aromatic groups of benzene derivatives such as phenolic compouds and aliphatic with cabon chain in the basic chemical structure of the most synthetic herbicides, it is propose to planting resistant cultivars of rice and minimal use of herbicides.

Keywords: *Clorophyll pigment, Echino crus-galli weed, Hydroponic culture, Leaf area, Rice–Domsia cultivar, Synthetic phenol extract*

1- Assistance Professor, Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
*(Corresponding author: eg.alamdari@gonbad.ac.ir)
2- MSc. in Weeds Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
3- Associate Professor, Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
4- Instructor, Biology Department, College of Basic Science, Gonbad Kavous University

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۱۲۹-۱۴۵
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 129-145
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۶

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2020.29585.1342

بررسی اثر داروی اس‌سیتالوپرام بر تغییرات استروئیدهای جنسی و فراساختار اووسیت در ماهی گورامی سه خال پس از افزایش سطح دوپامین با تزریق بروموکریپتین

مناسادات حسینی‌جبلی[۱]، طاهره ناجی*[۱]، همایون حسین‌زاده صحافی[۲]

چکیده

مطالعات نشان داده است که شناخت مسیرهای اثرگذاری نوروترنسمیترهای عصبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. دوپامین نوروترنسمیتری است که اثر آن بر گیرنده ی نوع دوم دوپامین در مغز منجر به بلاک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد(HPG) و اختلالات جنسی می شود. در این پژوهش بررسی اثر داروی سروتونرژیک اس‌سیتالوپرام بر سیستم تولیدمثل ماهی گورامی سه خال پس از القای دوپامین با تزریق بروموکریپتین به‌عنوان هدف انتخاب شده است. تعداد ۹۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده با میانگین وزنی ۱±۳ گرم از مرکز پرورش ماهیان دماوند تهیه شد. ماهی‌ها در شش گروه ۱۵ تایی قرار گرفتند:گروه کنترل دست‌نخورده، کنترل حلال (اتانول ۷۰°) کنترل بروموکریپتین و سه گروه تیمار که دریافت کننده‌ی بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام در سه دوز ۱،۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی آزمایشات با۳بار تکرار بودند. تزریق به صورت عضلانی(IM) و یک روز در میان صورت گرفت. سپس ماهی ها تشریح شدند و بافت تخمدان برای بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی جداسازی شد.پس از تهیه‌ی مایعات بافتی هورمون‌های استروئیدی به روش Elisa اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج به دست آمده از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی از داروی اس‌سیتالوپرام به همراه بروموکریپتین، که مرحله ی غالب ویتلوژنز بود و شاخص گنادی و هورمون‌های استروئیدی در بیشترین مقدار خود بود می‌توان نتیجه گرفت که امکان حضور گیرنده‌ی سروتونین در سطوح پایینی محور HPG وجود دارد. این نوع از گیرنده می تواند در آینده به عنوان هدف دارویی برای بارور کردن جنس ماده مورد مطالعه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تخمدان، دوپامین، سروتونین، گنادوتروپین

۱- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: naji_t@iaups.ac.ir/ tnaji2002@gmail.com)
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مقدمه

نورون‌ها سلول‌های بسیار فعالی هستند و فرآورده‌های آن‌ها در سوخت و ساز و ایجاد ارتباط بین نورون ها و کارکردهای مختلف مانند حالات روانی، یادگیری و تولید مثل نقش اساسی دارند. هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپین در نورون های واقع در هیپوتالاموس ساخته و از همان نورون ها نیز آزاد می شود و بر ساخت و آزاد سازی هورمون لوتئینی کننده (LH) و نیز محرک فولیکولی (FSH) از هیپوفیز اثر گذار است (Wada *et al*., 2006). این دو هورمون بر میزان ساخت و ترشح هورمون های جنسی مانند پروژسترون، استرادیول و تستوسترون مؤثر هستند که وجود این سه هورمون در فرآیند بارور شدن جنس ماده بسیار مهم است به طوری که فقدان و یا کمبود این هورمون ها منجر به عدم باروری خواهد شد (Lydon *et al*., 1995). ارگان‌های درگیر در این فرآیند، تشکیل دهنده‌ی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) هستند. می‌توان گفت اثر مهار بر سیستم تولید مثلی توسط دوپامین در سطوح بالای این محور است . لذا دوپامین در شبکه ی عصبی نقش سرکوب‌گر تولید مثلی را دارد در عین حال که با آزادسازی و تعدیل استروئیدها از گناد ارتباط مستقیم ندارد (Liu & Herbison, 2013) بروموکریپتین یک آگونیست گیرنده‌ی دوپامین نوع دوم است که به خوبی از سد خونی-مغزی عبور کرده و منجر به بلاک مسیر HPG خواهد شد (Davis *et al*., 2009). سروتونین یا هیدروکسی تریپتامین نام ماده ی شیمیایی مهمی است که به عنوان انتقال دهنده ی عصبی عمل می‌کند. این ماده در سیستم عصبی مرکزی، پلاکت های خون و دستگاه گوارش وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که ۹۰درصد سروتونین در سلول های انتروکرومافین که به‌صورت پراکنده در غشای دستگاه گوارش موجودند، متمرکز است و درنتیجه این امر تحرکات روده تنظیم می‌شود. مقدار کمتری از سروتونین با شبکه عصبی سروتونرژیک سیستم اعصاب مرکزی سنتز شده و کارکردهای گوناگونی دارد. این کارکردها شامل تنظیم حالات روحی، اشتها و خواب می باشد. گیرنده های سروتونین (۵ HydroxyTryptamine Receptor) در بخش مرکزی و محیطی سیستم عصبی پراکنده‌اند. این گیرنده ها به هفت دسته از لحاظ ساختار تقسیم می شوند که تحریکی یا مهاری هستند. سروتونین اثر تحریکی بر روی مسیر HPG از طریق فسفولیپاز گاما ۱ در سلول های هیپوتالاموس می گذارد. SSRI[1]ها (داروهای مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین) دسته‌ای از داروها هستند که در درمان افسردگی و اضطراب در کودکان و بزرگسالان استفاده می‌شوند (Jacobsen *et al*., 2015). SSRIها با مهار بازجذب سروتونین موجب افزایش آن در بدن می‌شوند. در بین دارو های SSRI دارو های اس‌سیتالوپرام، سیتالوپرام، فلووکسامین و سرترالین بر گیرنده های غیر سروتونینی کمترین اثر را می گذارند و می‌توان گفت فقط ناقل سروتونین هستند و اثرات چندگانه بر سیستم اعصاب مرکزی (CNS) نمی‌گذارد (Bhattarai *et al*., 2014).

[1] Selective Serotonin Reuptake Inhibitors

ماهی گورامی سه خال با نام علمی *Trichogaster trichopterus* و اسامی عمومی Three spot Gourami، Blue Gourami از خانواده *Anabantidae* و بومی جنوب شرق آسیا (زیستگاه اصلی آن کامبوج، تایلند، لائوس و ویتنام) است. علت استفاده از ماهی گورامی سه خال به عنوان مدل در مطالعات اندوکرینی شباهت زیاد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد آن با انسان، نگه‌داری آسان و مقرون به صرفه بودن است(Bagheri *et al*., 2015). از هورمون‌های مؤثر در این محور گنادوتروپین‌ها هستند که از سلول‌های گنادوتروپ در هیپوفیز قدامی ترشح می‌شوند. این هورمون‌ها با تحریک سنتز ویتلوژن کبدی و تولید ۱۷-بتا استرادیول در سلول‌های گرانولوز سبب رشد و بلوغ تخمک و باروری می‌شوند (Swanson, 1994). در واقع افزایش هورمون های بخش پایینی محور HPG شامل ۱۷-بتا استرادیول، پروژسترون و تستوسترون نشان دهنده ی افزایش فعالیت جنسی در ماهی خواهد بود (Greenberg & Wingfield, 1987). مطالعه‌ی نسبت وزنی گناد به وزن کل ماهی (GSI) می‌تواند به عنوان شاخص تخم ریزی ماهی مطرح گردد و این تغییرات در ماهیان ماده معمولا بیشتر است. برای بررسی آثار هر عامل داخلی و یا خارجی مؤثر بر روند بلوغ نیز از شاخص هایی نظیر HSI می توان بهره برد(Hismayasari *et al*., 2015).

شناخت مسیر های فارماکولوژی از اهمیت بالایی برخوردار است. بسیاری از بیماران دریافت کننده ی داروهای دوپامینی (مثل مبتلایان به فیبرومیالژیا) از عوارض دارو از جمله اختلالات جنسی رنج می برند(Melis & Argiolas, 1995). حضور گیرنده ی سروتونین در سطوح پایینی محور HPG می تواند برای اهداف بعدی مورد توجه قرار گیرد. در این پژوهش با مهار سطوح بالاتر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد توسط داروی دوپامینرژیک بروموکریپتین ، اثرات داروی سروتونرژیک اس سیتالوپرام بر سطوح پایین‌تر این محور بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۹۰ قطعه ماهی گوارمی سه خال ماده با میانگین وزنی ۱±۳ گرم در تاریخ مرداد ماه ۱۳۹۸ از مرکز پرورش ماهی خانماهی دماوند خریداری شد. ماهی‌ها به صورت تصادفی به ۶ گروه شامل گروه کنترل دست نخورده ،گروه کنترل حلال(تزریق با اتانول۷۰º)، گروه کنترلB(بروموکریپتین) و ۳گروه تیمار با ۱ ،۵ و ۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی از داروهای اس‌سیتالوپرام و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی از داروی بروموکریپتین و هرگروه شامل ۱۵ قطعه ماهی گورامی سه خال در آکواریوم های شیشه‌ای رهاسازی شدند. برای تمامی آکواریوم ها هر ۲۴ساعت یک بار وضعیت سلامت ماهی‌ها، دمای آب و pH محیط صورت گرفت.که دمای آب در طول آزمایش ۴± ۲۲ وpH آب ۱±۶ ثبت گردید.

برای تهیه‌ی محلول‌های دارویی برای تزریق، مقدار ۲ گرم از پودر خالص ماده‌ی مؤثره‌ی داروی بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام از شرکت داروسازی ایران‌هورمون و عبیدی خریداری شد. پس از تعیین وزن ماهیان و محاسبه‌ی دوز تیمارها برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، مقادیر دوز مورد نیاز در هر تیمار و همچنین گروه کنترل بروموکریپتین(۱ میلی‌گرم

بر کیلوگرم وزن بدن ماهی) و گروه های تیمار اس‌سیتالوپرام با سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی(جدول ۱) با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شد. سپس پودر وزن شده برای هر تیمار در ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درجه به عنوان حلال حل شد. در نهایت محلول آماده ی تزریق تیمارها در ظروف شیشه‌ای کوچک در بسته نگه‌داری شد. برای بیهوش نمودن ماهیان از عصاره‌ی گل میخک استفاده شد (سلطانی و همکاران ،۱۳۸۰). برای تزریق از سرنگ انسولین به مقدار ۰/۰۱ میلی لیتر از محلول دارویی آماده شده به صورت عضلانی(IM) پس از قرار دادن پنبه مرطوب بر روی آبشش ماهی و مهار نمودن سر و دم، بین باله پشتی و خط جانبی، تزریق گردید.تزریق حلال(اتانول ۷۰º)، دارو های بروموکریپتین و اس سیتالوپرام به مدت ۲۰ روز، یک روز درمیان (بلاک محور HPG با داروی بروموکریپتین در یک روز) و روز بعد داروی اس سیتالوپرام و به همین ترتیب انجام شد آزمایشات ۳ بار تکرار شد. پس از پایان تزریق به مدت ۱ روز هیچ فعالیتی بر روی ماهی ها صورت نگرفت و بعد از آن تشریح ماهی ها آغاز گردید

جدول ۱: غلظت های مختلف داروی بروموکریپتین و اس سیتالوپرام در ماهی گورامی سه خال

ردیف	تیمار	غلظت تزریقی (میلی‌گرم /کیلوگرم وزن بدن)
تیمار ۱	کنترل دست نخورده	-
تیمار ۲	کنترل حلال(تزریق با اتانول ۷۰ درجه)	-
تیمار ۳	کنترل B (بروموکریپتین)	1mg/kg.bw
تیمار ۴	اس سیتالوپرام/بروموکریپتین	1mg/kg.bw B-1mg/kg.bw Es
تیمار ۵	اس سیتالوپرام/بروموکریپتین	1mg/kg.bw B-5mg/kg.bw Es
تیمار ۶	اس سیتالوپرام/بروموکریپتین	1mg/kg.bw-10mg/kg.bw Es

B نشان‌دهنده‌ی داروی بروموکریپتین و Es نشان‌دهنده‌ی داروی داروی اس‌سیتالوپرام است.

در روز بیست و دوم ماهی‌ها تشریح و کبد و تخمدان ماهی‌ها جدا شدند و هرکدام جداگانه روی ترازوی دیجیتال وزن گردیدند. بافت تخمدان برای بررسی با میکروسکوپ نوری در فرمالین ۱۰٪ به عنوان فیکساتیو قرار داده شد، پس از فیکس کردن نمونه‌ها طی مراحلی (پاساژ بافت) برای قالب‌گیری آماده شد. سپس برای تهیه قالب پارافینی پس از ریختن پارافین در قالب فلزی، تخمدان به وسیله پنس گرم به آهستگی داخل آن قرار گرفت. زمانی که پارافین کاملاً سفت و سخت شد آن را از قالب جدا کرده و بلوک‌ها تا زمان برش‌گیری در داخل یخچال قرار گرفت. برای بریدن بافت از دستگاه Microtome مدل Leica ساخت کشور آلمان استفاده شد و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. پس از سوار کردن برش‌ها بر روی لام، لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آون ۱۰۰ درجه سانتی گراد گذاشته شدند تا پارافین آن‌ها ذوب و آب اضافه تبخیر شود تا عمل رنگ‌آمیزی بهتر صورت گیرد. برای رنگ‌آمیزی برش‌های بافتی از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین (H&E) استفاده گردید. پس از آماده سازی لام‌ها، توسط میکروسکوپ نوری Nikon دارای مانیتور دیجیتالی از آن‌ها عکس‌برداری صورت گرفت.

برای تهیه گرید میکروسکوپ الکترونی ابتدا نمونه‌های تخمدان با استفاده از پنس و اسکالپل جدا گردید، سپس مراحل زیر برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بر روی هر یک از نمونه‌ها صورت گرفت.

در فیکساسیون اولیه که به منظور حفظ ساختمان بافت زنده و جلوگیری از اتولیز صورت می‌گیرد، ابتدا هر کدام از نمونه‌های تخمدان در گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد در دمای ۴ درجه به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در زیر هود به محلول تتراکسید اسمیم به غلظت ۱/۵ درصد به مدت یک ساعت و نیم قرار گرفت. بعد از فیکساتیو اولیه برای حذف گلوترآلدهیدی که وارد واکنش نشده و درون بافت باقی مانده است، شستشو انجام می‌گیرد. شستشوی هر نمونه سه مرتبه و هر کدام به مدت ۵ دقیقه در بافر کاکودیلات سدیم ۰/۱ مولار صورت پذیرفت. سپس نمونه‌ها ۲ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. رنگ‌آمیزی با محلول ۲ درصد آبی استات اورانیل به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.به منظور فیکساسیون ثانویه هر نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در تتراکسید اسمیم ۱ درصد فیکس گردید. برای جایگزینی آب درون سلول به وسیله اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۵ درصد) آبگیری صورت پذیرفت. برای این که تمام قسمت‌های بافت به صورت جامد و سخت شکل گیرد، مرحله قالب‌گیری انجام گرفت، این کار به وسیله منومرهای اپوکسی رزین انجام شد که در ابتدا مایع هستند و در اثر حرارت و زمان پلیمریزه و سخت می‌شوند. سپس قالب‌ها در اتو با دمای ۶۰ درجه به مدت ۳-۲ روز گذاشته شد. سپس با دستگاه اولترامیکروتوم بر روی نمونه‌ی تخمدان برش‌هایی به ضخامت ۶۰-۵۰ نانومتر صورت گرفت. پس از آماده شدن نمونه‌ها بر روی صفحات مخصوص (گرید) برای بالا بردن کنتراست(رنگ‌آمیزی مثبت)، نمونه های تخمدان هر کدام را جداگانه در چاهک‌های مخصوص اورانیل استات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق غوطه ور می‌کنیم و سپس آن‌ها را با پنس می‌گیریم و با آب مقطر شست و شو می‌دهیم. در انتها نیز گریدها با میکروسکوپ الکترونی مدل PHILIPS EM 208 S با ولتاژ ۷۰ کیلوولت و با مش مسی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند.

برای اندازه گیری سطوح هورمون های ۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون، پروژسترون به علت کوچک بودن اندازه ی ماهیان امکان خونگیری فراهم نشد، لذا از بافت ماهی و روش هموژنایزر استفاده گردید، سپس مایعات بافتی توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با دور ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه جداسازی گردید. برای سنجش هورمون ها از کیت مخصوص و از روش Elisa استفاده شد.

شاخص گنادوسوماتیک[1] و هپاتوسوماتیک[2] برای ماهی‌ها به روش زیر محاسبه شد.

$$GSI=\frac{W.G}{W}\times 100 \qquad HSI=\frac{W.L}{W}\times 100$$

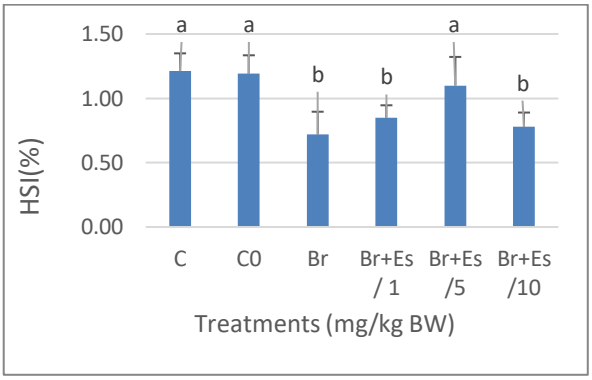
W = وزن کل بدن W.G = وزن تخمدان W.L = وزن کبد

[1] Gonadosomatic Index
[2] Hepatosomatic Index

برای تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی میزان معنادار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمار های مختلف از نظر شاخص گنادوسوماتیک، شاخص هپاتوسوماتیک و سنجش استروئید های خونی از نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن استفاده شد. برای ترسیم نمودار ها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

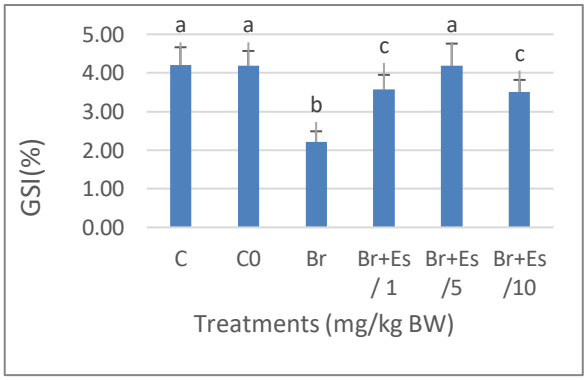
نتایج و بحث

نتایج حاصل از تغییرات شاخص گنادی (GSI) و شاخص کبدی (HSI) به شرح زیر است.



نمودار ۱: تغییرات شاخص هپاتوسوماتیک(HSI) در گروه‌های تیمار و کنترل (حروف مشابه به معنی عدم اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵است)

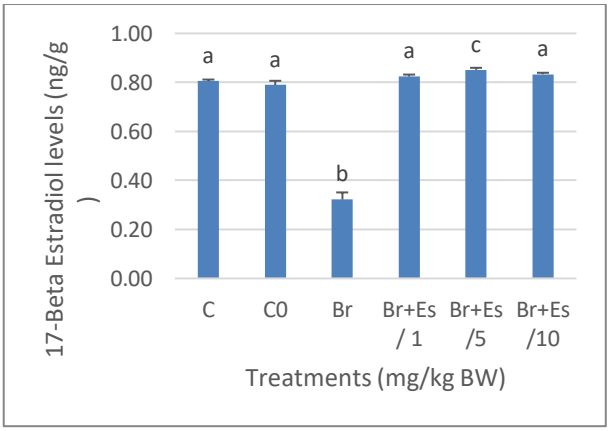
C نشان‌دهنده‌گروه کنترل دست نخورده، C0 نشان‌دهنده‌ی کنترل اتانول ۹۷۰، Br نشان‌دهنده‌ی کنترل بروموکریپتین، Es نشان‌دهنده‌ی داروی اس‌سیتالوپرام است که در سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شده است.



نمودار۲: تغییرات شاخص گنادوسوماتیک (GSI) در گروه های تیمار و کنترل (حروف مشابه به معنی عدم اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵ است)

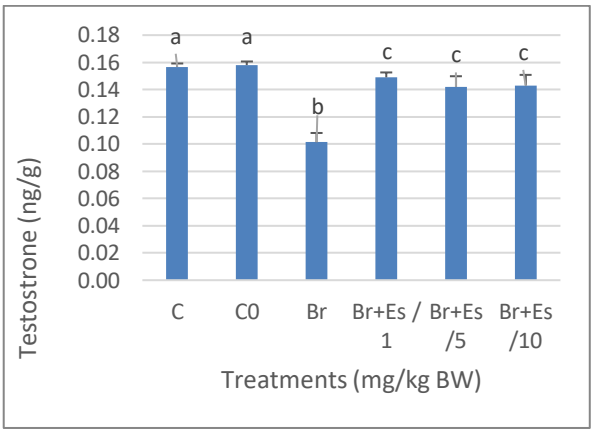
C نشان‌دهنده‌گروه کنترل دست نخورده، C0 نشان‌دهنده‌ی کنترل اتانول ۹۷۰، Br نشان‌دهنده‌ی کنترل بروموکریپتین، Es نشان‌دهنده‌ی داروی اس‌سیتالوپرام است که در سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شده است.

نتایج هورمون های ۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون و پروژسترون به شرح زیر است.



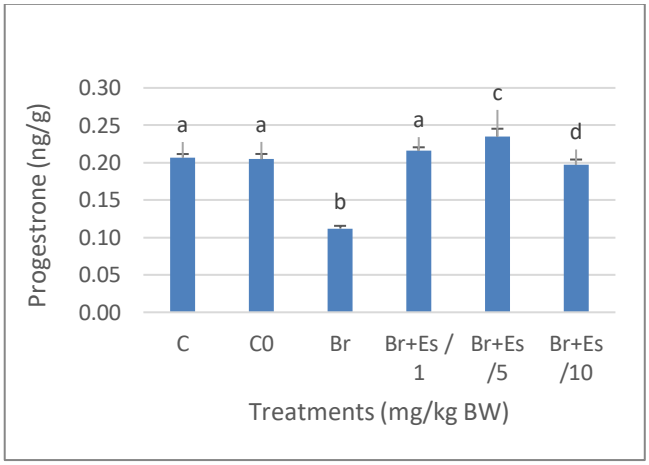
نمودار۳: تغییرات هورمون ۱۷-بتا استرادیول در تیمار های مختلف داروی اس‌سیتالوپرام در ماهی گورامی سه خال پس از مهار محور HPG (حروف مشابه به معنی عدم اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵است)

C نشان‌دهنده گروه کنترل دست نخورده، C0 نشان‌دهنده‌ی کنترل اتانول۹۷۰، Br نشان‌دهنده‌ی کنترل بروموکریپتین، Es نشان‌دهنده‌ی داروی اس‌سیتالوپرام است که در سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شده است.



نمودار ۴: تغییرات هورمون تستوسترون در تیمارهای مختلف داروی اس‌سیتالوپرام در ماهی گورامی سه خال پس از مهار محور HPG (حروف مشابه به معنی عدم اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵است)

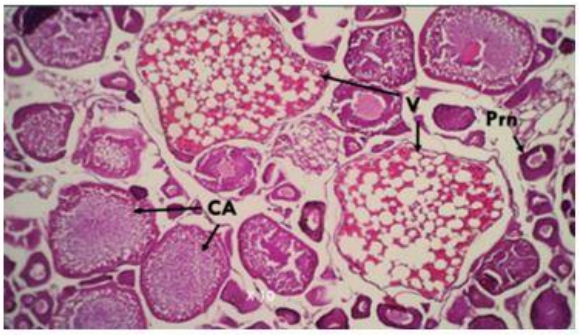
C نشان‌دهنده‌گروه کنترل دست نخورده، C0 نشان‌دهنده‌ی کنترل اتانول۹۷۰، Br نشان‌دهنده‌ی کنترل بروموکریپتین، Es نشان‌دهنده‌ی داروی اس‌سیتالوپرام است که در سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شده است.



نمودار۵: تغییرات هورمون پروژسترون در تیمارهای مختلف داروی اس‌سیتالوپرام در ماهی گورامی سه خال ماده پس از مهار محور HPG (حروف مشابه به معنی عدم اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵است)

C نشان‌دهنده‌گروه کنترل دست نخورده، C0 نشان‌دهنده‌ی کنترل اتانول۷۰٪، Br نشان‌دهنده‌ی کنترل بروموکریپتین، Es نشان‌دهنده‌ی داروی اس‌سیتالوپرام است که در سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شده است.

نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری در هر تیمار به شرح زیر است.



شکل۱: مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل صفر

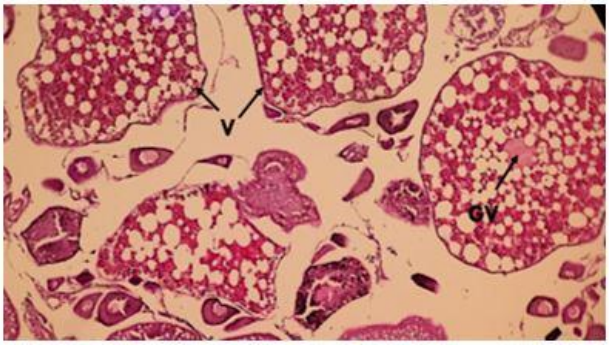
فاز غالب اووسیت ها در مرحله ی کورتیکال(CA)، تعدادی اوسیت در مرحله ی ویتلوژنز (V)، (H & E)، ۴۰×

شکل۲: مقطعی از بافت تخمدان ماهی گروه کنترل حلال (اتانول ۷۰٪)

فاز غالب اووسیت ها در مرحله کورتیکال، تعدادی اووسیت در مرحله پیش هستکی اولیه(Prn)، تعدادی اووسیت در مرحله ی ویتلوژنز(V)، (H&E)، ۴۰×

شکل۳: مقطعی از بافت تخمدان ماهی گروه بروموکریپتین

فاز غالب اووسیت ها در مرحله پیش هستکی ثانویه (Pon)، تعدادی اووسیت در مرحله پیش هستکی اولیه، (H & E)، ۴۰×

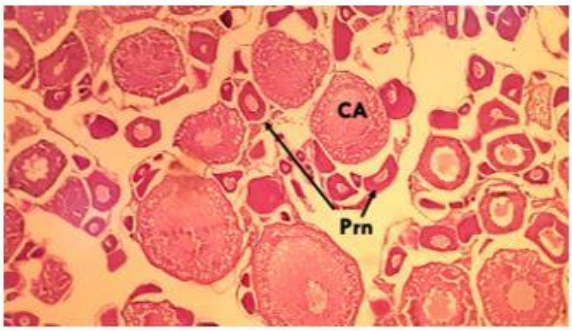


شکل۴: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن

اغلب اووسیت ها در مرحله ی ویتلوژنز (V) ، حرکت وزیکول زایا(GV) به سمت قطب جانوری، (H&E) ، ۴۰×

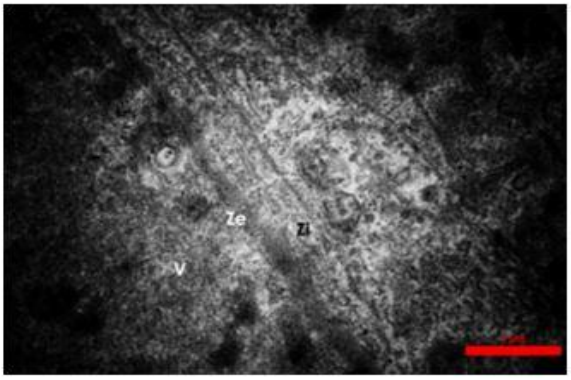
شکل۵: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن

اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنز، حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی (L)،(H&E)، ۴۰×



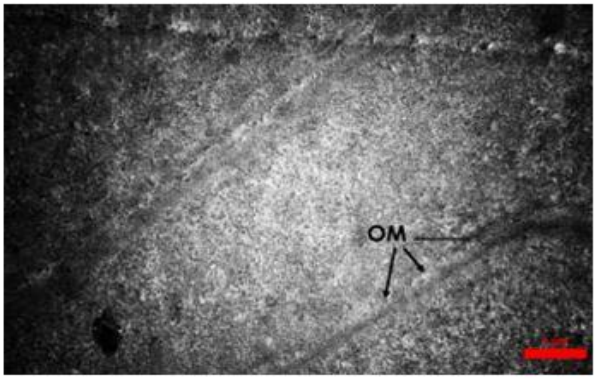
شکل۶: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن

حضور اووسیت‌ها در مرحله ی کورتیکال(CA)، حضور اووسیت ها در مرحله ی پیش هستکی اولیه(Prn)، (H&E)، ۴۰×



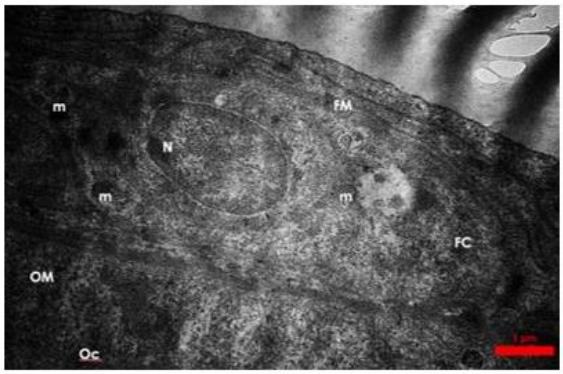
شکل۷: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در گروه کنترل دست‌نخورده

در این تصویر وزیکول(V) ، زونارادیاتای داخلی (Zi) ، زونارادیاتای خارجی (Ze) مشخص شده اند. (SCALE BAR:1µm)



شکل۸: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در گروه کنترل بروموکریپتین

در این تصویر غشای اووسیت (OM) مشخص شده است. (SCALE BAR:1µ)



شکل۹: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در تیمار بروموکریپتین و اس سیتالوپرام دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن

در این تصویر از داخل به خارج سلول اووسیت (OC) ، غشای اووسیت (OM) ، تعدادی میتوکندری(m)، هسته (N)، سلول فولیکولی(FC)، غشای فولیکول(FM) مشخص شده اند.(SCALE BAR:1µ)

مطالعه شاخص گونادوسوماتیک (GSI) که نسبت وزنی گناد به وزن کل ماهی است می‌تواند به عنوان شاخص تخم‌ریزی ماهی مطرح گردد و این تغییرات در ماهیان ماده معمولا بیشتر است. نتایج حاصل از شاخص گنادوسوماتیک حاکی از وجود اختلاف معنی دار میان گروه های تیمار دوز دوم اس‌سیتالوپرام و بروموکریپتین و گروه شاهد بروموکریپتین است ($P<0.05$). در گروه کنترل، میان گروه کنترل دست نخورده و کنترل حلال(تزریق با اتانول) اختلاف معنا داری از لحاظ شاخص گنادوسوماتیک و هپاتوسوماتیک وجود نداشت(نمودار۱ و ۲) و این موضوع بیانگر این است که حلال مورد استفاده تأثیری بر این شاخص‌ها ندارد. بررسی نتایج شاخص گنادوسوماتیک میان گروه کنترل بروموکریپتین و تیمارهای بروموکریپتین و اس‌سیتالوپرام نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معناداری دیده شد ($P<0.05$) که این مسئله بیانگر بلاک محور HPG توسط داروی بروموکریپتین است. با توجه به نتایج شاخص گنادوسوماتیک در تیمار دوز دوم داروی اس‌سیتالوپرام و بروموکریپتین شاخص گنادی در بیشترین مقدار خود می باشد (نمودار۲). علت بالا بودن شاخص گنادی در این تیمار را می توان چنین استدلال نمود که جذب زرده که یک گلیکولیپوفسفوپروتئین است و با تکامل تخمک به تدریج از طریق جریان خون وارد تخمک می‌شود و افزایش قطر تخمک را به همراه دارد. رشد اووسیت ها وابسته به جذب ویتلوژنین است ، که پیش‌ساز زرده می باشد. ویتلوژنین در پاسخ به هورمون ۱۷-بتا استرادیول در کبد سنتز می‌گردد. ویتلوژنین پس از اینکه از هپاتوسیت ها به جریان خون ترشح شد از طریق لایه های فولیکولی که اووسیت را احاطه نموده‌اند عبور می نماید. آن ها با تمایل بالا به رسپتور های ویتلوژنینی در سطح اووسیت ها متصل گردیده و از طریق پدیده ی اندوسیتوز به داخل سلول راه می یابد. مشاهده شده است که همزمان با افزایش قطر فولیکول ها، جذب ویتلوژنین نیز افزایش می‌یابد (Redding *et al.*, 2000). مطالعات بر روی ماهی کپور دریای خزر *Cyprinus carpio* نشان داده که افزایش وزن گناد با افزایش مقدار هورمون‌های استروئیدی مرتبط است. این امر به علت افزایش ویتلوژنین در گناد است (Imanpour & Safari, 2009). ترشح گنادوتروپین توسط هیپوفیز شرط لازم برای بلوغ اووسیت ها و اوولاسیون می باشد (Scott *et al.*,1983).

برای بررسی اثرات هر عامل داخلی و یا خارجی مؤثر بر روند بلوغ از شاخص هایی نظیر HSI وGSI استفاده می شود. نتایج حاصل از شاخص هپاتوسوماتیک حاکی از عدم وجود اختلاف معنادار بین گروه کنترل دست نخورده و تزریق با اتانول بود ($P>0.05$)، که این مسئله نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر حلال مورد استفاده بر این شاخص است. در گروه تیمار اس سیتالوپرام و بروموکریپتین در دوز دوم (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) اختلاف معناداری با گروه کنترل بروموکریپتین دارد ($P<0.05$) (نمودار ۱). تحقیقات بر روی نوعی تاس ماهی چینی Acipenser sinensis ،حاکی از افزایش HSI در تیمارهای مواجه شده با فلوکستین دارد که داروی دیگری از دسته‌ی SSRI هاست (Chen, 2017). با شروع رسیدگی جنسی که مصادف با زرده سازی با

منشأ کبدی است، سطوح پلاسمایی استرادیول و ویتلوژنین به همراه درصد HSI به تدریج رشد می‌کند و به اوج خود می رسد، لذا از این متغیرها می توان برای اثبات بلوغ گنادی استفاده نمود(Pham *et al.*, 2010).

مطالعه‌ی تغییرات هورمونی و بیوشیمیایی نظیر تغییر در سطوح هورمون های جنسی از جمله موارد مرتبط با فیزیولوژی تولید مثل است که نقش مهمی در مطالعات پایه و کاربردی در این زمینه دارد (وهاب‌زاده و همکاران،۱۳۹۶).

نتایج حاصل از سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول در میان گروه کنترل بروموکریپتین و گروه های تیمار اس سیتالوپرام و بروموکریپتین بیانگر وجود اختلاف معنادار بود($P<0.05$)(نمودار۳). پایین بودن این هورمون در تیمار بروموکریپتین نشان-دهنده‌ی بلاک محور HPG توسط داروی بروموکریپتین است. مشاهده شده است که با تزریق بروموکریپتین و آپومورفین که هر دو داروهای آگونیست دوپامین هستند، به ماهی Carassius auratus کاهش غلظت سرمی GTH و در نتیجه کاهش ۱۷-بتااستراديول رخ داده است (Chang *et al.*,1984). در گروه کنترل میان گروه کنترل دست نخورده و گروه دریافت کننده ی حلال اتانول، اختلاف معناداری وجود نداشت ($P>0.05$)، که این مسئله نشان‌دهنده‌ی این است که حلال مورد استفاده اثری بر سطح این هورمون ندارد. در گروه های دریافت کننده ی داروی اس‌سیتالوپرام و بروموکریپتین در دوز دوم (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی) اختلاف معناداری با گروه کنترل دست نخورده و حلال دیده شد ($P<0.05$) که نشان‌دهنده‌ی امکان حضور گیرنده‌ی سروتونین تحریکی در سطوح پایینی محور HPG است، علاوه بر آن امکان وجود مسیر دیگری نیز در مغز که با افزایش سروتونین منجر به افزایش سطح این هورمون شده باشد وجود دارد(نمودار۳). تحقیقات بر روی انسان نشان داده است که داروی سرترالین و فلوکستین باعث افزایش هورمون استرادیول شده و در دوز های بالاتر اثرات آنتی استروئیدال دارد (Pop *et al.*, 2015). تحقیقات گذشته بر روی میمون، نیز نشان داده است که داروی اس سیتالوپرام منجر به افزایش سطح هورمون استرادیول می شود (Bethea *et al.*, 2011). تغییر در سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول با رشد اووسیت ها در تخمدان و افزایش شاخص گنادی ارتباط دارد (Lee & Yang, 2002). در مطالعات گذشته تجویز این دو دارو به صورت همزمان بررسی نشده بود ، اما در مطالعه حاضرتاثیر همزمان این دو دارو بررسی گردید.

نتایج مربوط به تغییرات هورمون تستوسترون در تیمارهای مختلف داروی اس‌سیتالوپرام بین کنترل دست نخورده و تزریق با اتانول اختلاف معناداری وجود نداشت ($P>0.05$) که این مسئله نشان دهنده‌ی این است که حلال مورد استفاده اثری بر سطح این هورمون ندارد. در گروه های تیمار اس سیتالوپرام و بروموکریپتین اختلاف معناداری با گروه کنترل وجود داشت ($P<0.05$) که این مسئله نشان دهنده‌ی تبدیل زیاد تستوسترون به ۱۷-بتا استرادیول توسط آنزیم آروماتاز است که باعث کاهش سطح تستوسترون نسبت به گروه کنترل شده است(نمودار۴). تحقیقات بر روی ماهی ماده *Carassius auratus*، نشان داد که

داروی فلوکستین که یک داروی SSRI است، باعث کاهش سطح تستوسترون نسبت به گروه کنترل در این جنس شد و فعالیت آنزیم آروماتاز را تشدید کرد که با نتایج حاضر همخوانی دارد(Mennigen *et al.*, 2017).

هورمون پروژسترون القاکننده ی بلوغ نهایی اووسیت است به طوری که بیشترین مقدار آن هم زمان با تجزیه‌ی هسته‌ی زاینده، به هم پیوستن قطرات چربی و حل شدن دانه ای زرده مشاهده گردید (Ortiz *et al.*, 2008). نتایج حاصل از تغییرات هورمون پروژسترون در تیمارهای مختلف داروی اس‌سیتالوپرام نشان‌گر وجود اختلاف معنادار بین گروه کنترل بروموکریپتین و تیمار بوده است ($P<0.05$)، که نشان‌دهنده ی بلاک مسیر HPG توسط داروی بروموکریپتین است در صورتی‌که میان گروه های کنترل دست-نخورده و تزریق با اتانول اختلاف معناداری وجود نداشت ($P>0.05$)، این مسئله بیانگر عدم تأثیر حلال مورد استفاده بر سطح این هورمون بود. در مقایسه، میان گروه های تیمار و کنترل، دوز دوم اس سیتالوپرام و بروموکریپتین اختلاف معناداری با گروه کنترل نشان داد ($P<0.05$)، که این مسئله بیانگر این بود که امکان حضور گیرنده ی سروتونین از نوع تحریکی در سطوح پایینی محور HPG وجود دارد(نمودار ۵). تحقیقات بر روی Rat ماده نشان داده است که درمان کوتاه مدت با داروی فلوکستین که یک SSRI است، غلظت پروژسترون را در جنس ماده افزایش می دهد (Fry *et al.*, 2014). این دارو در ماهی یال اسبی ژاپنی *Trichiurus lepturus* نیز منجر به افزایش شدید هورمون های جنسی می‌شود (Foran *et al.*, 2004). به طور کلی داروهای دیگر در دسته‌ی SSRIها نیز منجر به افزایش سطح هورمون های جنسی می شود، اما مکانیسم دقیق آن مشخص نیست.

ریخت سنجی بافتی به اندازه گیری بافت ها و اجزای مختلف موجود در آن می پردازد و در حقیقت محاسبه کمی تغییرات بافت ها و اجزای تشکیل دهنده ی آن ها را با استفاده از تصاویر دوبعدی ممکن می سازد (Clemens *et al.*, 2015). تصاویر میکروسکوپ نوری نشان داد که در گروه کنترل دست نخورده، اغلب اووسیت ها در مرحله ی کورتیکال و پیش هستکی به سر می‌برند. تعدادی اووسیت در مرحله ی ویتلوژنز به سر می برند و زرده جذب کرده اند (شکل۱). در گروه کنترل حلال(اتانول ۷۰º) نیز اووسیت ها عمدتا در مرحله ی کورتیکال و پیش هستکی هستند. به طور کلی تفاوتی با گروه کنترل دست‌نخورده مشاهده نشد، که یعنی اتانول اثری بر بافت تخمدان ندارد (شکل۲). داروی بروموکریپتین باعث مهار مسیر HPG از طریق مغز شده و اغلب اووسیت ها در مرحله ی پیش هستکی اولیه مانده اند. تعدادی اووسیت در مرحله ی پیش هستکی ثانویه هستند (شکل۳). در دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی از داروی اس‌سیتالوپرام به همراه داروی بروموکریپتین، اغلب اووسیت‌ها در مرحله ی ویتلوژنز هستند و آغاز مرحله ی بلوغ و شروع حرکت زایا به سمت قطب جانوری بوده است و تعدادی اووسیت در مرحله ی پیش هستکی اولیه هستند (شکل۴). داروی اس سیتالوپرام در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پس از مهار مسیر HPG به وسیله داروی بروموکریپتین، قادر به تحریک دوباره ی تخمدان است و اغلب اووسیت ها در مرحله‌ی ویتلوژنز به سر می‌برند. در ضمن حرکت زایا به سمت قطب جانوری نیست و تعدادی اووسیت در مرحله ی کورتیکال نیز به چشم می‌خورد

(شکل۵). داروی اس سیتالوپرام در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پس از مهار HPG توسط داروی بروموکریپتین قادر به تحریک تخمدان نیست و اغلب اووسیت ها در مرحله‌ی پیش هستکی اولیه و ثانویه مانده اند، و تعدادی از اووسیت ها در مرحله ی کورتیکال هستند (شکل۶). نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد دولایه اووسیت به صورت زاویه دار قرار گرفته است و این به معنی عدم رشد اووسیت است (شکل ۸). نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی در تیمار دوز دوم اس-سیتالوپرام و بروموکریپتین نفوذ زرده از طریق غشا دیده می شود و غشای اووسیت بسیار فعال است (شکل۹).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به داده های به دست آمده در این پژوهش و با توجه به آنالیز داده ها در تجویز داروی بروموکریپتین برای بلاک کردن مسیر HPG و سپس بررسی عملکرد داروی سروتونرژیک اس سیتالوپرام، می توان نتیجه گرفت امکان حضور گیرنده ی سروتونین از نوع تحریکی در بخش های پایینی محور HPG (گناد) وجود دارد که این نوع از گیرنده می تواند برای مقاصد دارویی در بارور کردن جنس ماده و یا سایر اهداف دارویی مورد توجه قرار گیرد. اثبات حضور این نوع از گیرنده و طریقه ی عملکرد دقیق آن احتیاج به مطالعات بیشتری دارد. همچنین می توان با استفاده از داروهای تحریک کننده ی سیستم سروتونینی (داروهای SSRI) با دوز مناسب در بیماران مبتلا به فیبرومیالژیا و سایر بیماران دریافت کننده ی داروهای دوپامینرژیک، اختلالات جنسی در این افراد را بهبود بخشید.

منابع

Bagheri Ziari, S., Naji, T., Hosseinzade Sahafi, H. (2015). Comparison and evaluation the ultra-structural changes in the oocyte and pituitary in immature *Trichogaster trichopterus* treated with RH-A2, 17beta-estradiol and hydroalcoholic extract of air branch of *Origanum vulgare*. Nova Biological Reperta, 2(2): 131-139.

Bethea, C. L., Lima, F. B., Centeno, M. L., Weissheimer, K. V., Senashova, O., Reddy, A. P., Cameron, J. L. (2011). Effects of citalopram on serotonin and CRF systems in the midbrain of primates with differences in stress sensitivity. Journal of chemical neuroanatomy, 41(4): 200-218.

Bhattarai, J. P., Roa, J., Herbison, A. E., Han, S. K. (2014). Serotonin acts through 5-HT1 and 5-HT2 receptors to exert biphasic actions on GnRH neuron excitability in the mouse. Endocrinology, 155(2): 513-524.

Chang, J. P., Peter, R. E., Nahorniak, C. S., Sokolowska, M. (1984). Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. General and Comparative Endocrinology, 55(3): 351-360.

Chen, H., Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Yang, B., Zhao, J., ... Zhang, Q. (2018). Effects of acute and chronic exposures of fluoxetine on the Chinese fish, top mouth gudgeon Pseudorasbora parva. Ecotoxicology and Environmental Safety, 160:104-113.

Clemens, B. J., van de Wetering, S., Sower, S. A., Schreck, C. B. (2013). Maturation characteristics and life-history strategies of the Pacific lamprey, Entosphenus tridentatus. Canadian Journal of Zoology, 91(11): 775-788.

Davis, L. M., Michaelides, M., Cheskin, L. J., Moran, T. H., Aja, S., Watkins, P. A., Wang, G. J. (2009). Bromocriptine administration reduces hyperphagia and adiposity and differentially affects dopamine D2 receptor and transporter binding in leptin-receptor-deficient Zucker rats and rats with diet-induced obesity. Neuroendocrinology, 89(2): 152-162.

Foran, C. M., Weston, J. J., Slattery, M., Brooks, B. W., Huggett, D. B. (2014). Reproductive assessment of Japanese medaka following a four week fluoxetine exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.53(20):43-47.

Fry, J. P., Li, K. Y., Devall, A. J., Cockcroft, S., Honour, J. W., Lovick, T. A. (2014). Fluoxetine elevates allopregnanolone in female rat brain but inhibits a steroid microsomal dehydrogenase rather than activating an aldo-keto reductase. British journal of pharmacology, 171(24): 5870-5880.

Greenberg, N., and Wingfield, J. C. (1987). Stress and reproduction: reciprocal relationships. In Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles. Springer, Boston, MA. 8(65): 461-503.(

Hismayasari, I. B., Marhendra, A. P. W., Rahayu, S., Saidin, S. D., Supriyadi, D. S. (2015). Gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and proportion of oocytes stadia as an indicator of rainbowfish Melanotaenia boesemani spawning season. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2(5): 359-362.

Imanpour, M. R., and Safari, R. G (2009). Effect of maturation stages on gonadal indices and chemical composition of gonad in Cyprnius carpio (*Cyprinidae*). Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 16(1): 35-41.

Jacobsen, N. W., Hansen, C. H., Nellemann, C., Styrishave, B., Halling-Sørensen, B. (2015). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on three sex steroids in two versions of the aromatase enzyme inhibition assay and in the H295R cell assay. Toxicology in vitro Journal, 29(7): 1729-1735.

Lee, W. K., and Yang, S. W. (2002). Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). Aquaculture, 207(1-2): 169-183.

Liu, X., and Herbison, A. E. (2013). Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. Endocrinology, 154(1): 340-350.

Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes & development, *9*(18): 2266-2278.

Melis, M. R., and Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 19(1): 19-38.

Mennigen, J. A., Zamora, J. M., Chang, J. P., Trudeau, V. L. (2017). Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 202:70-78.

Ortiz-Delgado, J. B., Porcelloni, S., Fossi, C., Sarasquete, C. (2008). Histochemical characterisation of oocytes of the swordfish *Xiphias gladius*. Scientia Marina journal 72(3): 549-564.

Pham, H. Q., Kjørsvik, E., Nguyen, A. T., Nguyen, M. D., Arukwe, A. (2010). Reproductive cycle in female Waigieu seaperch (Psammoperca waigiensis) reared under different salinity levels and the effects of dopamine antagonist on steroid hormone levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 383(2): 137-145.

Pop, A., Lupu, D. I., Cherfan, J., Kiss, B., Loghin, F. (2015). Estrogenic/antiestrogenic activity of selected selective serotonin reuptake inhibitors. Clujul Medical Journal, 88(3): 381.

Redding, J. M., and Patino, R. (2000). Reproductive systems. In The laboratory fish. Academic Press.5:43-59.

Soltani,,M., Beigi,R., Rezvani,R., Mohammad Reza Mehrabi,MR., Chitsaz,H. (2001). Study of anesthetic effects of essential oil and clove extract in rainbow trout under some water quality conditions. Journal of veterinary Research, Issue 4 (224):85-89.

Scott, A. P., Sumpter, J. P., Hardiman, P. A. (1983). Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). General and Comparative Endocrinology, 49(1):128-134.

Swanson, P. (1994). Regulation of gametogenesis in fish by gonadotropins. In High Performance Fish. Proceedings of an International Fish Physiology Symposium. 5(1):130-136.

Vahabnezhad, A., Taghavimotlagh, S. A., Ghodrati Shojaei, M. (2017). Growth pattern and reproductive biology of Acanthopagrus latus from the Persian Gulf. Survey in Fisheries Sciences, 4(1): 18-28.

Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C. E., Fuda, H., Krsmanovic, L. Z., Catt, K. J. (2006). Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neuro-secretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. Molecular Endocrinology, 20(1):125-135.

Effects of Escitalopram on sex steroids and oocyte ultrastructure in three spot Gourami after increasing Dopamine level By Bromocriptine injection

M. S. Hosseini Jebeli[1], T. Naji[1*], H. Hosseinzadeh Sahafi[2]

Received:2019.12.25
Accepted:2020.12.16

Abstract

Studies have shown that understanding the pathways of action of neurotransmitters is of particularly important. Dopamine is a neurotransmitter effects on the D2 receptor in the brain and leads to Hypothalamus-Pituitary-Gonad (HPG) blocking and sexual disorders. In this study, the effect of serotonergic drug escitalopram on the reproductive system of three spot gourami after dopamine induction with bromocriptine injection was studied. For this purpose, 90 pieces of three spot Gourami fish with an average weight of 3±1 gr were bought from the Khanmahi fish breeding center. The fish were divided into 6 groups: Intact Control group, solvent of bromocriptine (Ethanol 70º) for control group, and 3 treatment groups received bromocriptine and escitalopram in three doses of 1,5 and 10 mg/kg.bw. The injection were given intramuscular (IM) every other day. The experiments were repeated 3 times. The fish were dissected and the ovarian tissue removed from the body for light and electron microscopy. After preparing tissue fluids, steroid hormones were measured by Elisa method. According to the results obtained from 5 mg / kg body weight of fish from using escitalopram with bromocriptine treatment, which in the predominant stage of Vitellogenesis and gonadosomatic index and steroid hormones were at their highest. It can be concluded that the presence of serotonin receptors is possible in the lower levels of the HPG axis. This type of receptor could be studied in the future as a medicinal perpose for female fertilization.

Keywords: *Ovary, Dopamine, Serotonin, Gonadotropin*

1- Department of Basic sciences, Faculty of Pharmacy & Pharmaceutical, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*(Corresponding author: naji_t@iaups.ac.ir tnaji2002@gmail.com)
2- Department of Aquatic Animal Health, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۱۴۶-۱۶۷
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 146-167
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2020.32409.1377

بررسی پیش‌تیمار کروناتین بر تنش ناشی از نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون بر گیاه سویا

شهلا هاشمی شهرکی[۱]، فرشته محمدحسنی‌جور[۲*]

چکیده

سنتز نانوذرات توسط روش سبز، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. در پژوهش حاضر، سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره زیتون انجام گرفت. ویژگی مورفولوژیکی و ساختاری نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط اسپکتروفتومتر UV-TEM, visible آنالیز شدند. اسپکتروفتومتر UV visible با TEM روش‌های متفاوتی هستند. سپس، اثر نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm با پیش‌تیمار کروناتین (صفر و ۵۰ نانومولار) بر پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید و آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (ASP)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) بررسی شدند. سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره‌ی زیتون با ماکزیمم جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر و تصویر میکروسکوپ عبوری، اندازه میانگین ذرات ۴۱ نانومتری را تایید کرد. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون، ذرات کروی شکل هستند. بررسی نانوذرات اکسیدروی بر گیاه سویا نشان داد که در غلظت ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی، فعالیت آنزیم ASP PAL، SOD، پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید افزایش می‌یابد. مالون دآلدئید در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسید روی تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما فعالیت آنزیم SOD افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. پیش تیمار کروناتین باعث بهبود تنش‌های ایجاد شده در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی شد و منجر به کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید گردید اما کروناتین در غلظت ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسید باعث افزایش این محتوا شد.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، کروناتین، مالون دآلدئید، نانوذرات اکسید روی

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*(نویسنده مسئول: fereshtehmhasani@yahoo.com)

مقدمه

نانوذرات دارای ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیزوری متفاوتی نسبت به درشت مولکول‌ها هستند. امروزه نانوذرات به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان توجه بسیاری از افراد از جمله محققان و صنعتگران و.. را به خود جلب کرده است و تلاش‌های بسیاری برای تولید نانوذرات از روش‌های مختلف و مصارف گوناگون آن در قسمتهای صنعتی شده است (Jain *et al*., 2009). بنابراین مقدار زیادی از نانوذرات وارد محیط شده است و گیاهان موجود در محیط را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند. نانوذرات در گونه‌های مختلف گیاهان اثرهای متفاوتی دارد (Zhu *et al*., 2008). در گزارشات محدودی مبنی بر تأثیر مثبت نانوذرات بر رشد برخی از گیاهان از جمله بادام زمینی (Prasad *et al*., 2012) ، نخود (Pandey *et al*., 2010) وجود دارد. نهال‌های یک ساله نوعی کاج (*Larix elgensis*) به مدت ۶ ساعت در غلظت‌های ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر نانو دی اکسید سیلیسیم (SiO_2) قرار داده شدند. تیمار دی اکسید سیلیسیم (SiO_2) رشد و کیفیت نهال‌ها را به شدت بهبود بخشید. تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر بهترین نتیجه را داد که در آن متوسط ارتفاع ۴۲/۵ درصد، قطر ریشه ۳۰/۷ درصد، طول ریشه‌ی اصلی ۱۴ درصد بود و تعداد ریشه‌های جانبی نهال‌ها ۳۱/۶ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافت. همچنین در تیمار ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر دی اکسید سیلیسیم، بالاترین غلظت کلروفیل را نشان داد (Lin *et al*., 2004).

برخی گزارشات اثر بازدارندگی اکسیدروی در مراحل نموی گیاهان نظیر جوانه‌زنی و طویل شدن ریشه را نشان دادند (Lin & Xing, 2007). در تحقیقی اثر چهار نانوذره Al_2O_3، SiO_2، Fe_3O_4 و ZnO با سه غلظت ۴۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر روی گیاه *Arabidopsis thaliana* بررسی شد. در بین نانوذرات مورد مطالعه، نانوذرات ZnO اثر مهار جوانه زنی بیشتری نسبت به نانوذرات دیگر داشت (Lee *et al*., 2010). همچنین نانوذرات Fe_3O_4 و ZnO اثرات بازدارندگی بر طول ریشه‌چه نشان دادند درحالی‌که نانوذرات Al_2O_3 و SiO_2، تأثیر مثبت بر طول ریشه‌چه نشان داشتند. Boonyanitipong و همکاران (۲۰۱۱) غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسیدروی و دی اکسید تیتانیوم را بر جوانه‌زنی بذر برنج آزمایش کردند و اظهار داشتند که هیچ یک از نانوذرات، درصد جوانه‌زنی را کاهش ندادند ولی نانوذرات اکسیدروی طویل شدن ریشه و تعداد ریشه را کاهش داد، در حالی که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم اثر بازدارندگی بر طویل شدن ریشه نداشت. Khodakovskaya و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که نانو لوله‌های کربنی در غلظت ۴۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر جوانه‌زنی و رشد گوجه فرنگی را افزایش داد که احتمالاً این امر در اثر توانایی نانو لوله‌های کربنی برای نفوذ به پوسته بذر و تحریک جذب آب می‌باشد. در تحقیقاتی نشان داده شده است که نانوذرات مس برای گیاه ماش و گندم سمی بوده و کاهش سرعت رشد گیاهچه را باعث شد. ماش حساس‌تر از گندم است که این تفاوت را به آناتومی و ساختار ریشه نسبت داده‌اند. همچنین نانوذرات نقره در غلظت‌های کم (کمتر از ۱ ppm) می‌تواند برای گیاهچه های *Arabidopsis thaliana* سمی باشد و به طور آشکاری رشد را متوقف کند (Lee et al., 2008). گزارش‌ها اظهار کردند که اثرات منفی نانوذرات می‌تواند به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان باشد (Shaw & Hossain,

2013). گیاهان برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد چندین مکانیسم دفاعی دارند. چندین سیستم اصلی آنزیمی جاروب کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مکان‌های تولید در گیاه وجود دارد. این سیستم‌ها عبارتند از: آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز (Abdul Jaleel *et al*., 2009). آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی، مولکول‌هایی با وزن ملکولی پائین می‌باشند که هر یک دارای ساختار و خصوصیات شیمیایی خاص است و محل قرار گیری آن‌ها نیز متفاوت می‌باشد. این ترکیبات به‌واسطه‌ی دادن الکترون یا هیدروژن نقش اساسی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد دارند (Abdul Jaleel *et al*., 2009). آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- آنتی‌اکسیدان‌های غشایی محلول در چربی نظیر α توکوفرول، کاروتنوئید و گزانتوفیل

۲- آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب نظیر گلوتاتیون، آسکوربات و ترکیبات فنلی (Sanchez-Viveros *et al*., 2010).

استفاده از هورمون‌های گیاهی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. در سال‌های اخیر محققین با مطالعه‌ی مکانیسم اثر باکتری‌ها و قارچ‌ها بر گیاهان، موادی را شناسایی کرده‌اند که بدلیل اثرات آنها بر رشد و سایر پارامتر های گیاه از آنها به‌عنوان تنظیم کننده های رشد جدید یاد می‌کنند. کروناتین از جمله این ترکیبات جدید است که در افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها نقش دارد. مطالعات نشان می‌دهند کروناتین مشابه با جاسمونات اثرات حفاظتی خوبی برای گیاهان علیه تنش‌های محیطی دارد. جاسمونات‌ها معمولاً با تنظیم واکنش‌های اکسیداتیو و القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تنش‌ها عمل می‌کند. Jung (۲۰۰۴) معتقد است فعالیت اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در آرابیدوپسیس در پاسخ به متیل جاسمونات افزایش می‌یابد (Jung, 2004). کروناتین اثرات فیزیولوژیکی مختلفی بر بافت‌های مختلف گیاه دارد و این اثرات در تک لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای ها متفاوت است. گزارشات متعددی نشان می‌دهند کروناتین در پاسخ به تنش در حمله پاتوژن‌ها و علف خوارها نقش دارد و این مؤید این مطلب است که این ترکیب، پاسخ گیاهان در برابر تنش‌های محیطی را واسطه‌گری می‌نماید. کروناتین بر تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند پتروکارپان گلیسئولین، ساخارانتین، مامی لاکتون A، آلکالوئیدها، مواد فرار و تاکسول تأثیر می‌گذارد (Mithofer *et al*., 2005)؛ این ترکیب همچنین می‌تواند تجمع مهارکننده‌های پروتئیناز همراه با علف خواری و بیان ژن های اختصاصی مربوط به پاسخ جاسمونات JIP را در گیاه جو تحت تنش اسمزی افزایش دهد.

Yan و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند کروناتین، مقاومت گیاهچه ارزن به تنش کم آبی را افزایش می‌دهد (Yan *et al*., 1999). علاوه بر این غلظت ۰/۲ نانومولار کروناتین محتوای آب برگی (RWC) در برگ گیاهچه‌های ذرت را افزایش داده است. گزارشاتی مبنی بر اثر کروناتین بر بهبود مقاومت یا تحمل گیاهان در برابر تنش ها مانند بیماری‌ها در شب بو ، خشکی در ذرت (Wang *et al*., 2008) و برنج (Ai *et a*l., 2008) وجود دارد. اکثر محققین پیشنهاد کرده‌اند کروناتین از طریق القای

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و فعال کردن سیستم هضم رادیکال آزاد مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها را افزایش می‌دهند. Xia و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که کروناتین از طریق بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت هضم رادیکال‌های DPPH سمیت و تنش ناشی از شوری در پنبه را بهبود می‌بخشد (Xie *et al.*, 2008). این ترکیب پیچیده با برخی هورمون ها از جمله جاسمونات شباهت زیادی دارد (Feys *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 1999). برخی محققین معتقدند کروناتین از طریق اثر بر القای مسیر سیگنالی جاسمونات در گیاهان عمل می‌نماید (Zhao *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2005). کاربرد بیرونی JA، MeJA و یا OPDA (پیش ساز بلافاصل جاسمونیک اسید یعنی ۱۲- اگزو فیتودی انوئیک اسید) بیوسنتز یکسری پروتئین ها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه را افزایش می‌دهد که اغلب این ترکیبات در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Mithofer *et al.*, 2005). مطالعات نشان می‌دهند کاربرد بیرونی کروناتین نیز موجب تولید ترکیب پیچیده‌ای از مواد فرار در گیاه می‌گردد که هم کمیت و هم کیفیت بالاتری نسبت به کاربرد تنهایی JA و OPDA دارد (Boland *et al.*, 1995). علاوه بر این مطالعات برخی محققین در گیاه برنج نشان می‌دهد کروناتین در تحریک پیری و تولید متابولیت‌های ثانویه مشابه با جاسمونات عمل می‌کند. یکی از این متابولیت‌ها ترکیبات ضد قارچی فیتوآلکسین‌ها مانند مامی لاکتون A و B، اریزالکسین A و ساخارانتین می باشند (Tamogami *et al.*, 1997). اثر کروناتین در تخفیف برخی تنش های محیطی از جمله شوری، خشکی، سرما و یخزدگی در برخی گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Wang *et al.*, 2008). گزارشات حاکی از این مورد است که تا حدی کروناتین توانسته اثرات منفی تنش‌های محیطی را کاهش دهد (Wang *et al.*, 2008) ولی اثر آن بر کاهش تنش ناشی از نانوذرات اکسیدروی هنوز بدون پاسخ مانده است. بنابراین هدف این تحقیق، بررسی تیمار کروناتین بر تنش ناشی از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره زیتون در گیاه سویا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره برگ‌های زیتون

تهیه عصاره برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون از گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع آوری شدند. برگ‌ها دو بار با آب برای حذف ذرات گرد و غبار و آلودگی شسته شدند. ۱۰ گرم از برگ‌ها توزین و پس از قطعه قطعه شدن در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر قرار داده شدند. به ارلن، ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و ارلن بر روی دستگاه هیتر استیرر با دمای ۸۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، محتویات ارلن سرد و سپس از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شدند. عصاره به‌دست آمده داخل شیشه های تیره داخل یخچال برای ادامه آزمایش قرار گرفتند.

تهیه نانوذرات اکسیدروی

مقادیر ۸۰ میلی‌لیتر از عصاره در داخل بشر روی هیتر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۵ گرم نمک نیترات روی به عصاره ها اضافه شد و روی هیتر که قبلا در دمای هیتر استیرر در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد (سرعت rpm ۴۰۰ استیرر) به‌مدت نیم ساعت تنظیم گردیده بود، قرار داده شدند. بعد از این مدت زمان، مخلوط واکنش حالت خمیری پیدا کرده، خمیر بدست آمده در داخل آون در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط بدست آمده به‌وسیله هاون چینی پودر شد و پودر حاصل برای خالص‌سازی ۳ بار سانتریفوژ گردید و سپس برای تعیین مشخصات آماده گردید.

آماده سازی نمونه برای طیف سنجی فرابنفش/مرئی (UV-visible)

برای طیف سنجی فرابنفش/مرئی ۰/۱ گرم پودر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاهان زیتون را به طور جداگانه با ۳ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کردیم و با توجه به اینکه نانوذرات اکسیدروی دارای پیک حداکثر در محدوده ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر می‌باشد، جذب آن در طول موج‌های ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر برای بررسی بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی اندازه‌گیری گردید. سپس نمودارهای طیف جذبی نمونه‌های مورد مطالعه توسط نرم افزار اکسل رسم گردید.

بررسی تصویر نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

نمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۵ دقیقه با ریتم خاموش/روشن ۱۵ به ۱۵ ثانیه با امواج فراصوت تیمار شدند و سپس بر روی گرید میکروسکوپ قرار گرفته و تصاویر با بزرگ‌نمایی‌های در مقیاس متفاوت گرفته شد. میکروسکوپ‌های استفاده شده در این پژوهش Philips، Carl zeiss و مدل LE0912-AB ساخت شرکت آلمان بود.

مطالعه اثر نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون در گیاهان سویا همراه با پیش تیمار کروناتین

بعد از سنتز نانوذرات و تعیین مشخصات فیزیکوشیمیایی، مطالعه اثر نانوذرات بر روی پارامترهای پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید و برخی از آنزیم‌های گیاه سویا بررسی شد. نمونه بذرهای سویا (*Glycine max*) از شرکت بذر اهواز تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

پیش تیمار دانه های سویا با کروناتین

بذرهای سویا پس از ضدعفونی با وایتکس ۳۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس دانه‌های ضدعفونی شده سویا به پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی انتقال داده شدند و داخل این پتری دیش‌ها ۲۰ میلی لیتر

آب مقطر (به‌عنوان شاهد) و ۲۰ میلی لیتر کروناتین ۵۰ نانومولار ریخته شد. دانه‌های سویا به‌مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار کروناتین و آب مقطر بودند و هر روز کاغذ صافی و محلول تعویض شد. بعد از این مدت، دانه‌های جوانه زده داخل پتری دیش های جدید حاوی کاغذ صافی انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت گیاهچه ها با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر آبیاری شدند.

تیمار گیاهچه های سویا توسط نانوذرات سنتز شده اکسیدروی

به‌منظور تیمار، گیاهچه‌ها به شیشه‌هایی به ابعاد ۱۰×۸ سانتی‌متر حاوی آگار، محلول هوگلند ۵۰ درصد و نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون در غلظت‌های مختلف ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm انتقال داده شدند. سپس شیشه ها به اتاق کشت با شرایط کشت ۱۶ ساعت روشنایی (دما $28^{\circ}C$) و ۸ ساعت تاریکی (دما $22^{\circ}C$) انتقال داده شدند. بعد از یک هفته گیاهان به لیوان‌های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه منتقل شدند. به مدت یک ماه گیاهان داخل شرایط گلخانه نگهداری و هر هفته ۳ بار تنها با محلول هوگلند آبیاری شدند. بعد از یک ماه گیاهان برای سنجش جمع‌آوری شدند.

پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند، اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری مالون دآلدئید (MDA) با توجه به روش Packer وHeath (۱۹۶۹) اندازه-گیری شد. ۰/۲ گرم از بافت فریزشده برگ، وزن و با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه عصاره ی حاصل در دور ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۴ میلی لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید(TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، به یک میلی لیتر از محلول روئی حاصل از سانتریفوژ، اضافه شد. مقدار مالون دآلدئید بر حسب نانومول بر گرم وزن‌تر بیان شد. اندازه‌گیری محتوای پراکسید هیدروژن بر طبق روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. طبق این روش، ابتدا برگ گیاه با محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در حمام یخ سائیده شد و سپس بمدت ۱۵ دقیقه عصاره در سانتریفوژ یخچال دار (Centrifuge 5804R, Germany) از شرکت Eppendorf، در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم با روش اسپکتروفتومتری

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

به‌این منظور یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۲ ساییده شد که شامل اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و

پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر طبق روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) و براساس کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Dhindsa *et al*., 1981).

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول با pH۷ ، ۰/۱۵ H_2O_2 میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود (Nakano & Asada, 1981). سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.4) ، NBT ۰/۰۷۵ میکرومولار، ۰/۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۷۵ میکرومولار ریبوفلاوین، ۱۳ میلی‌مولار متیونین و ۵۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی می‌باشد. (Giannopolotis & Ries, 1977).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL)

برای تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCL (۵۰ میلی مولار) حاوی بتامرکاپتواتانول (۱۵ میلی‌مولار) در هاون سرد شده سائیده شد. سپس سانتریفوژ عصاره بدست آمده با دور g ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. برای سنجش فعالیت آنزیم محلول رویی مورد استفاده قرار گرفت.

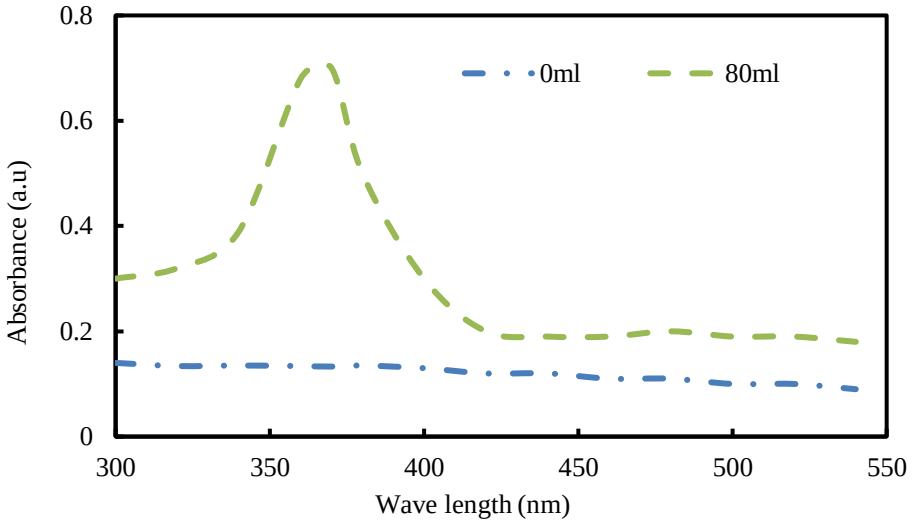
واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز کاتالیز می‌شود. بر اساس سرعت تشکیل اسید سینامیک، فعالیت آنزیم PAL تعیین می‌گردد. به ۱ میلی لیتر از بافر استخراج شامل ۰/۵ میلی لیتر ال- فنیل آلانین (۱۰ میلی مولار)، ۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۴ میلی لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک (۱۰ درصد) پایان می پذیرد. میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۹۵۰۰ غلظت سینامیک اسید بدست آمد(Hahldbrock & Rogg, 1975).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش بر اساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) و مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج آنالیز جذب اسپکتروفتومتری UV-visible نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون

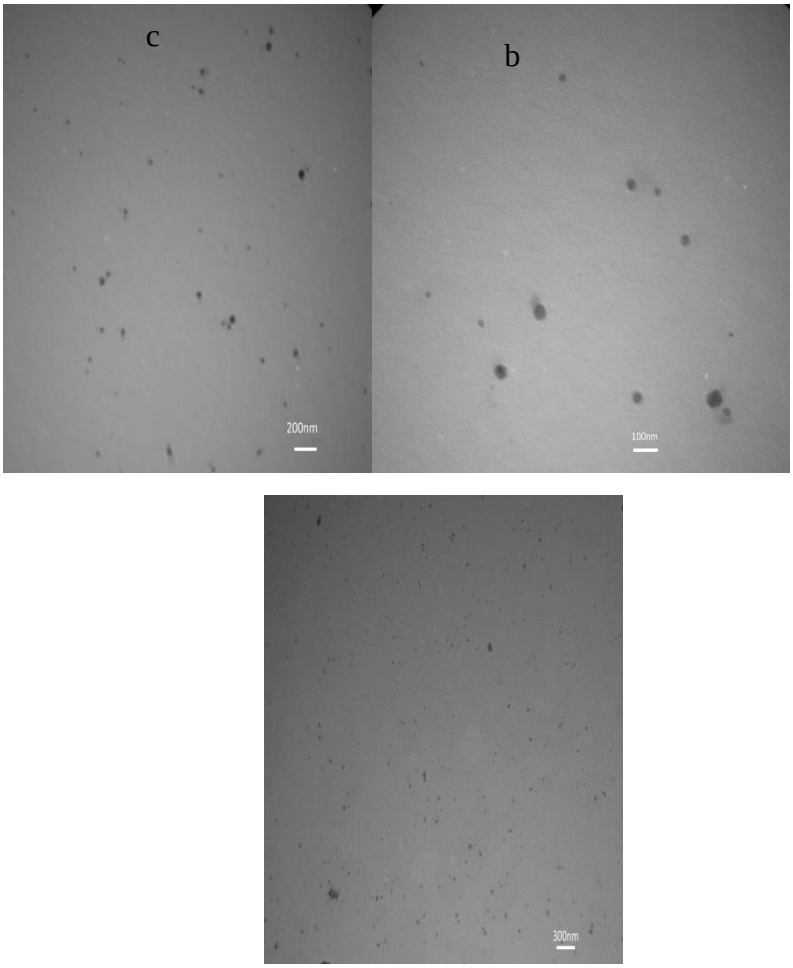
نتایج آنالیز نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون با دستگاه اسپکتروفتومتری UV- visible در غلظت ۸۰ میلی‌لیتر عصاره، در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به طیف مشاهده می شود که ماکزیمم جذب نانوذرات اکسید روی سنتز شده ۳۶۰ نانومتر می‌باشد.



شکل۱. نمودار طیف جذبی UV-visible نانوذرات اکسیدروی سنتز شده در عصاره زیتون.

نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

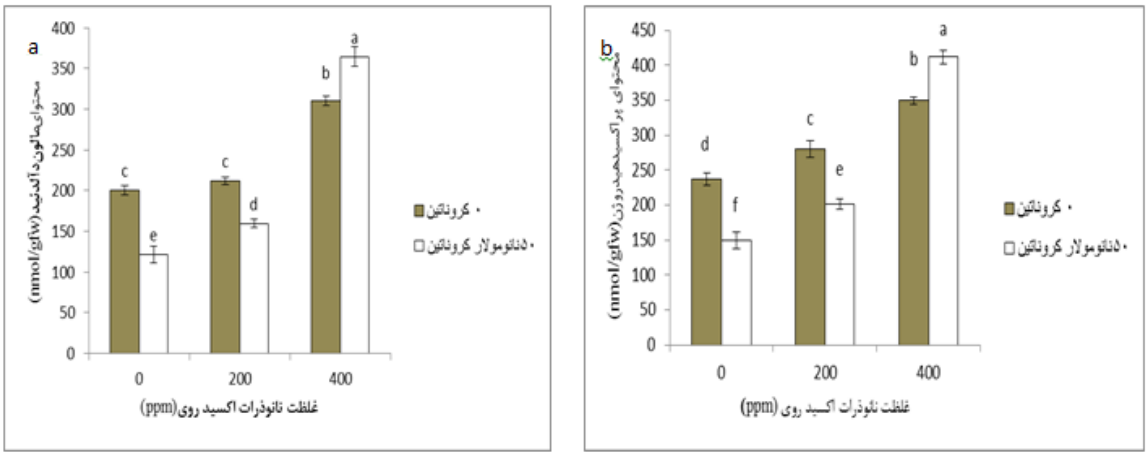
به‌منظور بررسی شکل، اندازه دقیق نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. میانگین اندازه نانوذرات زیتون ۴۱ نانومتر بدست آمد (شکل۲). همچنین توسط میکروسکوپ مشاهده شد که شکل نانوذرات کروی می باشد.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط عصاره زیتون. a) تصویر میکروسکوپ الکترونی با مقیاس ۱۰۰ نانومتر، b) مقیاس ۲۰۰ نانومتر و c) مقیاس ۳۰۰ نانومتر.

نتایج محتوای مالون دآلدئید و محتوای پراکسید هیدروژن

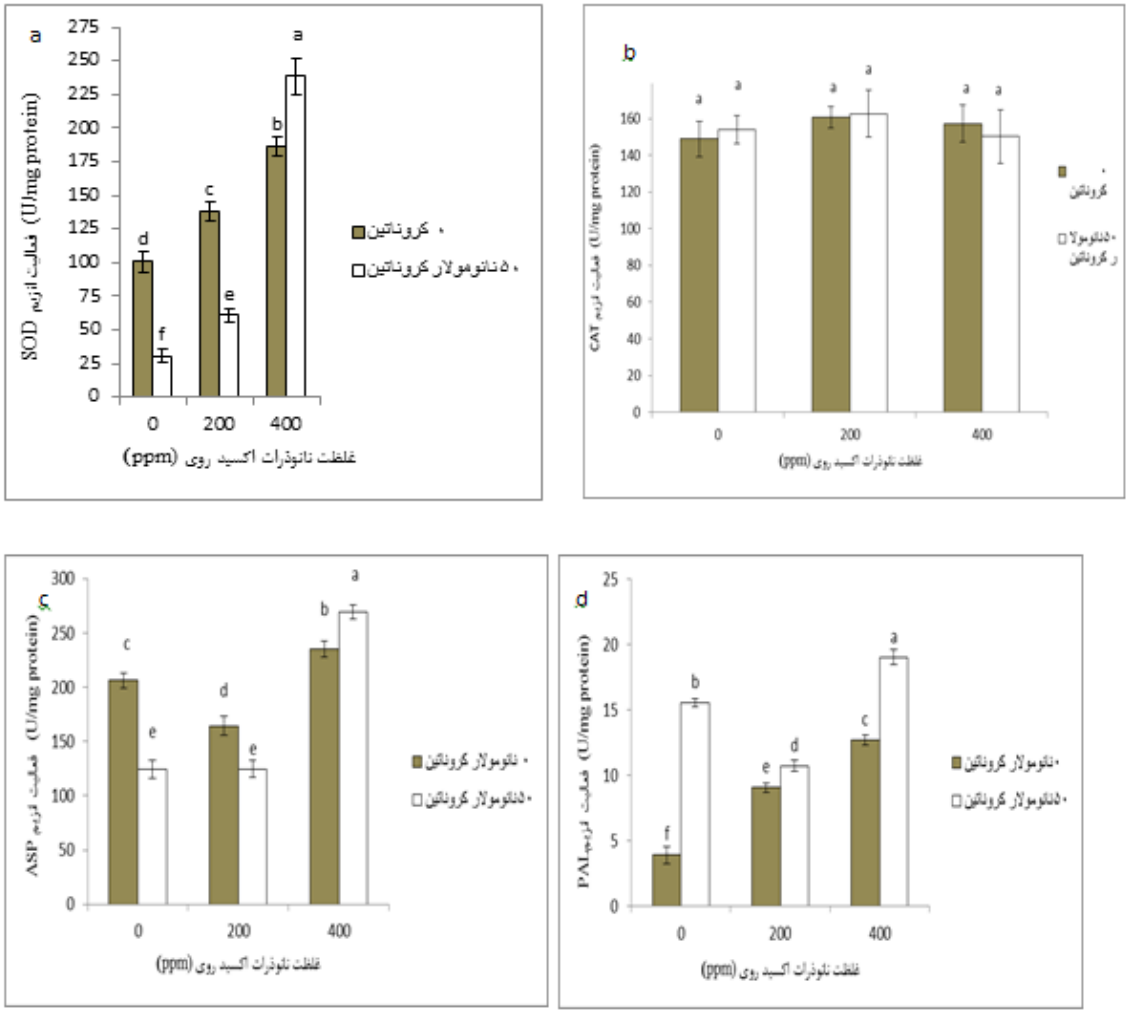
محتوای مالون دآلدئید در تیمار نانوذرات با غلظت ۲۰۰ ppm تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما در غلظت ۴۰۰ ppm محتوای مالون دآلدئید افزایش یافت (3a). تیمار کروناتین درحضور نانوذرات در غلظت ۲۰۰ ppm باعث کاهش محتوای مالون دآلدئید و در غلظت ۴۰۰ ppm باعث افزایش شد. محتوای پراکسید هیدروژن تحت تیمار با نانوذرات اکسیدروی در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد گردید (3b). تیمارکروناتین در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی به ترتیب باعث کاهش و افزایش محتوای پراکسید هیدروژن شده است. کروناتین در شرایط بدون تنش منجر به کاهش محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد گردید.



شکل۳. اثر نانوذرات اکسیدروی و کروناتین بر محتوای مالون‌دآلدئید (a)، پراکسید هیدروژن (b) در سویا (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری و بر اساس آزمون دانکن، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند).

نتایج فعالیت آنزیم‌ها

با توجه به شکل ۴a با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD نیز افزایش می یابد. تیمار کروناتین نیز به‌تنهایی باعث کاهش فعالیت آنزیم SOD نسبت به شاهد شد. تیمار کروناتین به همراه نانوذرات در غلظت ۲۰۰ ppm باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD نسبت به تیمار تنها نانوذرات گردید. تیمار نانوذرات در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm بر فعالیت انزیم کاتالاز نسبت به شاهد تاثیر معنی داری نداشت (۴b). تیمار کروناتین تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد نداشت. تیمار کروناتین به همراه نانوذرات در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار تنها نانوذرات نداشت (۴b). فعالیت آنزیم ASP در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به ترتیب نسبت به شاهد کاهش و افزایش یافت. تیمار کروناتین باعث کاهش فعالیت آنزیم ASP نسبت به شاهد گردید. . تیمار کروناتین به همراه نانوذرات در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به ترتیب باعث کاهش و افزایش فعالیت آنزیم ASP نسبت به تیمارهای تنها نانوذرات گردید (۴c). تیمار نانوذرات اکسیدروی در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد گردیدکه در غلظت ۴۰۰ ppm فعالیت بیشتری نسبت به غلظت ۲۰۰ ppm دارد. تیمار کروناتین به تنهایی باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد گردید و تیمار کروناتین توأم با نانوذرات اکسیدروی در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL گردید.



شکل ۴. اثر نانوذرات اکسیدروی و کروناتین بر فعالیت آنزیم‌های SOD ، CAT، ASP، PAL در سویا (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری و بر اساس آزمون دانکن، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند).

بحث و نتیجه گیری

نانومواد توده‌های اتمی یا ملکولی با اندازه‌ی ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. سنتز نانوذرات فلز در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را در زمینه‌هایی به ویژه در صنایع شیمیایی، فیزیکی، مواد، بیولوژیکی و پزشکی، نوری، مهندسی و علوم مکانیکی به خود جلب کرده است. برخی از روش های مصنوعی مانند روش سل ژل، تکنیک های کاهش و الکتروشیمیایی هستند(Jain *et al*., 2009). این روش ها پر هزینه، سمی و خطرناک هستند و نیاز به انرژی و فشار بالا دارند (Rajiv *et al*., 2013). امروزه فناوری نانو نیاز به سنتز نانومواد با ترکیب، اندازه و مورفولوژی مختلف همراه با کنترل عالی بر این ویژگی ها دارد (Jain *et al*., 2009). توسعه فرآیندهای سنتز نانومواد بدون آلودگی و سازگار با محیط زیست یک جنبه مهم از فناوری نانو است. با توجه به نیاز برای

به حداقل رساندن و یا حذف استفاده از مواد مضر زیست محیطی به عنوان اصول شیمی سبز، سنتز نانوذرات با استفاده از روش زیستی توجه فراوانی را به خود جلب کرده است. سنتز زیستی (بیولوژیکی) نانوذرات یک جایگزین ساده برای بیشتر روش‌های سنتزی پیچیده فیزیکی و شیمیایی است. روش بیوسنتز زیستی شامل موجودات زنده، مانند باکتری ها، قارچ (Nejad *et al.*, 2016) و گیاهان و عصاره‌های گیاهی (Rajiv *et al.*, 2013) می‌باشد.

در میان روش‌های سنتز سبز نانوذرات، سنتز توسط عصاره مقبولیت بیشتری نسبت به بقیه روش‌های سنتز سبز دارد و آن به‌دلیل کنترل آسان‌تر رشد نانوذرات و همچنین عدم نیاز به خارج کردن باقیمانده موجودات از مواد سنتز شده است. سنتز نانوذرات از عصاره گیاهان حنا (Kumar *et al.*, 2011)، برگ چای (Bar *et al.*, 2009) استفاده شده است. در این پژوهش نیز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره زیتون سنتز شد. تایید سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط آنالیزهای UV-visible ومیکروسکوپ TEM صورت گرفت. اولین آزمایشی که برای تایید نانوذرات صورت می‌گیرد، آنالیزهای UV-visible می‌باشد. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون دارای حداکثر جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر بود. مشابه با نتایج ما Rajiv و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانوذرات اکسیدروی را توسط عصاره گیاه *Parthenium hysterophorus* سنتز کردند که حداکثر جذب در طول موج ۳۵۸ نانومتر بود (Rajiv *et al.*, 2013). از طرف دیگر، نانوذرات به دلیل اثرات خاص و ویژگی های منحصر به فردشان، ورود گسترده ای به دنیای کشاورزی و بیولوژی داشته اند. این ذرات به اشکال مختلف در محیط زیست آزاد شده و تاثیرات ناشناخته آنها بر موجودات زنده و اکوسیستم، موجبات نگرانی های بسیاری را فراهم آورده است (Lin & Xing, 2007). گیاهان جز اساسی و ضروری تمام اکوسیستم‌ها می‌باشند و نقش اساسی در سرنوشت و جابه‌جایی نانومواد در محیط، از طریق جذب ایفا می‌کنند. یکی از آسیب‌های جدی ناشی از حضور نانوذرات به گیاه، خسارت به غشاء است. این پدیده نتیجه تجمع گونه های فعال اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپید، افزایش نفوذ پذیری غشاء و خسارت به سلول می‌شود (Cui *et al.*, 2010). غشاهای سلولی به عنوان اولین جایگاه تخریب نانوذرات بررسی شده اند و مطالعات نشان داده است که تخریب غشاهای سلولی به علت پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌باشد که می تواند ناشی از تولید ROS و یا تحریک آنزیم لیپواکسیژناز باشد (Halliwell, 1987). افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو در اکثر تنش های محیطی نظیر حضور نانوذرات گزارش شده است. بنابراین اندازه گیری مالون دآلدئید های تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپید ها شاخص خوبی برای تخمین میزان آسیب اکسیداتیو وارد شده به غشای سلول‌ها می‌باشند (Sun *et al.*, 2007). در این مطالعه مقدار مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن در سویا در غلظت بالای نانوذرات (ppm۴۰۰) افزایش یافت. چنین به نظر می رسد، افزایش میزان گونه های فعال اکسیژن در سطح بالای نانوذرات اکسید روی تا حدی زیاد بوده است که حذف آن ها با سیستم های دفاعی آنزیمی خارج از توان گیاه بوده است. بنابراین مکانیسم های دفاعی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو ایجاد شده کافی نبوده و این امر موجب خسارات بیشتر در بسیاری از فاکتورهای مورد

سنجش در این پژوهش گردیده است.گزارشات متعددی نشان می‌دهند که در حضور نانوذرات اکسیدروی مقدار پراکسیداسیون لیپید ها و نشت یونی در گیاهان حساس افزایش می یابد. القای تنش اکسیداتیو و افزایش MDA در اثر تیمار نانوذرات اکسید مس و آهن در گیاهان برنج (Shaw & Hossain, 2013)، کدو تنبل (Wang *et al*., 2011) نیزگزارش گردیده است. تیمار برنج با نانوذرات اکسید مس (Shaw & Hossain, 2013) و روی (Dimkpa *et al*., 2012) نیز منجر به پراکسیداسیون لیپید غشا گردید. همچنین محتوای پراکسید هیدروژن در گیاهان تیمار شده با نانوذرات سزیم دی اکسید نسبت به شاهد افزایش یافت(Rico *et al*., 2013) . نانوذرات اکسیدروی دارای فعالیت فوتوکاتالیستی است و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد است (Xia *et al*., 2008). نتایج استفاده از پیش تیمار کروناتین روی سویا نشان داد که کروناتین موجب کاهش پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها در سویا گردیده است. شاید کروناتین از طریق افزایش وضعیت ثبات و تمامیت غشای سلولی موجب بهبود رشد گیاهچه‌ها شده است. Wang و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی اثر پیش تیمار کروناتین بر گیاهچه‌های ذرت تحت تنش خشکی، مطرح کردند کروناتین با کاهش تنش اکسیداتیو موجب افزایش محتوای کلروفیل و ثبات غشا در گیاهچه‌ها می‌گردد (Wang *et al*., 2008). مطالعه اثر کروناتین بر گیاه خیار در معرض دمای پایین نیز نشان داده شده است که غلظت‌های ۱ و ۱۰ نانومولار کروناتین با افزایش ثبات غشا، رشد گیاهچه‌های تحت تنش را بهبود می بخشد. محققین بیان کرده‌اند که مشابه با سایر تنظیم کننده‌های رشد، اثر کروناتین بر متابولیسم گیاهان نیز بسیار وابسته به غلظت می‌باشد.

برای مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده در اثر نانوذرات در گیاهان یکسری ترکیبات آنتی اکسیدانی با کارآیی بالا وجود دارند که توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را دارند. ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و فلاونوئیدها از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می شوند. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، شلات کردن یون های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با دادن سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می کنند و قادرند که محصولاتی با قدرت اکسید کنندگی کمتر از ترکیبات اولیه به وجود بیاورند (Roback & Gryglewski, 1988; Chu *et al*., 2000).

نتایج مشابه مربوط به افزایش سطح ترکیبات فنلی در گیاهان گندم (Anderson *et al*., 2012) و گیاه *Arabidopsis thaliana* (Kumar *et al*., 2013) به ترتیب در پاسخ به مس و طلا مشاهده شده است. همچنین، Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که نانوذرات نقره زیستی باعث افزایش محتوای ترکیبات فنلی *Bacopa monnieri* شد. از آنجا که همه این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و سینامیک اسید خود محصول عمل دآمیناز آنزیم PAL روی فنیل آلانین می‌باشند، به نظر می رسد که تغییرات در فعالیت PAL می تواند یکی از دلایل برای تغییر مقدار این ترکیبات در گیاهان باشد. فنیل آلانین

آمونیالیاز آنزیم اصلی مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که با دآمیناسیون تبدیل L-فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید را انجام می‌دهد. سینامیک اسید اولین حدواسط برای سنتز ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، فلاونوئیدها، تانن و لیگنین می‌باشد (Solecka, 1997; Singh *et al*., 2009). تغییرات در فعالیت PAL و سایر آنزیم های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع انواع ترکیبات فنلی می تواند جزء اولین مراحل پاسخ به تنش ها باشد (Wen *et al*., 2008, Solecka, 1997). در نتیجه افزایش فعالیت و بیان PAL، ترکیبات فنلی نظیر فنلیک اسیدها ، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها در بافت‌های تحت تنش تجمع می‌یابند و گیاهان را علیه تنش های زنده و محیطی محافظت می‌نمایند (Dixon & Paiva, 1995). در این مطالعه فعالیت PAL در نمونه‌های در معرض غلظت پایین و بالای نانوذرات اکسیدروی افزایش داشت . افزایش فعالیت PAL در گیاه خردل در معرض نانوذرات روی نیز گزارش شده است (Rao & Shekhawat, 2015). بنابراین در تنش‌ها محتوای فنل افزایش می یابد تا اثرات مضر تنش را کاهش دهد. با این وجود تنش خشکی بیان ژن PAL در گیاه چای را کاهش داده است (Singh *et al*., 2009). بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که گیاهان در شرایط مختلف و بسته به شدت تنش ها پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند. در این پژوهش گیاه سویا در غلظت پایین نانوذرات اکسید روی (۲۰۰ ppm) فعالیت PAL را افزایش داد که این ترکیبات بخشی از اثرات سمیت نانوذرات اکسیدروی را مهار نموده است. ولی افزایش فعالیت PAL و ترکیبات فنلی در غلظت بالای نانوذرات (۴۰۰ ppm) نتوانسته اثرات مخرب نانوذرات اکسیدروی را بهبود دهد. پیش تیمار گیاهان با کروناتین در این تحقیق فعالیت آنزیمPAL را بطور معنی داری افزایش داده است. نتایج بررسی اثر کروناتین در افزایش تحمل به یخ‌زدگی در خیار حاکی از این مطلب است که ترکیب کروناتین با فعالیتی مشابه با جاسمونات از طریق افزایش فعالیت PAL، مقاومت خیار به آسیب‌های ناشی از یخ زدگی در گیاه را افزایش می دهد (Wang *et al*., 2009). در حالت طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت جاروب کردن و نابودی آن‌ها از سطح سلولی تعادل وجود دارد که این گیاه را در حالت نسبتاً پایدار نگه می‌دارد. در یک تعریف کلی تنش اکسیداتیو زمانی بروز پیدا می کند که میزان رادیکال های آزاد موجود در سلول از مقدار ترکیبات سم زدا و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه تجاوز کند (Maksymiec, 2007; Garg & Singla, 2011). آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز به همراه آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در گیاهان می‌باشند. آنزیم SOD اولین خط دفاعی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است و باعث حذف گونه‌های سوپر اکسید (O_2^-) می‌شود و تولید آب اکسیژنه (H_2O_2) واکسیژن ملکولی می‌کند. از طرف دیگر آنزیم های CAT و آسکوربات پراکسیداز مسئول جاروب کردن H_2O_2 اضافی در بافت‌های گیاهی هستند (Prasad & Strzatka, 2002). در پژوهش حاضر، تیمار نانوذرات اکسیدروی منجر به افزایش فعالیت آنزیم SOD در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm نانوذرات شده است و فعالیت آنزیم ASP در غلظت ۴۰۰ ppm در گیاه سویا افزایش یافت اما تیمار نانوذرات بر روی فعالیت آنزیم CAT تاثیر معنی داری نداشت. گیاه سویا برای جاروب کردن H_2O_2 تولید شده توسط نانوذرات تنها

فعالیت آنزیم ASP را افزایش داده و آنزیم CAT نقش چندانی در جاروب کردن H_2O_2 نداشته است. به‌نظر می‌رسد فعالیت آنزیم ASP برای جاروب کردن H_2O_2 موثر نبوده است و محتوای H_2O_2 در شرایط تیمار نانوذرات بالاست. موافق با نتایج ما، تحقیقات انجام شده روی اثر نانوذرات نقره بر گیاه *Arabidopsis thaliana* اثر افزایشی فعالیت آنزیم‌های SOD را گزارش کردند (Nair & Chung, 2015). همچنین Cecilia Barrios و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که هیچ کدام از غلظت های نانوذرات اکسید سزیم بر فعالیت آنزیمCAT در مقایسه با شاهد تاثیر معنی داری نداشته اما بر فعالیت آنزیم ASP اثر کاهشی داشته است. Servin و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات اکسید تیتانیوم منجر به افزایش فعالیت آنزیم ASP در گیاه مورد مطالعه شد. با وجود مطالعات متعدد فعالیت های آنزیم در سمیت نانوذرات در گیاهان مختلف در معرض نانوذرات، فعالیت متفاوتی را نشان می‌دهد. مطالعات، اثرات نامنظم و غیر قابل پیش بینی از نانوذرات در فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد؛ به‌عنوان مثال، نانوذرات تیتانیوم دی اکسید فعالیت‌های SOD CAT, APOX, را در اسفناج (Lei *et al*., 2008) افزایش داده اما فعالیت آنزیم GR و APOX در باقلا کاهش یافته است (Foltete *et al*., 2011). Zhao و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که فعالیت ASP در ذرت در معرض نانوذرات اکسید سزیم افزایش یافت. از مطالعات فوق، می توان به این نتیجه رسید که گیاهان می‌توانند در غلظت های پایین‌تر نانوذرات، تعادل گونه های فعال اکسیژن را با افزایش فعالیت های آنتی اکسیدان برقرار کنند. با این حال، غلظت‌های بالاتر نانوذرات به شدت سمی هستند و موجب اکسیداتیو شدید در گیاهان و در نتیجه، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان می‌شوند. علیرغم اینکه تیمار نانوذرات در غلظت ۴۰۰ ppm در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانSOD و ASP در گیاه سویا را افزایش داده است، با این وجود، چنین به نظر می‌رسد که این افزایش برای جبران تنش اکسیداتیو ناشی ازتجمع گونه‌های فعال اکسیژن در اثر سمیت نانوذرات کافی نبوده و میزان تولید گونه های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان بیشتر بوده است. بنابراین در گیاهان در معرض نانوذرات بخصوص در غلظت بالای آن، تنش اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپید ها و آسیب به غشاء) رخ داده است. در این پژوهش، پیش تیمار گیاهان با کروناتین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های APX و SOD در گیاهان گردید و تغییر معنی داری بر فعالیت آنزیم CAT نداشت.

نتیجه‌گیری

عصاره گیاه زیتون به‌عنوان یک عامل کاهنده و پایدار کننده برای سنتز زیستی نانوذرات اکسیدروی در محلول آبی استفاده شد. میانگین اندازه نانوذرات زیتون توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری ۴۱ نانومتر بدست آمد. همچنین توسط میکروسکوپ مشاهده شد که شکل نانوذرات کروی می باشد. تیمار نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط زیتون با پیش تیمار کروناتین باعث تغییر پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه سویا شد. بررسی نانوذرات اکسیدروی بر گیاه سویا نشان داد که فعالیت آنزیم‌های ASP PAL, SOD،، پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید افزایش یافت. محتوای مالون دآلدئید در غلظت ۲۰۰

ppmنانوذرات اکسیدروی تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما فعالیت آنزیم SOD افزایش معنی داری نسبت به شاهد یافت. پیش تیمار کروناتین تنها در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی تنشهای ایجاد شده را بهبود بخشد.

منابع

Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, HJ., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. & Panneerselvam, R. 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiol Plant*, 31, 427-436.

Ai, L., Li, Z.H., Xie, Z.X., Tian, X.L., Eneji, A.E. & Duan LS. 2008. Coronatine Alleviates Polyethylene Glycol-induced Water Stress in Two Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *J Agric Crop Sci*, 194, 360-36.

Anderson, & A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J Nano Res*, 14(9), 1–15.

Bar, H., Bhui, D.K. & Sahoo, G.P. 2009. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids Surf A*, 339,134–139.

Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F. & Gross, D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 266-292.

Block, A., Schmelz, E., Jones, J.B. & Klee, H.J. 2005. Coronatine and salicylic acid: the battle between Arabidopsis and Pseudomonas for phytohormone control. *Mol plant pathol*, 6(1), 79-83.

Boonyanitipong ,L. P., Kositsup, B., Kumar, P., Baruah, S. & Dutta, J. 2011. Toxicity of ZnO and TiO_2 nanoparticles on germinating rice seed. *Int J Biosci Biochem*, 1, 282-285.

Cecilia Barrios, A., Cyren, M., Trujillo-Reyes, J. & Medina-Velo, A. 2015. Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. *Science of the Total Environment*, 1-9.

Cui, X.M., Zhang, Y.K., Wu, X.B. & Liu, CS. 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ*, 56 (6), 274-281.

Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. & Thrope, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid per oxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exp Bot, 32(1), 93-101.

Dimkpa, C.O., McLean, J.E., Latta, D.E., Manangon, E., Britt, D.W., Johnson, W.P., Boyanov, M.I. & Anderson, A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J Nanoparticle Res*, 14,1–15.

Dixon, R.A. & Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenyl propanoide metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. &Turner, J.G. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 6, 751-759.

Foltete, A.S., Masfaraud, J.F. & Bigorgne, E. 2011. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and gentoxicity of altered TiO_2 nanocomposites on *Vicia faba*. *Environ Pollut*, 159,2515–2522.

Garg, N. & Singla, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ Chem Let*. 9, 303-321.

Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 59, 309-314.

Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem Phys Lipids*. 44, 327-340.

Heath, R.L. & packer, L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189-198 .

Jain, D., Daima, H.K. & Kachhwaha, S. 2009. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Bios*, 4,557–563.

Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or morflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiol Biochem*, 42, 225-31.

Khodakovskaya ,M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. & Biris, A.S. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10), 3221-7.

Krishnaraj, C., Jagan, E.G. & Ramachandran, S.M. 2010. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism .*Process Biochem*, 47,651–658.

Kumar, P.K., Paul, W. & Sharma, PC. 2011. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: characterization and blood compatibility. *Process Chem*, 46, 2007–2013.

Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V., Yadav, S.K. 2013. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Total Environ*, 461,462–468.

Lee ,C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y., Braam, J. & Alvarez. P.J.J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem*, 29, 669-675

Lee ,W.M., An, Y.J., Yoon, H. & Kwbon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiates*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environment Toxicology Chemistry*, 27,1915-1921.

Lei, Z., Mingyu, S. & Xiao, W. 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biol Trace Elem Res*, 121,69–79.

Lin ,B.S., Diao, S.Q., Li, C.H., Fang, L.J., Qiao, S.C. & Yu, M. 2004. Effects of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai Larch seedlings. *J Res*, 15,138-140.

Lin ,D. & Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut*, 150, 243-250.

Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant*, 29, 177-187.

Mithofer, A., Maitrejean, M. & Boland W. 2005. Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. *Plant Growth Reg*, 23, 170-178.

Nair, P.M.G. & Chung, I.M. 2015. Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiol Plant*, 37(1), 1719.

Nakano, V. & Asada, K. 1981. Hydrogen Peroxide is scavenged by ascorbate-specific Peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22, 867-880.

Nejad, M.S., Khatami, M. & Bonjar, G.H.S. 2016. Extracellular synthesis gold nanotriangles using biomass of streptomyces microflavus. *IET Nanobiotechnol*, 10 (1), 33–38.

Pandey ,A. C., Sanjay, S. S. & Yadav, R. S. 2010. Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum* L. *J Exp Nanosci*, 5, 488-497.

Prasad, M.N.V. & Strzatka, K. 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 15,423- 432.

Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R., Sreeprasad, T.S., Sajanlal, P.R. & Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr*, 35(6),905–927 .

Rajiv, P., Rajeshwari, S. & Venckatesh, R. 2013. Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of Parthenium hysterophorus L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 112, 384–387.

Rao, S. & Shekhawat, G.S. 2015. Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in Brassica juncea. *J Environ Chem Engin*, 2, 105–114.

Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J., Peralta-Videa, J.R., Rico, C.M., Hong, J. & Morales, M.I. 2013a. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging, *Environ Sci Technol*, 47,5635–5642.

Roback, J. & Gryglewski, R. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharma*, 37, 837-841.

Sanchez-Viveros, G., Ferrera-Cerrato, R. & Alarcon, A. 2010. Short term effects of As-induced toxicity on growth, chlorophyll and Carotenoid contents and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides. Water Air and Soil Pollut*, 217(1-4), 455-462.

Servin, A. D., Morales, M. I., Castillo-Michel, H., Hemandez-Viezcas, J. A., Munoz, B., Zhao, L. J., Nunez, J.E., Peralta-Videa, J.R. & Gardea-Torresdey, J. L. 2013. Synchrotron verification of TiO2 accumulation

in Cucumber fruit: A possible pathway of TiO_2 nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environ Sci Technol*, 47(20), 11592-11598.

Shaw, A.K. & Hossain, Z. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 93,906–915.

Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. & Ahoja, P.S. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavon-3-ols) accumulation in tea. *Funct Integr Genom*, 9(1), 125-134

Solecka, D. 1997. Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. *Acta Physiol Plant*, 19(3), 257-268.

Sun, B., Jing, Y., Chen, K., Song, L., Chen, F. & Zhang, L. 2007. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). *Plant Physiol*, 164, 536-543.

Tamogami, S. & Kodama, O. 2000. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochem*, 54, 689-694.

Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci*, 151, 59-66.

Wang, B., Zhaohu, L., Eneji, E., Tian, X., Zhai, Z. Li. J. & Duan, L. 2008. Effects of coronatine on growth, gas exchange traits, chlorophyll content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in maize (*Zea mays* L.) seedling under simulated drought stress. *Plant Prod Sci*,11, 283-290.

Wang, H., Kou, X. & Pei, Z. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita maxima*) plants. *Nanotoxicology*, 5,30–42.

Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q.H. & Hung, W.D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Reg*, 55(1), 1-10.

Xia, T., Kovochich, M. & Liong, M. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2,2121–2134.

Yan, Z.F., Wei, J.K. & Zhou, X. 1999. Effects on the resistance water stress for India millet seedling by coronatine treatment. *Chin Agric Sci Bull*, 15, 11-14.

Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela, A., Zhang, J. & Gardea-Torresdey, J.L. 2012. Stress response and tolerance of Zea mays to CeO_2 nanoparticles: cross talk among H_2O_2, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano*, 6, 9615–9622.

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.B, Schaller, A., He, S.Y & .Howe, G.A. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv .tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J*, 36, 485-499.

Zhu, H., Han, J. & Xiao, J.Q. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J Environ Monit*, 10,713–717.

Evaluation the Effect of Coronatine Pretreatment on Zinc Oxide Stress Synthesized by Olive on Soybean plant

Sh. Hashemi Shahraki[1], F. Mohamadhasani[2*]

Received:2020.7.27
Accepted:2020.11.28

Abstract

Green synthesis of nanoparticles by plants extract has achieved a growth in interest. In the present study, Zinc oxide nanoparticles were synthesized by Olive extract. Morphological and structural properties of the synthesized Zinc oxide nanoparticles have been characterized using UV-Vis spectrophotometer, TEM analysis. Then, the effect of Zinc oxide nanoparticles at concentrations of 0, 200 and 400 ppm with pretreatment Coronatine (0 and 50 nM) on the parameters of Hydrogen peroxide and Malondialdehyde and Catalase (CAT) enzymes, Ascorbate peroxidase (ASP), superoxide dismutase (SOD), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) was investigated. Synthesized Zinc oxide nanoparticles were confirmed by maximum absorption at wavelength of 360 nm. TEM image revealed that Zinc oxide nanoparticles were spherical with average size 41 nm. Investigation of Zinc oxide nanoparticles on Soybean showed that at concentrations of 400 ppm Zinc oxide nanoparticles, enzyme activity of ASP, PAL, SOD, Hydrogen peroxide and Malondialdehyde increased. The content of Malondialdehyde at a concentration of 200 ppm of Zinc oxide nanoparticles did not change the activity significantly compared to the control, but the activity of the SOD enzyme increased significantly compared to the control. Pretreatment of Coronatine improved stress at 200 ppm Zinc oxide nanoparticles and reduced the content of Hydrogen peroxide and Malondialdehyde, but Coronatine increased this content at 400 ppm Zinc oxide nanoparticles.

Keywords: *Hydrogen peroxide, Coronatine, Malondialdehyde, Zinc oxide nanoparticles*

1- Assistant professor, Biology Department, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2- Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
*(Corresponding author: fereshtehmhasani@yahoo.com)

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۱۶۸-۱۸۶
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 146-167
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2021.33048.1379

بررسی تأثیر کود زیستی ازتِ و کود اوره بر برخی صفات فیزیولوژی، فیتوشیمیایی و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

فائزه هادی نژاد[۱]، اعظم سلیمی*[۲]، مریم چاوشی[۳]

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از کودهای زیستی به صورت جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی کودهای شیمیایی سبب افزایش عملکرد محصولات کشاورزی می‌شوند. جایگزین نمودن کود زیستی به‌جای کود شیمیایی می‌تواند مزایای اقتصادی مناسبی را برای کشاورزان به همراه داشته باشد، که ازجمله‌ی آن‌ها، کاهش آلودگی خاک، افزایش حاصلخیزی خاک و بهبود رشد گیاه را می‌توان نام برد. هدف از این پژوهش بررسی کودهای زیستی ازتوباکتر، شیمیایی اوره، تلفیق کود زیستی و شیمیایی با نسبت‌های ۵۰/۵۰ و ۳۰/۷۰ و قارچ تریکودرما در گیاه سیاهدانه است که آزمایشی به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه انجام گرفت. طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک ساقه، تعداد کپسول، وزن هزار دانه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فیتواسترول در همه‌ی تیمارها افزایش یافته است. کود زیستی باعث افزایش پروتئین و فعالیت آنزیم کاتالاز برگ، کلروفیل b و فیتواسترول‌ها و تیمار کود تلفیقی باعث افزایش کلروفیل a، کلروفیل کل، پروتئین برگ و دانه شده است. تیمار تریکودرما باعث افزایش پروتئین برگ شده است. به‌طور کلی به‌کارگیری کودهای زیستی و تلفیقی و فراهم کردن مواد مورد نیاز گیاه باعث افزایش رشد گیاه می‌شود و استفاده از کودهای زیستی در قالب تغذیه‌ی تلفیقی در کاهش مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و آلودگی‌های ناشی از آن مؤثر است وکارایی بهتری را به دنبال خواهد داشت. با توجه به نتایج موجود تیمارهای کود تلفیقی و قارچ تریکودرما بیشترین تأثیر را در پارامترهای اندازه‌گیری شده دارد.

واژه‌های کلیدی: ازتوباکتر، تریکودرما، سیاه‌دانه، کود زیستی، فیتواسترول

۱- دانشجوی اسبق کارشناسی ارشد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: Salimi@khu.ac.ir)
۳- دانشجوی اسبق دکتری گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مقدمه

گیاه سیاه‌دانه با نام علمی (*Nigella sativa L*) گیاهی علفی، دولپه و متعلق به تیره‌ی آلالگان (Ranunculaceae) می‌باشد. بذرهای سیاه‌دانه مصرف خوراکی دارند و حاوی ترکیبات دارویی و متابولیت‌های ثانویه است. از ترکیبات دارویی آن می‌توان به تیموکینون، فیتواسترول، آلکالوئید، چربی و اسانس‌ها اشاره کرد (Kalidasu *et al.*, 2017).

کودهای زیستی به مواد حاصل‌خیزکننده‌ای گفته می‌شود که حاوی تعداد کافی از یک یا چندگونه میکروارگانیسم خاکزی هستند که عمدتاً از محیط‌زیست جداسازی و در محیط‌های کشت آزمایشگاهی تکثیر و پرورش پیدا می‌کنند. کودهای زیستی با منشأ طبیعی سبب افزایش مواد آلی خاک و به دنبال آن باعث افزایش عملکرد گیاه می‌شود و از طرفی سبب کاهش مصرف کودهای شیمیایی و آلودگی ناشی از آن‌ها خواهند شد (Bhattacharjee & Dey, 2014). کودهای زیستی در گیاه سرخارگل می‌توانند به‌جای کودهای معدنی نیتروژن و فسفر مورد استفاده قرار گیرند تا ضمن کاهش هزینه‌های ناشی از مصرف این قبیل کودها، از آسیب به محیط زیست به‌ویژه در اثر نیتروژن به شکل نیتراتی جلوگیری به عمل آید (آقاعلیخانی، ۱۳۹۲). تلقیح بذر شنبلیله با کود زیستی سینوریزوبیوم و کود زیستی پتابارور منجر به افزایش اکثر صفات رویشی و در نتیجه عملکرد شاخساره شد (منیری، ۱۳۹۶). کودهای زیستی توانسته اثرات مثبت و مناسبی در عملکرد جو (کنعانی ۱۳۹۲)، آفتابگردان (شکوه‌فر ۱۳۹۷)، گندم (مهتدی، ۱۳۹۲ و امیر یوسفی، ۱۳۹۶) داشته باشند. کاهش سمیت در گیاهان خوراکی و دارویی رویکردی است که در جهان و ایران مورد توجه ویژه قرار گرفته است جایگزین کردن کودهای آلی و زیستی به‌جای کودهای شیمیایی یکی از آرزوهای محققینی است که در زمینه‌ی سالم‌سازی تغذیه‌ی انسان تلاش می‌کنند (Talaei & Gholami, 2014) از این رو، در این پژوهش بذرهای گیاه گونه *Nigella sativa* L. برای مطالعه‌ی انتخاب و تأثیر کود زیستی ازتِ و کود شیمیایی اوره بر برخی ترکیبات متابولیک ثانویه ازجمله فیتواسترول و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی بذرهای آن انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور کاشت گیاه سیاه‌دانه، بذر گونه‌ی *Nigella sativa* L. از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. پس از آماده‌سازی و آنالیز خاک محل موردنظر، بذرها در مزرعه دانشگاه خوارزمی کرج با مساحت ۲۰۰ مترمربع در طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۵۰ دقیقه شمالی در اوایل مهرماه ۹۳ کشت شد. آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار کودی شامل کود شیمیایی نیتروژن، کود زیستی ازتوباکتر، کود تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ (زیستی: شیمیایی) و ۳۰/۷۰ (زیستی: شیمیایی) و همچنین قارچ تریکودرما مطابق جدول زیر در ۳ تکرار انجام شد (Allen *et al.*, 1998; Duke, 1983).

جدول ۱: نوع کودهای مورداستفاده و میزان مصرف

نوع کود	مقدار مورد مصرف	نحوه استفاده	زمان استفاده
کود اوره شیمیایی	۴۰ کیلوگرم در هکتار	سرک	ابتدای کشت
کود کامل شیمیایی	۵۰ کیلوگرم در هکتار	سرک	ابتدای کشت
کود زیستی (ازتوباکتر)	۱۰۰ گرم در هکتار	بذر مال	ابتدای کشت
قارچ تریکودرما (تریانوم)	۲۰ گرم به ازای ۲۰۰ بوته	محلول در آب	پس از مرحله جوانه‌زنی
کود تلفیقی شیمیایی و زیستی با نسبت‌های (۵۰/۵۰ و ۷۰/۳۰)	هریک به‌صورت جداگانه مطابق دستوری که در بالا ذکر شد		ابتدای کشت

کود اوره شیمیایی، کود کامل شیمیایی، کود تلفیقی و کود زیستی از ابتدای کشت هم‌زمان با بذر پاشی در مزرعه انجام شد ولی قارچ تریکودرما به پتری دیش‌های حاوی بذر سیاه‌دانه اضافه شد. دوره‌ی رشد گیاه از مهرماه تا اواخر تیرماه ۹۴ به طول انجامید. در ابتدای مهرماه بذر گیاه سیاه‌دانه هم‌زمان با تیمارهای نام‌برده در مزرعه کشت شد. برداشت گیاهان در دو مرحله صورت گرفت. در برداشت اولیه که در آذرماه بود، برگ‌ها به‌منظور سنجش‌های فیزیولوژیکی برداشت شدند. گروه دوم گیاهان به رشد خود ادامه دادند. پس از رشد تا ارتفاع ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر، گیاهان وارد فاز سرما شدند و در اسفندماه پس از گذران سرما به رشد ادامه دادند. شروع غنچه‌دهی در اواخر اردیبهشت‌ماه و گلدهی کامل و بستن کپسول‌ها اواخر خرداد و پس‌ازآن پر شدن دانه‌ها و رسیدگی فیزیولوژیک در نیمه‌ی تیر اتفاق افتاد و درنهایت رسیدگی کامل و برداشت کپسول‌ها در اواخر تیرماه صورت گرفت. به‌منظور بررسی بهتر تأثیر تیمارهای کودی روی گیاه و نیز اثر آن بر میزان عملکرد گیاه، برداشت کپسول‌ها نیز پس از رسیدگی کامل به‌منظور سنجش‌های دانه در نیمه‌ی تیرماه صورت گرفت.

صفات اندازه‌گیری شده

۱- صفات مورفولوژی

برای اندازه‌گیری وزن‌تر، ابتدا اندام‌های هوایی از ریشه جدا و وزن‌تر آن‌ها با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی دیجیتال (مدل Sartorius TE313s، آلمان) تعیین شد. به‌منظور محاسبه وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. طول ساقه از یقه تا جوانه‌ی انتهایی و نوک ریشه با خط‌کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. اجزای عملکرد شامل تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، ارتفاع گیاه، بیوماس و وزن هزار دانه اندازه‌گیری، شمارش و ثبت شدند.

۲- رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئیدها)

۰/۲ گرم بافت تازه‌ی برگی با استون ۸۰ درصد سائیده شد. محتوای هاون با کاغذ صافی واتمن شماره‌ی یک صاف گردید. این محلول حاوی کلروفیل a ,b و کاروتنوئید است ۳ میلی‌لیتر از این محلول در کووت ریخته شد و شدت جذب آن در

طول‌موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) خوانده شد. غلظت این رنگیزه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید و برحسب میلی‌گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردیدند (Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chl}a\ (\text{mg ml}^{-1}) = 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8}$$
$$\text{Chl}b\ (\text{mg ml}^{-1}) = 21.51 \times A_{646.8} - 5.1 \times A_{663.2}$$
$$\text{Chl}\ (a+b) = \text{Chl}a + \text{Chl}b$$
$$\text{Car mg ml}^{-1} = (1000 \times A_{470} - 1.8 \times \text{Chl}a - 85.52 \times \text{Chl}b) / 198$$

تهیه‌ی عصاره آنزیمی

ریشه و برگ تازه گیاهان پس از توزین، با دو میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH ۶/۸) به‌صورت هموژن درآمد. پس از همگن‌سازی نمونه‌ها به ویال‌های دو میلی‌لیتری انتقال داده شد و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در سرعت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز بالایی جدا شد و این عصاره‌ها برای سنجش‌های آنزیمی نیز مورداستفاده قرار گرفت (Bradford, 1976).

۳- فعالیت آنزیم کاتالاز

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر انجام شد. سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش که شامل ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH۶/۸)، ۱۰۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی می‌باشد به عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد و تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت سه دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین برای همه نمونه‌ها محاسبه شد (Dhindsa *et al.*, 1981).

۴- استخراج پروتئین

برای تهیه‌ی معرف برادفورد، کوماسی بریلیانت بلو در ۱۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل و سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید اورتو فسفریک ۸۵ درصد غلیظ به آن اضافه شد و درنهایت حجم کل با آب مقطر به ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده و در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سنجش پروتئین برای هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به‌دست‌آمده و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر را در یک لوله‌ی آزمایش ریخته و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به آن اضافه شد. سپس به‌وسیله‌ی اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) جذب نمونه در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد اندازه‌گیری شد؛ و مقدار پروتئین

نمونه‌ها با استفاده از نمودار استاندارد آلبومن گاوی به ازای میلی‌گرم در گرم وزن‌تر ماده‌ی گیاهی محاسبه گردید (Bradford, 1976).

۵- محتوای ترکیبات فنلی کل برگ گیاه سیاه‌دانه

برای سنجش محتوای فنل کل گیاه سیاه‌دانه ۰/۵ گرم بافت تر برگ با ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ مخلوط شد. ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره حاصل با ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین رقیق‌شده (نسبت ۱ به ۱۰) ترکیب شد. پس از ۵ دقیقه ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷٪ به آن اضافه و پس از ۹۰ دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای فنل کل بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بیان گردید (Singleton & Rossi, 1965).

۶- ترکیبات فنلی دانه

به‌منظور انجام سنجش‌های بیوشیمیایی بر روی گیاه سیاه‌دانه کپسول‌های خشک‌شده جمع‌آوری، آسیاب و برای تهیه عصاره استفاده شد. میزان ۱۰۰ گرم دانه آسیاب شده با متانول ۸۰٪ استخراج شد. محلول خروجی بی‌رنگ داخل روتاری (مدل STRIKE300، ایتالیا) در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تقطیر سپس عصاره در ظرف تیره در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شد. از عصاره حاصل در سنجش فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدان دانه استفاده شد.

برای سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل دانه از عصاره تهیه شده به روش فوق استفاده و با ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ مخلوط شد. ۳۰۰ میکرو لیتر از عصاره‌ی حاصل با ۱۵۰۰ میکرو لیتر معرف فولین رقیق‌شده (نسبت ۱ به ۱۰) ترکیب شد. پس از ۵ دقیقه ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷٪ به آن اضافه شد و پس از ۹۰ دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای فنل کل بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بیان گردید (Singleton & Rossi, 1965).

۷-اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه به روش DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، غلظت‌های ۰/۴-۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه و به میزان ۲ میلی‌لیتر در ویال ریخته شد؛ سپس به هر یک ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه و به‌خوبی مخلوط شد و به مدت یک ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰، شرکت unico، آمریکا) در ۵۱۷ طول‌موج نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Zhu *et al.*, 2011). برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان دانه همین روش با استفاده از عصاره دانه تکرار شد.

٪I= (Abs of control - Abs of sample/ Abs of control)× 100

(میزان جذب نوری عصاره)Abs of sample (میزان جذب نوری شاهد)، Abs of control

۸- سنجش فیتواسترول کل به روش طیف‌سنج نوری

عصاره‌گیری از ۰/۵ گرم پودر بذر با استفاده از حلال کلروفرم انجام شد و بعد به هر یک ۲ میلی‌لیتر معرف لیبرمن بورشارد اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه نگه‌داری در تاریکی، جذب عصاره‌ها با دستگاه طیف‌سنج نوری (مدل B7890، آمریکا) در طول‌موج ۶۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این معرف با استرول‌ها واکنش می‌دهد و رنگ سبز درخشانی را ایجاد می‌کند. برای تعیین فیتواسترول کل، از استیگما استرول به‌عنوان استاندارد استفاده شد و درصد فیتواسترول کل (وزن خشک) هر یک از نمونه‌های بذر محاسبه شد (Sabir *et al.*, 2003). فیتواسترول‌های گیاهی در تمام تیمارهای مختلف کود زیستی، تریکودرما، شیمیایی و تلفیقی مطابق آنچه در مواد و روش‌ها بیان شد استخراج و نهایتاً همراه با استانداردها به دستگاه GC تزریق گردید. در این آنالیز انواع استاندارهای استرول شامل کلسترول، براسیکا استرول، ارگسترول، ۲۴- متیلن کلسترول، کمپسترول، کمپستانول، استیگما استرول، دلتا-۷-کمپسترول، دلتا-۵-۲۴ استیگمااستادی انول، کلرسترول، بتاسیتواسترول، سیتواستانول، دلتا -۵ اوناسترول، دلتا-۷-استیگمااستنول، دلتا-۷-اوناسترول، اریترودیول و اوائول مورداستفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری

آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۵ تیمار (کود زیستی، شیمیایی، تلفیق کود زیستی و شیمیایی با نسبت‌های ۵۰/۵۰ و ۳۰/۷۰ و قارچ تریکودرما به تنهایی) و سه تکرار در سال در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه خوارزمی کشت شد. برای تجزیه‌ی آماری از نرم‌افزارهای Excel و SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج

پارامترهای رشد

نتایج به‌دست‌آمده از اثر کودهای زیستی، کود شیمیایی و کود تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما نشان داد که طول ساقه و ریشه، وزن خشک ساقه و وزن تر ریشه در تیمارهای مذکور نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۲). نتایج حاصل از تأثیر کودهای مختلف نشان داد که کودهای زیستی و کود تلفیقی در دو سطح باعث افزایش معنی‌دار بیوماس و وزن تر ساقه نسبت به شاهد شده‌اند ولی کودهای شیمیایی و تریکودرما اثر معنی‌داری نداشته است (جدول ۲).

کودهای زیستی، تریکودرما و تلفیقی باعث افزایش معنی‌داری بر وزن هزار دانه نسبت به شاهد داشته‌اند (جدول ۲). اثر تیمارهای مختلف بر تعداد دانه در کپسول و کپسول در بوته نشان داد که کود زیستی، کود تلفیقی در دو سطح و تریکودرما افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته‌اند اما کود شیمیایی تأثیر معنی‌داری نسبت شاهد نداشته است (جدول ۲).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

اثرات کودهای زیستی، شیمیایی، تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما بر محتوای کلروفیل *a* نشان داد که کود شیمیایی و کود تلفیقی باعث افزایش مقادیر کلروفیل *a* شده و کود تریکودرما، بر محتوای این رنگیزه بی‌اثر بوده است. این در حالی است که کود زیستی سطح آن را کاهش داد. تیمار کود زیستی باعث افزایش محتوای کلروفیل *b* نسبت به شاهد شده است و کودهای تلفیقی در دو سطح، تریکودرما و کود شیمیایی تأثیر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل *b* نسبت به شاهد نداشتند. کودهای زیستی، شیمیایی، کود تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما تأثیر معنی‌داری بر کلروفیل کل نسبت به شاهد نداشته‌اند. کود تلفیقی با نسبت ۳۰/۷۰ باعث افزایش محتوای کاروتنوئید شد کود تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ بر محتوای کاروتنوئید اثر معنی‌داری نداشت و سایر کودها باعث کاهش محتوای کاروتنوئید نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۳).

محتوای پروتئین

نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف کود بر محتوای پروتئین در برگ نشان داد که کودهای زیستی، تریکودرما، شیمیایی و تلفیقی در دو سطح، همگی افزایش معنی‌دار پروتئین برگ نسبت به شاهد داشته‌اند (جدول ۳).

بررسی محتوای پروتئین دانه نشان داد که اثر کود تلفیقی با نسبت ۳۰/۷۰ افزایش معنی‌داری در مقدار پروتئین دانه نسبت به شاهد داشته است، این در حالی است که کود شیمیایی کاهش معنی‌داری در سطح پروتئین دانه نسبت به شاهد نشان داده است. سایر تیمارها اثر معنی‌داری بر پروتئین دانه نداشته است (جدول ۳).

آنتی‌اکسیدان

اثر کودهای زیستی، کود شیمیایی، کود تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما نشان داد که آنتی‌اکسیدان برگ در همه‌ی تیمارهای مذکور نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۴). مطابق جدول مقایسه‌ی میانگین‌ها نتایج حاصل از بررسی آنتی‌اکسیدان دانه نشان داد که اثر کود شیمیایی، تلفیقی و تریکودرما باعث افزایش معنی‌دار آنتی‌اکسیدان دانه نسبت به شاهد شدند ولی کود زیستی نسبت به شاهد معنی‌دار نبوده است (جدول ۴).

ترکیبات فنلی کل

تأثیر تیمارهای مختلف کودهای زیستی، کود شیمیایی، کود تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما باعث کاهش فنل دانه شده است. کودهای زیستی، کود شیمیایی، کود تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ و تریکودرما باعث کاهش ترکیبات فنلی برگ شده و کود تلفیقی با نسبت ۳۰/۷۰ بر فنل برگ اثر معنی‌داری نداشته است (جدول ۴).

کاتالاز

بررسی اثر کودهای زیستی، کود شیمیایی، کود تلفیقی در دو سطح و همچنین قارچ تریکودرما نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در همه‌ی تیمارهای مذکور نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۴).

فیتواسترول دانه

اثر کودهای زیستی، شیمیایی، تلفیقی و تریکودرما باعث افزایش فیتواسترول کل در دانه شده است (جدول ۴). مطابق این جدول بتاسیتواسترول عمده‌ترین ترکیب موجود در فیتواسترول گیاه سیاه‌دانه می‌باشد. این ترکیب با ۶۲/۲۷ درصد در تیمار شیمیایی و بعد از آن به ترتیب در تیمار تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ ، ۸۸ درصد، در تیمار تریکودرما ۵۰/۸۵ درصد، در تیمار کود زیستی ۴۹/۸۹ درصد و کود تلفیقی با نسبت ۷۰/۳۰، ۴۸/۴۷ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. همچنین استیگما استرول که بعد از بتاسیتواسترول در ردیف دوم قرار داشت، درصدهای ۲۰/۹۹، ۲۱/۹۸، ۲۰/۷۱، ۲۰/۳۱ و ۱۲/۲۹ به ترتیب مربوط به تیمارهای زیستی، تلفیقی با نسبت ۷۰/۳۰، تریکودرما و تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ و شیمیایی داشت. کامپسترول نیز با ۱۵/۹۳ درصد با تیمار کود شیمیایی بالاترین عدد را خود اختصاص داد و سایر تیمارها شامل تریکودرما، زیستی، تلفیقی با نسبت ۷۰/۳۰ و ۵۰/۵۰ به ترتیب درصدهای ۱۲/۰۶، ۱۲/۰۶، ۱۳/۴۹، ۱۲/۶۳ داشت. همچنین ۵- اونا استرول در تیمار تلفیقی با نسبت ۷۰/۳۰ با ۱۱/۶۱ درصد و زیستی با ۱۰/۶۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داشته و تیمار کود شیمیایی با ۰/۵۵ درصد نسبت به شاهد کاهش را نشان داده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده تمامی تیمارها شامل کودهای زیستی و شیمیایی، تلفیقی با دو نسبت ۵۰/۵۰ و ۷۰/۳۰ و قارچ تریکودرما در اکثریت فیتو استرول‌های ذکرشده در جدول (۵) نسبت به شاهد افزایش را نشان دادند و استرول‌های عمده در گیاه سیاه‌دانه به ترتیب بتا سیتواسترول، استیگما استرول، کامپسترول و دلتا ۵-اونا استرول بودند؛ و نسبت استرول کل در فیتواسترول‌های عمده در گیاه سیاه‌دانه در مقایسه با شاهد در تیمارهای ذکرشده با نسبت‌های ۱۹۰۵/۶۹، ۸۳۸/۸۰، ۵۶/ ۶۸۸ و ۶۸۰/۲۴ به ترتیب مربوط به کودهای شیمیایی، تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰، تریکودرما، زیستی، همگی نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته‌اند و نسبت استرول کل در تیمار تلفیقی با نسبت ۷۰/۳۰ تفاوت چندانی نسبت به شاهد نشان نداد. استفاده از کود شیمیایی به‌تنهایی تأثیر بهتری بر درصد و میزان استرول کل و همچنین بتا سیتواسترول داشته است که عمده‌ترین ترکیب

موجود در فیتواسترول‌های گیاه سیاه‌دانه است و بعدازآن تیمار تلفیقی با نسبت ۵۰/۵۰ بالاترین تأثیرگذاری را بر میزان فیتواسترول گیاه سیاه‌دانه داشته است.

جدول ۲: مقایسه میانگین تأثیر کودهای زیستی، شیمیایی، تلفیقی و تریکودرما بر پارامترهای رشد سیاه‌دانه

تیمار	طول ساقه	طول ریشه	وزن خشک ساقه	وزن خشک‌ریشه	بیوماس
شاهد	10±0.0^{c}	5.0±0.0^{b}	0.04±0.0^{c}	0.04±0.005^{c}	1.52±0.1^{c}
شیمیایی	26±2.08^{b}	7.7±0.3^{a}	0.7±0.01^{b}	0.08±0.008^{c}	3.17±0.9^{bc}
زیستی	43±3.5^{a}	8.2±0.4^{a}	1.6±0.29^{a}	0.11±0.008^{bc}	10.75±0.9^{b}
تلفیقی ۵۰/۵۰	42±5.6^{a}	8.3±0.8^{a}	1.6±0.12^{a}	0.14±0.02^{a}	8.00±0.3^{b}
تلفیقی ۷۰/۳۰	45±2.8^{a}	7.1±0.6^{a}	1.6±0.143^{a}	0.13±0.006^{ab}	11.41±0.6^{a}
تریکودرما	31±2.3^{b}	7.5±0.2^{a}	1.5±0.18^{a}	0.09±0.008^{a}	5.01±1.1^{bc}
تیمار	وزن هزار دانه	دانه در کپسول	کپسول در بوته	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه
شاهد	1.68± 0.0^{d}	31±1.2^{d}	12±1.15 ^{c}	1.64±1.64^{c}	0.03±0.0^{d}
شیمیایی	1.86±0.1^{cd}	45 ±1.2^{cd}	26±0.88 ^{bc}	4.00±4.003^{bc}	0.406±0.12^{c}
زیستی	2.22±0.3^{a}	95±1.8^{a}	48±8.50 ^{a}	11.41±11.41^{b}	0.69±0.03^{a}
تلفیقی ۵۰/۵۰	1.90±0.1^{bc}	59±1.4^{bc}	37±3.93 ^{ab}	11.87±11.87^{b}	0.69±0.12^{a}
تلفیقی ۷۰/۳۰	2.06±0.3^{a}	91±1.7^{a}	38±2.4 ^{ab}	22.96±2.2^{a}	0.68±0.11^{a}
تریکودرما	1.87±0.1^{b}	84.67±1.3^{b}	42±8.8 ^{ab}	6.77±6.7b^{c}	0.5±0.07^{b}

داده‌ها Mean ± SE را نشان می‌دهند، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌داراست.

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین تأثیر کودهای زیستی، شیمیایی، تلفیقی و تریکودرما بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین برگ و دانه سیاه‌دانه

تیمار	کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پروتئین برگ	پروتئین دانه
شاهد	0.36±0.00^{c}	0.21±0^{b}	0.58±0^{a}	0.39±0.00^{b}	0.45±0.00^{e}	0.020±0.00^{b}
شیمیایی	0.61±0.05^{b}	0.19±0.03^{b}	0.69±0.14^{a}	0.32±0.003^{c}	0.61±0.01^{c}	0.003±0.00^{c}
زیستی	0.18±0.01^{d}	1.02±0.43^{a}	1.40±0.23^{a}	0.12±0.004^{d}	0.85±0.00^{a}	0.018±0.00^{b}
تلفیقی ۵۰/۵۰	0.55±0.00^{b}	0.32±0.19^{b}	1.17±0.68^{a}	0.40±0.024^{b}	0.64±0.03^{b}	0.02±0.01^{a}
تلفیقی ۷۰/۳۰	0.81±0.03^{a}	0.28±0.02^{b}	1.01±0.09^{a}	0.52±0.024^{a}	0.67±0.01^{b}	0.020±0.00^{b}
تریکودرما	0.43±0.02^{c}	0.12±0.02^{b}	0.49±0.07^{a}	0.12±0.003^{d}	0.52±0.00^{c}	0.015±0.00^{b}

داده‌ها Mean ± SE را نشان می‌دهند، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌داراست.

جدول ۴: مقایسه میانگین تأثیر کودهای زیستی، شیمیایی، تلفیقی و تریکودرما بر آنتی‌اکسیدان، کاتالاز، ترکیبات فنلی برگ و دانه و فیتواسترول دانه سیاه‌دانه

تیمار	آنتی‌اکسیدان دانه	آنتی‌اکسیدان برگ	کاتالاز برگ	فیتواسترول دانه	فنل برگ	فنل دانه
شاهد	66.40±2.52[c]	16.17±0.27[e]	0.0005±0.001[b]	0.0018±0.0[c]	1136±0.1[a]	69.44±0.16[a]
شیمیایی	149.22±4.81[a]	68.67±3.26[bc]	0.0014±0.0003[a]	0.0072±0.0[a]	757±0.1[bc]	45.340±1.81[cd]
زیستی	92.45±8.16[bc]	74.21±4.71[b]	0.0019±0.0003[a]	0.0071±0.0[a]	667±0.5[c]	49.76±4.69 [bc]
تلفیقی ۵۰/۵۰	117.20±8.24[b]	92.02±2.46[a]	0.0019±0.0003[a]	0.0057±0.0 [ab]	859±0.3[bc]	50.55±2.80[bc]
تلفیقی ۷۰/۳۰	160±9.47[a]	54.46±6.27[d]	0.0024±0.0001[a]	0.0045±0.0[b]	987±0.1[ab]	55.25±3.67[b]
تریکودرما	99.15±7.49[b]	60.33±1.32[cd]	0.009±0.0001[a]	0.0040±0.0[b]	842±0.2[bc]	36.90±3.93[d]

داده‌ها Mean ± SE را نشان می‌دهند، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌داراست.

جدول ۵: نتایج حاصل سنجش انواع فیتواسترول دانه تحت تیمارهای مختلف کود زیستی، تریکودرما، شیمیایی و تلفیقی سیاه‌دانه به روش کروماتوگرافی گازی

انواع کود / انواع استرول	واحد	تریکودرما	شاهد	زیستی	تلفیقی ۷۰/۳۰	شیمیایی	تلفیقی ۵۰/۵۰
کلسترول	درصد	0.1500	0.0060	0.1800	0.0300	0.0070	0.4600
	نسبت (mg/kg)	1.0329 [c]	0.0404 [e]	1.2244 [b]	0.2020 [d]	0.1334 [d]	3.8585 [a]
براسیکا استرول	درصد	0.0700	0.1000	0.01<	0.01<	0.0010	0.0200
	نسبت (mg/kg)	0.4820 [b]	0.6734 [a]	-	-	0.0191 [d]	0.1678 [c]
ارگسترول	درصد	-	-	-	0.0400	0.1200	-
	نسبت (mg/kg)	-	-	-	0.2693 [a]	2.2868 [b]	-
۲۴-متیلن کلسترول	درصد	0.1400	0.0300	0.0300	0.0200	0.1800	0.0200
	نسبت (mg/kg)	0.9640 [b]	0.2020 [c]	0.2041 [c]	0.1346 [c]	3.4302 [a]	0.1678 [c]
کامپسترول	درصد	12.0260	14.2800	12.0600	13.4900	15.9300	12.6300
	نسبت (mg/kg)	82.8070 [e]	96.1572 [c]	82.0378 [e]	90.8171 [d]	303.5767 [a]	105.941 [b]
کمپستانول	درصد	-	-	0.0100	-	-	0.0800
	نسبت (mg/kg)	-	-	0.0680 [b]	-	-	0.6710 [a]
استیگما استرول	درصد	20.7100	20.4100	20.9950	21.9800	12.2900	20.3100
	نسبت (mg/kg)	142.602 [d]	137.434 [e]	142.8178[d]	147.973 [c]	234.2095 [a]	170.361[b]
کمپسترول -دلتا-۷	درصد	0.3100	0.1300	0.2300	0.4500	0.1500	0.4400
	نسبت (mg/kg)	2.1346 [d]	0.8754 [f]	1.5646 [e]	3.0295 [b]	2.8585 [c]	3.6908 [a]

انواع کود انواع استرول	واحد	تریکودرما	شاهد	زیستی	تلفیقی ۷۰/۳۰	شیمیایی	تلفیقی ۵۰/۵۰
-دلتا-۵-۲۳	درصد	0.1600	-	-	-	-	-
استیگمااستادی انول	نسبت (mg/kg)	1.1017 a	-	-	-	-	-
کلرسترول	درصد	0.4900	0.2400	0.6900	0.2900	0.1100	0.7600
	نسبت (mg/kg)	3.3740 c	1.6161 f	4.6937 b	1.9523d	2.0963 d	6.3749 a
بتاسیتوسترول	درصد	50.8500	47.3400	49.8900	48.4700	62.2700	51.8800
	نسبت (mg/kg)	350.13 bc	318.7733	339.375 c	326.308bc	1186.674 a	435.173 b
سیتواستانول	درصد	2.6000	3.6900	1.4000	0.7300	0.5600	0.4100
	نسبت (mg/kg)	17.9027 b	24.8473 a	9.5235 c	4.9145 d	10.6719 c	3.4391 d
دلتا-۵-آوناسترول	درصد	7.7400	8.7100	10.6500	11.6100	0.5500	7.0000
	نسبت (mg/kg)	53.2951 d	58.6505 c	72.4463 b	78.1606 a	10.4813 e	58.7165 c
دلتا-۵-۲۴-	درصد	1.0800	2.1400	0.6300	0.2400	1.9800	2.2300
استیگمااستادی انول	نسبت (mg/kg)	7.4365 d	14.4101 c	4.2856 e	1.6157 f	37.7327 a	18.7054 b
دلتا-۷- استیگما استنول	درصد	0.5700	0.5100	0.3000	0.3900	3.8600	0.4900
	نسبت (mg/kg)	3.9248 b	3.4342 bc	2.0407 d	2.6256 cd	73.5597 a	4.1102 b
استرول دلتا-۷- اونا	درصد	2.6500	2.0900	2.1500	1.8800	1.4200	2.1800
	نسبت (mg/kg)	18.2470 b	14.073 cd	14.6253 c	12.6565 d	27.0608 a	18.2860 b
اریترودیول	درصد	0.4100	0.2600	0.7500	0.3800	0.4900	0.6800
	نسبت (mg/kg)	2.8231 c	1.7508 c	5.1019 b	2.5582 c	9.3379 a	5.7039 b
اوائول	درصد	-	-	-	-	0.0700	0.3900
	نسبت (mg/kg)	-	-	-	-	1.3340 b	3.2713 a
سطح کل		12153c	27879.4 b	4560.10 d	12293.4 c	42630.8 a	7734.8cd
کلستان سطح آلفا		1765.00 d	4140.28 b	670.36 f	3652.13 c	4474.05a	922.12 e
نسبت استرول کل		688.56 c	673.36 d	680.24 d	673.21 d	1905.69 a	838.80 b

داده ها Mean ± SE را نشان می‌دهند، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌داراست.

بحث

به‌طورکلی امروزه به لزوم و اهمیت استفاده از انواع کودها که تأمین‌کننده‌ی مواد موردنیاز برای رشد گیاهان است بسیار توجه می‌شود. با کشت محصولات به‌طور پی‌درپی خاک‌های زراعی از جهت مواد غذایی فقیر می‌شود و با مصرف کودها می‌توان این کمبود را جبران کرد و در پی آن رشد و نمو گیاه و بازدهی محصولات افزایش یابد. استفاده از مقادیر مناسب کودها برای رشد گیاهان ضروری است و نکته‌ای که باید در مصرف کودهای شیمیایی در نظر گرفت استفاده‌ی بی‌رویه و غیرمعمول آن‌ها است که باعث سمیت در محصولات گیاهی و همچنین آلودگی‌های آب، خاک و... می‌شوند و برای سلامتی انسان مشکلات زیادی را به دنبال دارد. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه‌ی کاربرد کودهای زیستی بر گیاهان دارویی و خوراکی انجام‌شده است.

بررسی نتایج به‌دست‌آمده از به‌کارگیری کودهای مختلف نشان می‌دهد که بیشترین افزایش در طول ساقه، وزن خشک ساقه و ریشه، وزن تر ساقه و ریشه، وزن هزار دانه و تعداد کپسول در شرایط استفاده از کود تلفیقی و زیستی است. تعداد کپسول در گیاه یکی از اجزای مهم عملکرد است که دربرگیرنده‌ی تعداد دانه و از طرف دیگر تأمین مواد فتوسنتزی موردنیاز گیاه است. با کاربرد کود زیستی که باعث افزایش جذب عناصر پرمصرف و ریزمغذی‌های موردنیاز گیاه می‌شود (Sumbul *et al.*, 2020) و با ترشح اسیدآمینه، سیانید هیدروژن و سیدروفورها حاصلخیزی خاک افزایش و به دنبال آن نیز افزایش می‌یابد. افزایش پارامترهای رشد در بررسی شالان (۲۰۰۵) بر سیاه‌دانه با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشته است (Shaalan, 2005) . نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیقات حاکی از آن است که کودهای زیستی می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای جایگزینی کودهای شیمیایی برای کشت سیاه‌دانه باشد. بارال و همکاران (۲۰۱۳) نیز رشد بهتر ذرت را کودهای زیستی نسبت به کود شیمیایی بیان کردند (Baral & Adhikari, 2013). تلان و همکاران (۲۰۰۴) طی تحقیقات خود بر روی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) اظهار داشتند که تلقیح ازتو باکتر موجب افزایش معنی‌داری در ارتفاع، شاخه‌ی جانبی و عملکرد دانه گیاه در مقایسه با شاهد شده است (Tehlan *et al.*, 2004). این افزایش در صفات تعداد دانه، تعداد سنبله، نیتروژن دانه، عملکرد کاه و عملکرد در تیمار ازتوباکتر در گندم نیز مشاهده شده است (فلاح، ۱۳۹۳). باکتری‌های مورداستفاده با تولید هورمون‌های محرک، رشد گیاه را افزایش می‌دهند و با افزایش تقسیمات سلولی سبب افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند. باکتری‌های موجود در کود زیستی ازتِ علاوه بر تثبیت نیتروژن و متعادل کردن آن موجب توسعه‌ی ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه می‌شوند (Khalid *et al.*, 2004). نیتروژن با تسهیل اختصاص ماده خشک بیشتر به بوته سبب افزایش رشد رویشی و فراهم‌سازی بهتر برای استفاده از نور و فتوسنتز بیشتر و درنتیجه رشد بهتر گیاه می‌شود و علاوه بر تثبیت نیتروژن موجب آزادسازی هورمون‌های اکسین و اسید جیبرلیک (Sumbul *et al.*, 2020) و در دسترس شدن جذب عناصر برای گیاه می‌شود و همچنین بیوماس را افزایش می‌دهد (علیخانی و همکاران،۱۳۹۲).

تعداد دانه در کپسول، ظرفیت مخزن گیاه را تعیین می‌کند، درنتیجه تعداد دانه بیشتر گیاه، مخزن بیشتری برای دریافت مواد فتوسنتزی و افزایش سرعت انتقال مواد به مخزن نهایی را به دنبال داشته و درنهایت باعث افزایش عملکرد گیاه شده است (Sumbul et al., 2020; Shaalan, 2005).

ازآنجایی‌که قارچ تریکودرما سبب بهبود رشد در سبزیجات و صیفی‌جات شد، در پژوهش حاضر نیز استفاده از این قارچ برای اولین بار بر روی گیاه سیاه‌دانه موردبررسی قرارگرفته و سبب افزایش شاخص‌های رشدی شده است. لازم به ذکر است کاربرد این قارچ بر روی گیاهان دارویی کمتر مورداستفاده قرارگرفته است علاوه بر آن تریکودرما به‌عنوان آفت‌کش زیستی عمل کرده و با پاتوژن‌ها مقابله می‌کند بنابراین می‌تواند گزینه مناسبی برای کاهش کودهای شیمیایی باشد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: بررسی نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد استفاده از کودهای تلفیقی و شیمیایی سبب افزایش محتوای کلروفیل *a* برگ‌های گیاه سیاه‌دانه می‌شود اما کود زیستی به‌تنهایی سبب کاهش محتوای این نوع کلروفیل شده است. بررسی نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد استفاده از کود زیستی سبب افزایش محتوای کلروفیل *b* شده و استفاده از کود تلفیقی سبب افزایش کاروتنوئید اما کود زیستی، شیمیایی و تریکودرما هر یک به‌تنهایی کاهش کاروتنوئید را سبب شدند. رنگیزه‌های فتوسنتزی از اجزای اصلی کلروپلاست برای دریافت نور و تولید عوامل احیایی هستند و نوعی ارتباط مثبت بین محتوای کلروفیل و میزان فتوسنتز گیاه وجود دارد، به‌طوری‌که با کاهش کلروفیل، فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد (Tian & Lei, 2007). با توجه به نقش ازت در ساختار فتوسنتزی گزارشات حاکی از این است که کود زیستی نیتروژن از طریق کمک به جذب عناصر به‌ویژه نیتروژن و نقش این عنصر در تولید کلروفیل و تأمین آنزیم‌های موردنیاز گیاه، می‌تواند سبب افزایش بافت‌های فتوسنتزی در گیاه شود (Darzi, 2007)، همچنین کود زیستی با افزایش جذب نور خورشید به افزایش میزان کلروفیل کمک می‌کند (Tahami *et al*., 2010; Sifola &Barbieri. 2006).

محتوای پروتئین: در پژوهش حاضر محتوی پروتئین برگ کود زیستی، تلفیقی و شیمیایی و تریکودرما سبب افزایش پروتئین برگ شده‌اند. ازت نقش حیاتی در فعالیت آنزیم‌های سنتز کننده پروتئین دارد، همچنین ساختار اسیدهای آمینه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از طرفی دیگر فعالیت باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن با تأمین بخشی از نیتروژن موردنیاز، کاهش تلفات گیاه و افزایش بازیافت کود نیتروژن را باعث می‌شود افزایش پروتئین دانه ذرت در تیمار با کود زیستی نیتروژن با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (بلوچی،۱۳۹۱).

آنزیم کاتالاز و ترکیبات آنتی‌اکسیدان: ترکیبات فنلی یا پلی فنل‌ها به توجه خواص آنتی‌اکسیدانی برای سلامتی مفید هستند (Pereira *et al*., 2007). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که کاهش میزان محتوای فنل کل دانه و برگ در تیمار به ترتیب از کودهای تریکودرما، شیمیایی، زیستی و تلفیقی مشاهده شده است. مطالعات نشان داده که عوامل مختلفی بر

درصد میزان ترکیبات فنلی در گیاه مؤثر است که ازجمله آن می‌توان به عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی و سیستم تغذیه‌ای گیاه اشاره کرد همچنین زمان برداشت گیاه، بر میزان این ترکیبات مؤثر است. تجمع مواد فنلی، حساس به تنش عناصر غذایی است و میزان کل ترکیبات فنلی با کاهش میزان نیتروژن محیط افزایش می‌یابد. بنابراین، مقادیر اضافی نیتروژن معمولاً رشد را تحریک و از تولید ترکیبات فنلی جلوگیری می‌کند (Omidbaigi & Nobakht, 2001; El-Gendy *et al*., 2013). این کاهش در گوجه‌فرنگی در تیمار با کود تریکودرما (ملکی زیارتی، ۱۳۹۰) نیز مشاهده شده است که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. از طرفی کودهای به‌کاررفته در این پژوهش می‌تواند با تأثیر بر آنزیم‌های PAL، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و بر محتوای ترکیبات فنلی مؤثر واقع شود (Singh *et al*., 2002).

نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاه سیاه‌دانه را نشان می‌دهد که کاتالاز با تأثیر بر آب‌اکسیژنه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان آنزیمی توانسته است شرایط مناسبی را برای رشد گیاه ایجاد کند. در این پژوهش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فنل تأثیر چشمگیری در کاهش رادیکال‌های آزاد نداشته است و در اینجا تنها می‌توان به نقش مهم آنزیم کاتالاز اشاره کرد. نوربخش و همکاران (۱۳۹۲) نیز با مصرف کود نیتروکسین نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری افزایش‌یافته است؛ همچنین تریکودرما باعث افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در گوجه‌فرنگی و افزایش مقاومت به کمبود آب شده است (Mastouri *et al*., 2012).

فیتواسترول دانه: بررسی نتایج به‌دست‌آمده از به‌کارگیری کودهای مختلف بر فیتواسترول کل گیاه سیاه‌دانه نشان داد که استفاده از تمامی کودهای شیمیایی، زیستی، تلفیقی و تریکودرما نسبت به تیمار شاهد موجب افزایش می‌شود. بیشترین افزایش با اعمال کود شیمیایی و بعد از آن به ترتیب تیمار زیستی، تلفیقی و تریکودرما سبب افزایش فیتواسترول دانه شدند. پژوهش حاضر برای اولین بار اثر تیمارهای مختلف کود زیستی ازتوباکتر، کود شیمیایی اوره، قارچ تریکودرما و همچنین تلفیق کود زیستی و شیمیایی و اثر مقایسه‌ای آن‌ها بر روی گیاه سیاه‌دانه را بررسی کرد و نشان داد که تیمارهای نامبرده باعث افزایش انواع فیتواسترول شده است. افزایش جذب نیتروژن در کودهای به‌کاررفته در پژوهش حاضر می‌تواند تبدیل اسیدهای آمینه را به پروتئین افزایش دهد که به دنبال افزایش سنتز پروتئین افزایش سنتز اسیدهای چرب نیز افزایش می‌یابد (Elhanafi *et al*., 2019).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی با به‌کارگیری کودهای زیستی، شیمیایی و... شاهد افزایش در برخی شاخص‌های رشد کمی و کیفی گیاه سیاه‌دانه بوده‌ایم و درمجموع با توجه به اثر کودها بر روی عوامل مختلفی که مطالعه شده است به نظر می‌رسد که برای رشد و نمو و تولید گیاه مهم سیاه‌دانه کاربرد کودهای تلفیقی پاسخ‌های بهتری را به همراه داشته است و استفاده از کودهای تلفیقی و زیستی بازدهی بیشتر را سبب گردیده است.

منابع

بلوچی،۱۳۹۱، تأثیر کود زیستی نیتروژن و فسفر بر عملکرد و اجزای عملکرد ذرت شیرین (*Zea mays*)، مجله‌ی پژوهش‌های تولیدات گیاهی. جلد ۱۹. شماره ۴.

خرمدل. س، کوچکی. ع، نصیری محلات. م، اثر کودهای بیولوژیک بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی سیاه‌دانه، ۱۳۸۹.

شکوه‌فر. ع، خانی. س، ۱۳۹۷. بررسی اثر توأم کودهای زیستیی و شیمیایی فسفر و نیتروژن بر ویژگی‌های کمی و کیفی آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). دو فصلنامه ی علوم به زراعی گیاهی. شماره ۲.

فلاح. ع، مؤمنی. س، شریعتی. ش، ۱۳۹۳. تأثیر کود زیستی و نیتروژن بر عملکرد و اجزاء عملکرد گندم در شرایط گلخانه‌ای. مهندسی زراعی. جلد ۳۷. شماره ۲.

کنعانی الوار. ع، راعی. ی، زهتاب سلماسی. س، نصراله زاده. ص. ۱۳۹۲. بررسی اثر کودهای زیستی و نیتروژنی بر عملکرد و برخی از صفات مورفولوژیکی دو رقم جو بهاره در شرایط دیم. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. جلد ۲۳. شماره ۱.

علیخانی. آ، ایرانپور. آ، نقدی بادی. ح، تغییرات عملکرد زراعی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea (L.) Moench*) تحت تأثیر اوره و کود زیستی، ۱۳۹۲.

ملکی زیارتی. ح، روستایی. ع، اله امینیان. ح، بررسی امکان کنترل زیستی نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی به وسیله قارچ تریکودرما و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه،۱۳۸۸.

منبری. س، علیزاده سالطه. س، بلندنظر. ص، ساریخانی. م. ۱۳۹۶. ارزیابی تاثیر کودهای زیستی و شیمیایی بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و رشد شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*). نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. جلد ۷۲. شماره ۴.

مهتدی. م، میرهادی. م. ج، بهادری. م. ۱۳۹۲. بررسی اثرات کودهای زیستی حاوی باکتریهای تثبیت کننده غیرهمزیست نیتروژن وحل کننده فسفات بر روی صفات کمی وکیفی گندم (*Triticum aestivum*). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. جلد ۱۳. شماره ۴.

نوربخش. ف، چالوی؛ و اکبرپور. ۱۳۹۲، تأثیر کودهای زیستی بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی رزماری.

یوسفی. ا، شریفی. پ. ۱۳۹۶. تأثیر کود نیتروژن و کود زیستی آزوسپیریلوم برازیلنس روی برخی ویژگیهای گندم در منطقه جوزان اصفهان. نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. شماره چهارم.

Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D. and Smith, M. (1998). Crop evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements-FAO irrigation and drainage paper 56. Fao, Rome 300: D05109.

Baral, B.R. and Adhikari, P. (2013). Effect of Azotobacter on growth and yield of maize. SAARC Journal of Agriculture 11: 141-147.

Bhattacharjee, R. and Dey, U. (2014) Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. African Journal Microbiol Research 8: 2332-2342.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Darzi, M. (2007). Evaluation the effects of bio-fertilizers on quantitative and qualitative performance of Fennel for receiving to sustainable agriculture system. Ph. D. thesis. University of Tarbiat Modares. 115 pp.(In Persian).

Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Experimental Botany 32: 93-101.

Duke, J.A. (1983). Handbook of energy crops. Handbook of Energy Crops.

El-Gendy, A., Hegazy, T.A. and El-Sayed, S. (2013). Effect of biofertilizers and/or urea on growth, yield, essential oil and chemical compositions of *Cymbopogon citratus* plants. Journal of Applied Sciences Research, 9: 309-320.

Elhanafi, L., Houhou, M., Rais, C., Mansouri, I., Elghadraoui, L. and Greche, H. (2019). Impact of Excessive Nitrogen Fertilization on the Biochemical Quality, Phenolic Compounds, and Antioxidant Power of *Sesamum indicum* L Seeds. Journal of food Quality 2019:1-6.

Kalidasu, G., Reddy, G.S., Kumari, S.S., Kumari, A.L. and Sivasankar, A. (2017). Secondary volatiles and metabolites from *Nigella sativa* L. seed .Indian Journal of Natural Products and Resources 8:151-158 .

Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Apply Microbiology 96(3):473-480

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids :pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Mastouri, F., Björkman, T. and Harman, G.E. (2012). Trichoderma harzianum enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. Molecular Plant Microbe Interact ions 25: 1264-1271.

Omidbaigi, R. and Nobakht, A. (2001). Nitrogen fertilizer affecting growth, seed yield and active substances of milk thistle (*Silybum marianum*). Pakestan Journal of Biology Science 4(11):1345-1349 .

Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P ,.Andrade, P.B., Ferreira, I.C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chemistry Toxicology 45: 2287-2295.

Sabir, S.M., Hayat, I. and Gardezi, S.D.A. (2003). Estimation of sterols in edible fats and oils. Pakistan Journal of Nutrition 2(3):178-181.

Shaalan, M. (2005). Influence of biofertilizers and chicken manure on growth, yield and seeds quality of (*Nigella sativa* L.) plants .Egyptian Journal of Agricultural Research 83: 811-828.

Sifola, M.I. and Barbieri, G. (2006). Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. Scientia Horticulturae 108: 408-413.

Singh, S.K., Singh, B. and Singh, M.B. (2002). Response of nigella (*Nigella sativa* L.) to seed rate and row spacing. Progressive Agriculture 2: 80-81.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Sumbul, A., Ansari, R.A., Rizvi, R. and Mahmood, I. (2020). Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. Saudi Journal of Biological Sciences 27: 3634.

Tahami, Z.S., Rezvani, M.P. and Jahan, M. (2010). Comparison the effect of organic and chemical fertilizers on yield and essential oil percentage of basil (*Ocimum basilicum* L.). Agroecology 2(1): 70-82.

Tehlan, S., Thakral, K. and Nandal, J. (2004). Effect of Azotobacter on plant growth and seed yield of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). Haryana Journal of Horticultural Science 33(3/4): 287-288.

Tian, X. and Lei, Y.B. (2007). Physiological responses of wheat seedlings to drought and UV-B radiation. Effect of exogenous sodium nitroprusside application. Russian Journal of Plant Physiology 54: 676-682.

Zhu, K.-X., Lian, C.-X., Guo, X.-N., Peng, W .and Zhou, H.-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. Food Chemistry 126: 1122-1126.

Evaluation of the effect of Nitrogen fertilizer and Urea fertilizer on some physiological, phytochemical and antioxidant capacity of *Nigella sativa* L.

F. Hadinejade[1], A. Salimi[2*], M. Chavoushi[3]

Received:2020.9.13
Accepted:2021.1.27

Abstract

In recent years, the use of biofertilizers as an alternative to some chemical fertilizers has been considered. On the other hand, chemical fertilizers increase the yield of agricultural products .Also, replacing part of chemical fertilizer with biological fertilizer can bring good economic benefits for farmers, including reducing soil pollution, increasing soil fertility, and improving plant growth. The purpose of this study is to investigate the effect of Azotobacter, chemical urea, combinations of biological and chemical fertilizers (50/50 and 30/70) and, Trichoderma fungi on the black seeds, so these experiments were randomized complete blocks design and three replications for each test in the field. all treatments of fertilizers increased shoot and root lengths, root fresh weight, root dry weight, shoot dry weight, capsule number, seed number in capsule, 1000 seed weight, capsule number, antioxidant activity, and phytosterol. Bio-fertilizer increased leaf protein contents, leaf catalase enzyme activity, chl *b* content, and phytosterol, combinations of biological and chemical fertilizers increased chl *a* content, Total chlorophyll, leaf and seed protein content. Trichoderma increased seed protein content. Bio-fertilizer and combinations of biological and chemical fertilizers provided plant nutrition and increased growth. Biofertilizers in form of *a* combination of biological and chemical fertilizers reduced the excessive consumption of chemical fertilizers and the pollution caused by it and it will lead to better performance. According to the available results, combined fertilizer treatments and Trichoderma fungi had the greatest effect on the measured parameters.

Keywords: *Azotobacter, Trichoderma, Nigella sativa L., Biofertilizer, Phytosterol*

1- Graduated MSc Student, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Assistance Professor of Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
*(Corresponding author: Salimi@khu.ac.ir)
3- Graduated PhD student, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Content

Effect of nitrogen and nano nitrogen fertilizers on corm colchicine and phenolic compounds of *Colchicum speciosum* from three regions of Mazandaran
M. Babaei Naiej, M. Peyvandi, H. Abbaspour, Z. Noormohammadi, S. Arbabian...……23

The Effect of Mycorrhiza and Nutrients on Some Pistachio Seed characters in Interaction with *Phytophtora drescleri*
E. Babzan, M. Maleki, J. Gholamnezhad, F. Naserinasab……..……....50

Determining the amount of some chemical compounds of the dominant species of brown algae in Lengeh port, Hormozgan province of Iran
H. Jafari, F. Rafiee, A. Ashja Ardalan……..……..69

Evaluation of the aromatic amino acids microenvironments of zinc-denatured horseradish peroxidase; second- derivatives spectra analysis
M. R. Rajabi, N. Hadizadeh Shirazi...……82

Development of software of measuring the surface area of the leaves and comparing it with conventional methods
H. Sharifnasab, F.Abbasi……...……94

Evaluation of Biomass and Total Carotenoids Content of *Deinococcus radiodurans* R1 in Response to Different Carbon and Nitrogen Sources
A. Salehi Bakhtiyari, Z. Etemadifar, M. S. Borhani……...……..……..…111

Comparision of synthesis phenolic compounds and extracted from barnyard grass weed (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv) on morphological and biochemical characteristics of rice seedlings- Domsia cultivar
E. Gholamalipour Alamdari, A. Ghorbani, H. Sabouri, M. Habibi, A. Ataie……....……..…128

Effects of Escitalopram on sex steroids and oocyte ultrastructure in three spot Gourami after increasing Dopamine level By Bromocriptine injection
M. S. Hosseini Jebeli, T. Naji, H. Hosseinzadeh Sahafi……..145

Evaluation the Effect of Coronatine Pretreatment on Zinc Oxide Stress Synthesized by Olive on Soybean plant
Sh. Hashemi Shahraki, F. Mohamadhasani……....167

Evaluation of the effect of Nitrogen fertilizer and Urea fertilizer on some physiological, phytochemical and antioxidant capacity of *Nigella sativa* L.
F. Hadinejade, A. Salimi, M. Chavoushi……...……..186

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Volume 34, Issue 2, Ser. 68, Summer 2021

Alzahra University - Vice Chancellery for Research
Chief Editor: M. Soudi, Professor of Alzahra University
Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor of Alzahra University
Associate Editor: P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University
Associate Editor: A. Abdi Aali, Associate Professor of AlZahra University

Editorial Boards
M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University
N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
F. Darvishi, Professor of Alzahra University
M. Seyyedi , Associate Professor of Tehran University
A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University
A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University
P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University
Z. Minochehr, Associate Professor Genetic Research Center of Tehran University
T. Vali Nassab Pouri, Research Professor of Iranian Fisheries Science Research Institute

International Editorial Board
H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn
Sh. Shahabi, Professor, Research Director of Highland Pharmaceutical Company and Associate Professor of South West Nechropathy Medical College
Executive Manager: Sh. Borjian
Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research
English & Persian Editor: Masoumeh Aslanzadeh
Printing and Binding: Graduate Publishing
Circulation: 10 copies
Publication Frequency: Quarterly
In order to have access to the table of Contents and abstracts contact:
Address: Alzahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak Sq, Tehran, 1993891176, Iran.
Tel/Fax:021- 85692205
Website: http://journals.alzahra.ac.ir/jab
ISSN: 1607- 9884
Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir