

مطالعه فیتوشیمیایی گونه‌های *Plantago lanceolata* و *Plantago major* در شمال ایران^۱

سیده سمیرا امینی نسب^۱، آرمان محمودی اطاقوری^۲، احسان نظیفی^{۳*}

چکیده

Plantago lanceolata L. و *Plantago major* L. از گونه‌های فراوان جنس بارهنگ در شمال ایران بوده که به‌عنوان گونه‌های دارویی با ارزش شناخته شده‌اند. از اینرو، در این پژوهش، هشت جمعیت از این دو گونه از مناطق مختلف شمال کشور جمع‌آوری و از لحاظ فیتوشیمیایی بررسی شدند. نتایج نشان داد به‌طور میانگین میزان متابولیت‌های سنجش شده در گونه *P. lanceolata* بیشتر از گونه *P. major* بود. تفاوت میانگین‌ها برای فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول از لحاظ آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. آنالیز اسانس جمعیت‌های ماسوله نشان داد که ترکیبات شاخص گونه *P. major* شامل پولگون و پالمیتیک اسید و ترکیبات شاخص گونه *P. lanceolata* شامل دی-کارون و آدیپیک اسید دی‌اکتیل‌استر بودند. این نتایج به انتخاب گونه‌ها و جمعیت‌های دارای محتوای متابولیتی بیشتر و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کمک شایانی خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بارهنگ، پولگون، دی-کارون، متابولیت‌های گیاهی

۱- کارشناسی ارشد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

* (نویسنده مسئول: nazifiehsan@yahoo.com / e.nazifi@umz.ac.ir)

^۱ این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجو سیده سمیرا امینی‌نسب با راهنمایی دکتر آرمان محمودی و دکتر احسان نظیفی اعضای هیئت علمی دانشگاه مازندران بوده است.

مقدمه

گیاهان جنس بارهنگ (*Plantago* L.) در کشاورزی و کشت جهت مصارف دارویی قدمتی طولانی دارند. همچنین بارهنگ به دلیل خواص پایدارکنندگی، سوسپانسیونی و امولسیون کنندگی در صنایع آرایشی-بهداشتی، نساجی، کاغذ سازی، چاپ و تهیه واکس بسیار مورد توجه است (Velasco-Lezama et al., 2006; Beara et al., 2012).

شمال ایران، به عنوان یک ذخیره گاه ژنتیکی و زیست محیطی، گنجینه گران‌بهایی از گونه‌های دارویی با خواص منحصربه‌فرد است. دو گونه فراوان از جنس بارهنگ (*Plantago* L.) در شمال ایران، گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* بوده که همه بخش‌ها شامل برگ، ریشه و دانه آنها مصارف دارویی دارند، از این رو به‌عنوان گونه‌های دارویی با ارزش دارای اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی شناخته شده‌اند (Patzak & Rechinger, 1965; Tutel, 1982; Samuelsen, 2000; Mohsenzadeh et al., 2007; Beara et al., 2012; Karakaş et al., 2012; Gonçalves & Romano, 2016; Aminian et al., 2018; Amiri et al., 2018; Hassemer, 2018).

بارهنگ کبیر (*Plantago major* L.) گیاهی چند ساله، کوتاه یا متوسط تا بلند به ارتفاع ۳۱-۱۴ سانتی‌متر و گاهی تا ۷۰ سانتی‌متر، بدون ساقه مشخص و دارای ریزوم است. برگ‌ها طوقه‌ای، خیزان یا افراشته و دم‌برگ‌دار بوده، پهنک بیضی یا تخم مرغی یا دایره‌ای با حاشیه صاف یا کمی کنگره‌ای-دندانه‌ای، دارای ۷-۳ رگبرگ مشخص، فاقد کرک یا دارای کرک‌های اندک است. دمگل آذین افراشته، سنبله استوانه‌ای باریک، میوه کپسول تخم مرغی و دارای ۱۰-۶ و ندرتا تا ۳۰ دانه کوچک و سیاه رنگ بوده و زمان گلدهی آن از اواسط بهار تا اواخر تابستان است (Tutel, 1982; Janighorban, 1995).

بارهنگ سرنیزه‌ای با نام علمی *Plantago lanceolata* L. گیاهی چند ساله به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر، بدون ساقه‌ای مشخص و دارای ریزوم کوتاه بدون انشعاب یا انشعابات کم است. برگ‌ها طوقه‌ای، افراشته و دم‌برگ‌دار بوده، پهنک نوک تیز یا بیضی باریک، از قاعده باریک شونده، حاشیه صاف یا دارای دندانه‌های کوچک، دارای پنج رگبرگ مشخص، با کرک‌های پراکنده یا بدون کرک است. دم گل آذین افراشته با کرک‌های پراکنده سفید، سنبله استوانه‌ای مخروطی کوتاه یا تقریباً کروی-متراکم، میوه کپسول تخم مرغی و دارای دو دانه قهوه‌ای روشن و بزرگتر از بارهنگ کبیر بوده و زمان گلدهی آن در بهار تا اوایل تابستان است (Tutel, 1982; Janighorban, 1995).

مطالعات فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف جنس بارهنگ اغلب به محتوای فنولی، فلاونوئیدی، فنیل پروپانوئید گلیکوزیدی، ایروئیدی و اثرات دارویی آنها پرداخته است. همچنین برخی مطالعات به حضور ترپن‌ها، آلکالوئیدها، لیپیدها و قندها در این جنس پرداخته‌اند (Nostro et al., 2000; Gálvez et al., 2005; Stiles et al., 2007; Makhmudov et al., 2011; Janković et al., 2012; Beara et al., 2012; Ferrazzano et al., 2015). در یک بررسی نشان داده شد که گونه *P. major*

میزان فنول کل کمتری از گونه‌های *P. holosteam*, *P. maritima*, *P. media* و فلاونوئید کمتری از گونه‌های *P. argentea*, *P. major*, *P. lanceolata* دارد (Beara et al., 2009). مقایسه ترکیبات پلی فنولی در برخی گونه‌های جنس بارهنگ نشان داد که گونه *P. lanceolata* بیشترین میزان فنول، فنیل پروپانئوئید گلیکوزید و استوزید را در مقایسه با گونه‌های *P. schwarzenbergiana*, *P. reniformis*, *P. atrata*, *P. coronopus* و *P. holosteam* داشته در حالیکه گونه *P. holosteam* بیشترین مقدار فلاونوئید و ایلوئید را داشته است (Janković et al., 2012). مقایسه گونه‌های *P. afra*, *P. coronopus*, *P. lagopus*, *P. lanceolata* و *P. serraria* نشان داد که گونه *P. lagopus* بیشترین میزان فنول و گونه *P. afra* بیشترین میزان فلاونوئید، فنیل پروپانئوئید گلیکوزید و ایلوئید را داشته است (Gálvez et al., 2005).

تحقیقات اندکی در رابطه با تنوع فیتوشیمیایی اجزای اسانس و مقایسه متابولیت‌های موجود در گونه‌های جنس بارهنگ صورت گرفته (Chung et al., 2008; Karakaş et al., 2012; Seifi et al., 2014; Bajer et al., 2016) و در مورد برخی گونه‌ها مانند *P. major*، گزارشی از آنالیز اسانس مشاهده نشده است. متابولیت‌های متنوعی از خانواده ترپنوئیدها، اسیدهای چرب، الکل‌های چرب و آلکان‌ها در اغلب اسانس‌های حاصل از گونه‌های مختلف گزارش شده است. بطوریکه نتایج ترکیبات ارزشمندی مانند تیمول و ۲-و ۴-دکادینال از بذرها، گونه *P. ovata* (Seifi et al., 2014)، ۳-متیل‌آندکان و ۱-اتیل-۲-متیل‌سیکلوپنتانول در گونه *P. amplexicaulis* (Al-Mazroa et al., 2012)، ۳-پروپ-۲-انیل بایسکلو(۲ و ۱)هپتان، ۱-دودکان-۳-آل، ۳-اتیل‌فنول و نوناکوزان در گونه *P. boissieri* (Al-Mazroa et al., 2012) و لینالول، منتن-۲ و ۳-دیول و فنچول در گونه *Plantago asiatica* (Chung et al., 2008) را نشان داد. اسیدهای چربی نظیر لینولئیک اسید و اولئیک اسید در گونه *P. ovata* (Seifi et al., 2014) و پالمیتیک اسید و میریستیک اسید در گونه *P. amplexicaulis* (Al-Mazroa et al., 2012) نیز گزارش شدند.

از آنجائیکه *P. lanceolata* و *P. major* از گونه‌های فراوان جنس بارهنگ در شمال ایران بوده که مصارف دارویی دارند، لذا مطالعه فیتوشیمیایی آنها جهت مصارف غذایی و دارویی حائز اهمیت است. از اینرو مطالعه حاضر، برای اولین بار به مقایسه فیتوشیمیایی جمعیت‌های دو گونه *P. lanceolata* و *P. major* از لحاظ میزان فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین، ساپونین، کلروفیل a و b، کاروتنوئید، قندهای محلول، پروتئین کل و متابولیت‌های موجود در اسانس آنها پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد هشت جمعیت از گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* از رویشگاه‌های طبیعی آن‌ها در هشت منطقه از شمال کشور در شهریور ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید (جدول ۱). با استفاده از کلیدهای رایج گیاه‌شناسی شامل فلورا ایرانیکا (Patzak & Rechinger, 1965) و فلور ایران (Janighorban, 1995)، هویت گونه‌های مورد نظر تایید و برای انجام مطالعات مورد استفاده قرار

گرفتند. جهت حفظ ساختار شیمیایی متابولیت‌های موجود، همه نمونه‌های جمع آوری شده به صورت یکسان، در شرایط تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد خشک و تا زمان استفاده در پاکت‌های مخصوص و در یخچال نگهداری شدند.

جدول ۱: مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major*

گونه گیاهی	رویشگاه	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	ارتفاع (متر)
<i>P. major</i>	لغور	۵۶°۱۲'۳۶"	۱۸°۴۹'۵۲"	۳۶۱
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	ساری	۵۸°۱۵'۳۶"	۳۹°۱۳'۵۳"	۳۷۰
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	زیارت	۳۳°۴۳'۳۶"	۱۲°۲۹'۵۴"	۸۱۴
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	ماسوله	۲۰°۰۹'۳۷"	۱۵°۵۹'۴۸"	۱۰۱۷
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	زردگل	۳۵°۵۸'۳۵"	۳۵°۰۱'۵۳"	۱۰۲۰
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	ورسک	۳۲°۵۵'۳۵"	۱۶°۵۹'۵۲"	۱۳۷۸
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	پلپا	۰۶°۵۸'۳۵"	۳۰°۰۲'۵۳"	۱۴۲۴
<i>P. lanceolata</i>				
<i>P. major</i>	شوراب	۳۸°۵۱'۳۵"	۵۸°۵۷'۵۲"	۲۰۵۱
<i>P. lanceolata</i>				

در این پژوهش میزان فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین، ساپونین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و قندهای محلول کل در برگ و میزان پروتئین کل در بذر با روش اسپکتروفوتومتری (با دستگاه UV-VIS Spectrophotometer SU 6100) در همه جمعیت‌ها اندازه‌گیری گردید. آنالیز اسانس اندام هوایی با روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (با دستگاه GC Agilent 7890 A-MS Agilent 5975 C) در مورد جمعیت ماسوله انجام شد.

سنجش فنول و فلاونوئید کل

پس از تهیه عصاره متانولی ۸۰ درصد از برگ‌ها، فنول کل بر اساس روش رنگ سنجی Folin-ciocalteu و فلاونوئید کل بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شدند. جهت سنجش فنول، به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۱/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و پس از ۳۰ دقیقه توقف در تاریکی، جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف گالیک اسید، میزان فنول کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ بیان گردید (Ainsworth & Gillespie, 2007). جهت تعیین میزان فلاونوئید، ابتدا به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۸۰ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه توقف در

تاریکی، جذب هر نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف روتین، میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ بیان گردید (Akkol *et al.*, 2008).

سنجش آنتوسیانین کل

ابتدا عصاره‌گیری برگ‌های گیاه با متانول اسیدی (متانول و کلریدریک اسید ۱:۹۹) انجام شد و بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی و در دمای یخچال قرار داده شد. پس از اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، از ضریب خاموشی (ϵ) $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ۳۳۰۰۰ برای محاسبه غلظت آنتوسیانین استفاده شد (Masukasu *et al.*, 2003).

سنجش ساپونین کل

طبق روش وانیلین-اسید سولفوریک، ابتدا عصاره اتانولی ۲۰ درصد از برگ‌های گیاه تهیه و با دی اتیل اتر مخلوط و فاز پایینی حاوی آب جداسازی و با n- بوتانل مخلوط شد. سپس فاز بالایی حاوی n- بوتانل جداسازی و با کلرید سدیم ۵ درصد مخلوط گردید. در نهایت فاز بالایی حاوی n-بوتانل جمع‌آوری و خشک شد. بعد از حل نمودن عصاره در متانول، به ۲۰۰ میکرولیتر از آن، ۲۰۰ میکرولیتر وانیلین ۸ درصد و یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۴ نانومتر خوانده شد. جهت تعیین میزان ساپونین کل از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف دیوسژنین استفاده و نتیجه بر اساس میلی گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بیان شد (Hiai *et al.*, 1976; Madland, 2013).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

پس از عصاره‌گیری برگ‌ها با استون ۸۰ درصد و صاف نمودن آنها، جذب هر نمونه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر، ۶۴۵ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید کل محاسبه و در نهایت بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ بیان گردید (Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chlorophyll } a = (12.7 * A_{663}) - (2.69 * A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll } b = (22.9 * A_{645}) - (4.68 * A_{663})$$

$$\text{Carotenoids} = [(1000 * A_{470}) - (1.82 * chl. a) - (85.02 * chl. b)]/198$$

سنجش قندهای محلول کل

پس از عصاره‌گیری برگ‌ها با بافر فسفات پتاسیم (۰/۱ مولار و pH ۶/۸) از روش رنگ سنجی فنول-اسید سولفوریک جهت تعیین میزان قندهای محلول استفاده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. بعد از خنک شدن مخلوط واکنش، جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف گلوکز، میزان قندهای محلول بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ بیان گردید (Dubois, 1956).

سنجش پروتئین کل

برای سنجش پروتئین از بذره‌های جمعیت‌های جمع‌آوری شده استفاده شد. استخراج پروتئین با استفاده از بافر Tris-HCl (pH ۸) و PMSF (۰/۱ مولار) انجام و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، محلول رویی برداشته شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره حاصل با یک میلی‌لیتر از محلول برادفورد مخلوط و جذب هر یک از نمونه‌ها پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۴۴ نانومتر خوانده شد. با استفاده از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی (BSA) نمودار استاندارد تهیه گردید و در نهایت میزان پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بذر بیان شد (Bradford, 1976).

بررسی اسانس اندام هوایی

اندام هوایی جمعیت‌های *P. lanceolata* و *P. major* جمع‌آوری شده از منطقه ماسوله با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند. به این منظور از ۱۰ گرم نمونه خشک پودر شده به‌همراه ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. بعد از حدود سه ساعت عمل تقطیر، مقدار اندک اسانس بدست آمده به همراه آب تقطیر شده جمع‌آوری و با حلال آلی n-هگزان و رتکس گردید. پس از جدایی کامل این دو فاز، بخش n-هگزانی جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شد. آنالیز و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS دارای ستون DB5 با طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر انجام شد. دمای ستون به این صورت بود که در چهار دقیقه ابتدایی در ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت، سپس با سرعت شش درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و در ادامه با سرعت چهار درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا دمای ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در نهایت ۲۰ دقیقه در این دما باقی ماند. از هلیوم به‌عنوان گاز حامل و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق، منبع یونی و Quadrupole به ترتیب ۲۷۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و پتانسیل یونیزاسیون دستگاه Mass برابر با ۷۰ الکترون ولت بود. شناسایی ترکیبات

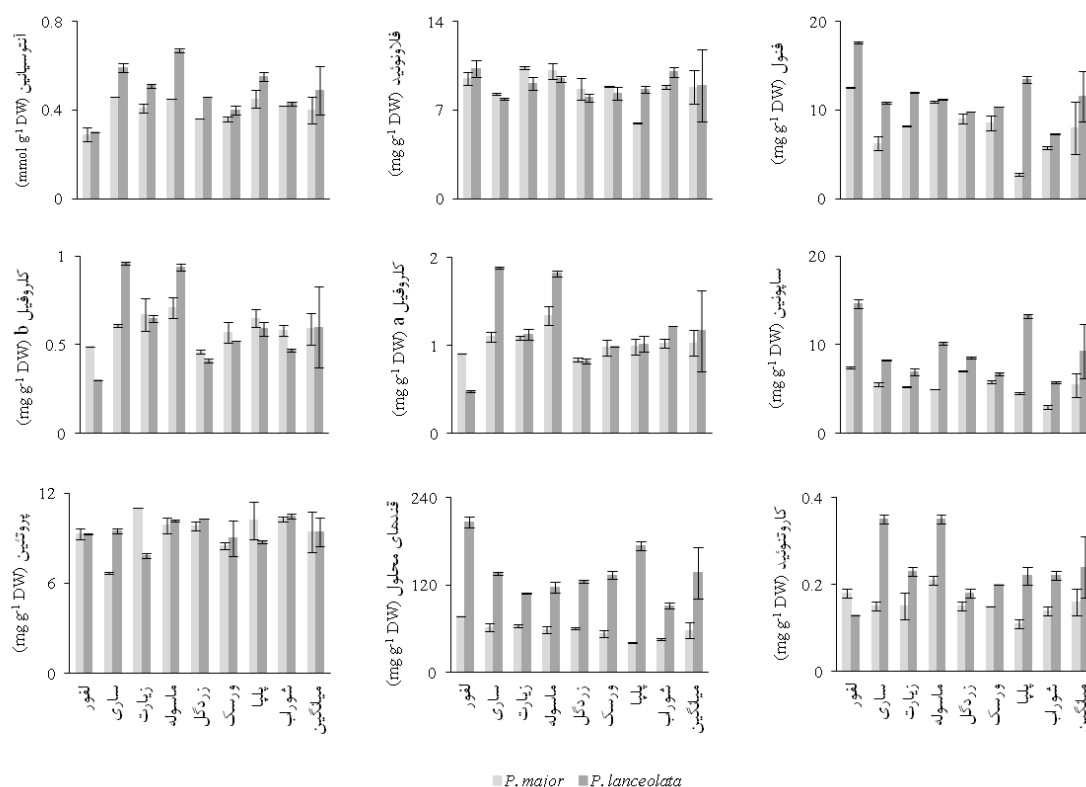
تشکیل دهنده اسانس با بررسی طیف‌های جرمی و مسیر فراگمانتاسیون آنها و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد در بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه (Nist08 & Wiley7n) انجام گرفت (Adams, 2007; Yahyaabadi et al., 2019).

آنالیزهای آماری

داده‌های حاصل از سنجش‌های اسپکتروفتومتری با روش آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) برای مقایسه میانگین بین جمعیت‌ها و با روش آزمون t گروه‌های مستقل برای مقایسه میانگین بین گونه‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SPSS-18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در این پژوهش، هشت جمعیت از گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* از مناطق مختلف در شمال ایران شامل لفور، ساری، زیارت، ماسوله، زردگل، ورسک، پلپا و شوراب از لحاظ میزان برخی متابولیت‌های گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و مقایسه شدند.



شکل ۱: مقایسه متابولیت‌های *P. lanceolata* و *P. major* در جمعیت‌های مختلف و مقایسه میانگین جمعیت‌های هر گونه.

مقایسه متابولیت‌های گیاهی گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* در مناطق مورد مطالعه نشان داد که همه جمعیت‌های گونه *P. lanceolata* میزان فنول، آنتوسیانین، ساپونین و قندهای محلول بیشتری از جمعیت‌های گونه *P. major* دارند. مقایسه کارتنوئید کل نیز نشان داد که در اغلب جمعیت‌ها، گونه *P. lanceolata* حاوی میزان بیشتری از این متابولیت نسبت به گونه *P. major* است (جدول ۲ و ۳، شکل ۱).

جدول ۲: مقایسه میزان متابولیت‌ها در جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major*

نام گونه	منطقه	فنول	فلاونوئید	آنتوسیانین	ساپونین
<i>P. major</i>	لفور	۱۲,۵۷±۰,۰۶ ^c	۹,۴۹±۰,۰۵ ^{bc}	۰,۲۹±۰,۰۳ ⁱ	۷,۴۰±۰,۱۲ ^e
<i>P. lanceolata</i>		۱۷,۶۳±۰,۱۴ ^a	۱۰,۲۸±۰,۰۶ ^{Δa}	۰,۳۰±۰,۰۰ ⁱ	۱۴,۶۲±۰,۵۴ ^a
<i>P. major</i>	ساری	۶,۲۶±۰,۰۸ ^j	۸,۲۸±۰,۰۵ ^{efg}	۰,۴۶±۰,۰۰ ^e	۵,۵۴±۰,۲۲ ^{gh}
<i>P. lanceolata</i>		۱۰,۸۰±۰,۱۲ ^{de}	۷,۹۰±۰,۰۶ ^g	۰,۵۹±۰,۰۲ ^b	۸,۲۵±۰,۰۶ ^d
<i>P. major</i>	زیارت	۸,۲۲±۰,۰۳ ^h	۱۰,۳۴±۰,۱۱ ^a	۰,۴۱±۰,۰۲ ^g	۵,۲۶±۰,۰۴ ^{hi}
<i>P. lanceolata</i>		۱۲,۰۱±۰,۱۱ ^c	۹,۱۰±۰,۰۵ ^{cd}	۰,۵۱±۰,۰۱ ^d	۶,۹۰±۰,۰۳ ^f
<i>P. major</i>	ماسوله	۱۰,۹۴±۰,۱۵ ^{de}	۱۰,۱۰±۰,۰۶ ^{ab}	۰,۴۵±۰,۰۰ ^{ef}	۴,۹۷±۰,۰۴ ⁱ
<i>P. lanceolata</i>		۱۱,۲۰±۰,۰۳ ^d	۹,۴۷±۰,۰۲ ^{bc}	۰,۶۷±۰,۰۱ ^a	۱۰,۱۲±۰,۱۶ ^c
<i>P. major</i>	زردگل	۹,۰۴±۰,۰۵ ^g	۸,۶۷±۰,۰۸ ^{def}	۰,۳۶±۰,۰۰ ^h	۷,۰۴±۰,۰۴ ^f
<i>P. lanceolata</i>		۹,۸۲±۰,۰۱ ^f	۷,۹۸±۰,۰۳ ^{fg}	۰,۴۶±۰,۰۰ ^e	۸,۵۷±۰,۰۸ ^d
<i>P. major</i>	ورسک	۸,۵۸±۰,۰۸ ^{gh}	۸,۸۵±۰,۰۵ ^{cde}	۰,۳۶±۰,۰۱ ^h	۵,۸۱±۰,۱۵ ^g
<i>P. lanceolata</i>		۱۰,۳۵±۰,۰۱ ^{ef}	۸,۳۱±۰,۰۵ ^{efg}	۰,۴۰±۰,۰۲ ^g	۶,۶۹±۰,۱۵ ^f
<i>P. major</i>	پلیا	۲,۷۴±۰,۱۳ ^k	۶,۰۲±۰,۰۴ ^h	۰,۴۵±۰,۰۴ ^{ef}	۴,۵۳±۰,۱۱ ^j
<i>P. lanceolata</i>		۱۳,۴۴±۰,۰۳ ^b	۸,۶۶±۰,۰۲ ^{def}	۰,۵۵±۰,۰۲ ^c	۱۳,۲۴±۰,۰۲ ^b
<i>P. major</i>	شوراب	۵,۷۸±۰,۱۷ ^j	۸,۸۵±۰,۱۷ ^{cde}	۰,۴۲±۰,۰۰ ^{fg}	۲,۹۷±۰,۱۸ ^k
<i>P. lanceolata</i>		۷,۳۲±۰,۰۱ ⁱ	۱۰,۰۳±۰,۰۳ ^{ab}	۰,۴۳±۰,۰۱ ^{fg}	۵,۸۰±۰,۱۱ ^g

مقادیر، میانگین ± انحراف معیار سه اندازه‌گیری هستند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، از نظر آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه با هم اختلاف ندارند. فنول، فلاونوئید و ساپونین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ و آنتوسیانین بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن خشک ($\text{mmol g}^{-1} \text{DW}$) برگ بیان شدند.

اهمیت دارویی گیاهان جنس بارهنگ بویژه گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* در سراسر دنیا شناخته شده است. گزارش‌ها اشاره دارند به اینکه ارزش دارویی این گیاهان در ارتباط با ترکیبات فعال زیستی موجود در آنها نظیر ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، ایریدوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و ... است (Samuelsen, 2000; Bazzaz & Harirzadeh, 2003; Ferrazzano et al., 2015; Gonçalves & Romano, 2016; Matini et al., 2017; Adom et al., 2017; Aminian et al., 2018).

جدول ۳: مقایسه میزان متابولیت‌ها در جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major*

نام گونه	منطقه	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	قندهای محلول	پروتئین
<i>P. major</i>	لفور	۰٫۹۱±۰٫۰۰ ^{gh}	۰٫۴۹±۰٫۰۰ ^g	۰٫۱۸±۰٫۰۱ ^e	۷۷٫۲۰±۰٫۲۷ ^h	۹٫۲۹±۰٫۳۵ ^{defg}
<i>P. lanceolata</i>		۰٫۴۸±۰٫۰۱ ⁱ	۰٫۳۰±۰٫۰۰ ⁱ	۰٫۱۳±۰٫۰۰ ^f	۲۰٫۶۴±۷٫۲۹ ^a	۹٫۲۹±۰٫۰۱ ^{defg}
<i>P. major</i>	ساری	۱٫۱۰±۰٫۰۶ ^{de}	۰٫۶۱±۰٫۰۱ ^{cde}	۰٫۱۵±۰٫۰۱ ^f	۶۲٫۲۰±۵٫۳۰ ⁱ	۶٫۷۰±۰٫۰۹ ⁱ
<i>P. lanceolata</i>		۱٫۸۹±۰٫۰۱ ^a	۰٫۹۶±۰٫۰۱ ^a	۰٫۳۵±۰٫۰۱ ^a	۱۳۶٫۳۹±۲٫۳۶ ^c	۹٫۵۰±۰٫۱۵ ^{cdef}
<i>P. major</i>	زیارت	۱٫۰۹±۰٫۰۲ ^{de}	۰٫۶۷±۰٫۰۹ ^{bc}	۰٫۱۵±۰٫۰۳ ^f	۶۴٫۳۹±۲٫۴۶ ⁱ	۱۱٫۰۱±۰٫۰۰ ^a
<i>P. lanceolata</i>		۱٫۱۳±۰٫۰۶ ^{cd}	۰٫۶۵±۰٫۰۲ ^{cd}	۰٫۲۳±۰٫۰۱ ^b	۱۰۹٫۲۳±۰٫۷۰ ^f	۷٫۸۶±۰٫۱۷ ^h
<i>P. major</i>	ماسوله	۱٫۳۴±۰٫۱۱ ^b	۰٫۷۱±۰٫۰۶ ^b	۰٫۲۱±۰٫۰۱ ^{bc}	۵۸٫۸۲±۵٫۲۵ ^{ij}	۹٫۸۷±۰٫۵۲ ^{bcde}
<i>P. lanceolata</i>		۱٫۸۲±۰٫۰۳ ^a	۰٫۹۴±۰٫۰۲ ^a	۰٫۳۵±۰٫۰۱ ^a	۱۱۷٫۳۸±۷٫۷۷ ^e	۱۰٫۱۸±۰٫۰۸ ^{abcd}
<i>P. major</i>	زردگل	۰٫۸۴±۰٫۰۲ ^h	۰٫۴۶±۰٫۰۱ ^{gh}	۰٫۱۵±۰٫۰۱ ^f	۶۰٫۷۵±۱٫۳۹ ^{ij}	۹٫۸۱±۰٫۲۸ ^{bcde}
<i>P. lanceolata</i>		۰٫۸۲±۰٫۰۳ ^h	۰٫۴۱±۰٫۰۱ ^h	۰٫۱۸±۰٫۰۱ ^{de}	۱۲۵٫۲۰±۲٫۶۳ ^d	۱۰٫۳۱±۰٫۰۰ ^{abc}
<i>P. major</i>	ورسک	۰٫۹۸±۰٫۰۹ ^{fg}	۰٫۵۷±۰٫۰۶ ^{ef}	۰٫۱۵±۰٫۰۰ ^f	۵۳٫۴۶±۴٫۲۹ ^{jk}	۸٫۴۸±۰٫۳۴ ^{gh}
<i>P. lanceolata</i>		۰٫۹۹±۰٫۰۰ ^{fg}	۰٫۵۲±۰٫۰۰ ^{fg}	۰٫۲۰±۰٫۰۰ ^{cd}	۱۳۳٫۹۸±۵٫۵۲ ^c	۹٫۰۱±۱٫۲۰ ^{efg}
<i>P. major</i>	پلپا	۰٫۹۹±۰٫۰۹ ^{fg}	۰٫۶۵±۰٫۰۵ ^{cd}	۰٫۱۱±۰٫۰۱ ^g	۴۰٫۸۲±۰٫۶۴ ^l	۱۰٫۱۹±۱٫۲۵ ^{abcd}
<i>P. lanceolata</i>		۱٫۰۲±۰٫۰۹ ^{ef}	۰٫۵۹±۰٫۰۴ ^{de}	۰٫۲۲±۰٫۰۲ ^b	۱۷۴٫۱۶±۶٫۱۶ ^b	۸٫۷۵±۰٫۱۰ ^{fg}
<i>P. major</i>	شوراب	۱٫۰۳±۰٫۰۵ ^{ef}	۰٫۵۸±۰٫۰۳ ^{de}	۰٫۱۴±۰٫۰۱ ^f	۴۶٫۳۹±۱٫۶۱ ^{kl}	۱۰٫۲۶±۰٫۱۷ ^{abc}
<i>P. lanceolata</i>		۱٫۲۲±۰٫۰۰ ^c	۰٫۴۷±۰٫۰۱ ^{gh}	۰٫۲۲±۰٫۰۱ ^b	۹۱٫۹۳±۴٫۱۸ ^g	۱۰٫۴۹±۰٫۱۸ ^{ab}

مقادیر، میانگین ± انحراف معیار سه اندازه‌گیری هستند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت، از نظر آماری با آزمون دانکن (در نرم افزار SPSS) در سطح معنی‌داری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه با هم اختلاف ندارند. کلروفیل a و b، کاروتنوئید و قندهای محلول بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ و مقادیر پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بذر بیان شدند.

ترکیباتی نظیر فنول، فلاونوئید، آنتوسیانین و کاروتنوئیدها، که در مطالعه حاضر نیز بررسی شده‌اند، دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد هستند (Mirzaei et al., 2011). بررسی‌ها نشان داده که مطالعات زیادی به حضور چنین ترکیباتی بویژه ترکیبات فنولی و رابطه مستقیم آنها با اثرات آنتی اکسیدانی در گونه‌های جنس بارهنگ اشاره داشته است (Samuelsen, 2000; Nostro et al., 2000; Pourmorad et al., 2006; Beara et al., 2009; Ferrazzano et al., 2015). مطالعات زیادی نیز به اثرات آنتی باکتریال و ضد توموری گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* اشاره داشته‌اند (Kobeasy et al., 2011; Kolak et al., 2011; Dalar et al., 2012; Karakaş et al., 2012; Mehni & Shahdadi, 2014). در این پژوهش نیز مقادیر قابل ملاحظه‌ای از این ترکیبات در این دو گونه گزارش شده که گونه *P. lanceolata* به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری از این ترکیبات را تولید می‌نماید (جدول ۴). مطالعات پیشین و نتایج این پژوهش اشاره دارد به اینکه گونه *P. lanceolata* را می‌توان به‌عنوان یک منبع مهم و سرشار از ترکیبات فنولی، آنتوسیانینی، ساپونینی و کاروتنوئیدی معرفی نمود که به واسطه حضور این ترکیبات، احتمالاً پتانسیل آنتی اکسیدانی و ارزش دارویی بالایی خواهند داشت؛ اگرچه بررسی‌های دقیق‌تری جهت شناسایی متابولیت‌های شاخص موجود در این گونه‌ها و اثرات آنها مورد نیاز است.

جدول ۴: مقایسه میانگین مقدار متابولیت‌ها در گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major*

متابولیت‌های گیاهی	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>	تفاوت میانگین‌ها	p value
فنول	۸,۰۲±۲,۹۷	۱۱,۵۷±۲,۸۸	۳,۵۵±۰,۸۵	۰,۰۰۰*
فلاونوئید	۸,۸۲±۱,۳۳	۸,۹۶±۰,۹۳	۰,۱۴±۰,۳۳	۰,۶۷۴
آنتوسیانین	۰,۴۰±۰,۰۶	۰,۴۹±۰,۱۱	۰,۰۹±۰,۰۳	۰,۰۰۱*
ساپونین	۵,۴۴±۱,۳۴	۹,۲۷±۳,۰۵	۳,۸۳±۰,۶۸	۰,۰۰۰*
کلروفیل a	۱,۰۳±۰,۱۵	۱,۱۷±۰,۴۶	۰,۱۴±۰,۱۰	۰,۱۷۴
کلروفیل b	۰,۵۹±۰,۰۹	۰,۶۰±۰,۲۳	۰,۰۱±۰,۰۵	۰,۸۳۹
کاروتنوئید	۰,۱۶±۰,۰۳	۰,۲۴±۰,۰۷	۰,۰۸±۰,۰۲	۰,۰۰۰*
قندهای محلول	۵۸,۰۰±۱۱,۰۹	۱۳۶,۸۴±۳۵,۵۴	۷۸,۸۴±۷,۶۰	۰,۰۰۰*
پروتئین	۹,۴۵±۱,۳۵	۹,۴۲±۰,۹۳	۰,۰۳±۰,۳۳	۰,۹۳۵

مقادیر آنتوسیانین با واحد میلی‌مول بر گرم وزن خشک ($\text{mmol g}^{-1} \text{DW}$) برگ، مقادیر پروتئین با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بذر و سایر متابولیت‌ها با واحد میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) برگ اندازه‌گیری شدند.
* تفاوت میانگین‌ها از لحاظ آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌داری هستند.

گیاهان این جنس از نظر محتوای قندی نیز مهم هستند که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Gonçalves & Romano, 2016). نتایج حاصل از بررسی ۱۶ گونه از این جنس شامل *P. lanceolata* و *P. major* نشان داد که کربوهیدرات عمده آنها، سوربیتول بوده است (Rønsted et al., 2003). مطالعه دیگری روی گونه *P. lanceolata* نیز نشان داد که قندهای مهم این گونه، سوربیتول و بعد مانیتول هستند که در طی تنش‌های خشکی و شوری به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی نقش کلیدی دارند (Stewart, 1996). در این پژوهش، مقادیر قندهای محلول کل برای جمعیت‌های مختلف گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* اندازه‌گیری شد که گونه *P. lanceolata* به‌طور میانگین و به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری از این ترکیبات را نشان داد (جدول ۳ و ۴، شکل ۱). از اینرو، با توجه به تولید میزان بیشتری از قندهای محلول در گونه *P. lanceolata* و با توجه به نقش‌های چندگانه این ترکیبات، می‌توان این گونه را جهت استفاده‌های خاص در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد نمود.

میانگین میزان متابولیت‌های گیاهی در جمعیت‌های دو گونه *P. lanceolata* و *P. major* تفاوت معنی‌داری را در فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول کل نشان داد (جدول ۴). میانگین و انحراف معیارهای محاسبه شده بترتیب در گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* برای فنول $۸,۰۲ \pm ۲,۹۷$ و $۱۱,۵۷ \pm ۲,۸۸$ ، ساپونین $۰,۴۴ \pm ۱,۳۴$ و $۰,۴۹ \pm ۰,۱۱$ ، کاروتنوئید $۰,۱۶ \pm ۰,۰۳$ و $۰,۲۴ \pm ۰,۰۷$ ، قندهای محلول $۵۸,۰۰ \pm ۱۱,۰۹$ و $۱۳۶,۸۴ \pm ۳۵,۵۴$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و آنتوسیانین $۰,۴۰ \pm ۰,۰۶$ و $۰,۴۹ \pm ۰,۱۱$ میلی‌مول بر گرم وزن خشک برگ بوده که این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بودند ($p < ۰,۰۵$)؛ بطوریکه گونه *P. lanceolata* در همه موارد مقادیر بیشتری از این ترکیبات را نشان داد. اگرچه گونه *P. lanceolata* در مورد سایر متابولیت‌ها شامل فلاونوئید، کلروفیل a و b نیز مقادیر بیشتری را نشان داد اما این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌داری نبودند (جدول ۴).

مقایسه‌های فیتوشیمیایی زیادی در مورد سایر گونه‌های جنس بارهنگ انجام شده است. مقایسه گونه‌های *P. argentea*، *P. holosteam*، *P. major*، *P. maritima*، *P. media* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف صربستان نشان داد که گونه *P. major* در مقایسه با سایر گونه‌ها، فنول و فلاونوئید کل کمتری دارد (Beara et al., 2009). مقایسه گونه‌های *P. afra*، *P. coronopus*، *P. lagopus*، *P. lanceolata* و *P. serraria* از اسپانیا نشان داد که گونه *P. lanceolata* بیشترین میزان فنیل پروپانوئید گلیکوزیدها را تولید نموده و بعد از گونه *P. serraria* بیشترین میزان فنول کل و بعد از گونه *P. lagopus* بیشترین میزان فلاونوئید کل را داراست (Gálvez et al., 2005). مقایسه گونه‌های *P. schwarzenbergiana*، *P. reniformis*، *P. atrata*، *P. coronopus*، *P. holosteam* و *P. lanceolata* نیز نشان داد که گونه *P. lanceolata* بیشترین میزان ورباسکوزید، فنیل پروپانوئید گلیکوزیدها و فنول کل را داشته است (Janković et al., 2012). مقایسه ترکیبات پلی فنولی گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* جمع‌آوری شده از ازبکستان نشان داد که گونه *P. lanceolata* مقادیر بیشتری از این ترکیبات را تولید می‌کند (Makhmudov et al., 2011). مطالعه حاضر نیز نشان داد که به‌طور میانگین گونه *P. lanceolata* مقادیر بیشتری از ترکیبات فنول، آنتوسیانین، ساپونین، کاروتنوئید و قندهای محلول را نسبت به گونه *P. major* تولید می‌کند که این تفاوت در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۴). تفاوت میانگین این متابولیت‌ها در این دو گونه برای فنول $3/55 \pm 0/85$ میلی‌گرم، آنتوسیانین $0/09 \pm 0/03$ میلی‌مول، ساپونین $3/83 \pm 0/68$ میلی‌گرم، کاروتنوئید $0/08 \pm 0/02$ میلی‌گرم و قندهای محلول $78/84 \pm 7/60$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده است (جدول ۴). به نظر می‌رسد در بین گونه‌های جنس بارهنگ، *P. major* از گونه‌های با محتوای متابولیتی پایین و *P. lanceolata* از گونه‌های با محتوای متابولیتی بالا باشد. از این رو می‌توان گونه *P. lanceolata* را جهت استفاده‌های خاص در زمینه‌های دارویی، بهداشتی و تغذیه‌ای پیشنهاد نمود.

علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی نظیر خاک، دما، رطوبت، نور و ارتفاع از سطح دریا از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه هستند (Hemmati et al., 2012). نقش رویشگاه به عنوان عامل تاثیرگذار در تجمع متابولیت‌های ثانویه بسیار با اهمیت بوده و از اینرو در مطالعه حاضر، جهت به حداقل رساندن عوامل محیطی، از بین جمعیت‌های فراوان جمع‌آوری شده، تنها جمعیت‌هایی از *P. major* و *P. lanceolata* که رویشگاه یکسانی شامل لفور، ساری، زیارت، ماسوله، زرد گل، ورسک، پلپا و شوراب داشتند، انتخاب (جدول ۱) و از لحاظ متابولیت‌های گیاهی (جدول ۲، ۳ و ۶) مقایسه شدند. مقایسه این دو گونه نشان داد که علی‌رغم تفاوت ارتفاع رویشگاه‌های مورد مطالعه، گونه *P. lanceolata* در همه رویشگاه‌ها فنول، ساپونین و قندهای محلول بیشتری و در اغلب رویشگاه‌ها فلاونوئید، آنتوسیانین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین بیشتری را نسبت به گونه *P. major* تولید کرده است (جدول ۲ و ۳، شکل ۱). در بین همه جمعیت‌های جمع‌آوری شده، جمعیت *P. lanceolata* لفور با ارتفاع ۳۶۱ متر، بیشترین میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول، جمعیت *P. lanceolata* ساری با ارتفاع ۳۷۰ متر،

بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، جمعیت *P. lanceolata* ماسوله با ارتفاع ۱۰۱۷ متر، بیشترین میزان آنتوسیانین و جمعیت *P. major* زیارت با ارتفاع ۸۱۴ متر، بیشترین میزان فلاونوئید و پروتئین را نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که هر دو گونه *P. lanceolata* و *P. major* منطقه لفور، با کمترین میزان ارتفاع در بین مناطق مورد مطالعه (جدول ۱)، در مقایسه با سایر جمعیت‌های خود، بیشترین میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول را داشتند (جدول ۲ و ۳، شکل ۱). نتایج بدست آمده می‌تواند در شناسایی جمعیت‌های برتر با بازده تولید بیشتر انواع مختلف متابولیت‌های گیاهی، جهت استفاده در موارد گوناگون دارویی، بهداشتی و تغذیه‌ای مهم و مورد استفاده باشند.

از آنجائیکه ارتفاع یکی از عوامل مهم در میزان متابولیت‌های گیاهی است جهت بررسی اسانس گونه‌های *P. major* و *P. lanceolata* از جمعیت ماسوله که دارای ارتفاع تقریباً حدواسط در بین جمعیت‌ها بود، استفاده شد. نتایج نشان داد که متابولیت‌های ۴،۲،۱-تری‌کلروبنزن و فیتون با درصد حضور متفاوتی در هر دو گونه مشترک بودند. همچنین متابولیت‌های شاخصی در هر یک از گونه‌ها شناسایی شدند. بترتیب زمان بازداری، در گونه *P. major* ترکیبات ۴،۲،۱-تری‌کلروبنزن با ۳۸/۱۶ درصد، پولگون با ۲۱/۰۵ درصد، فیتون با ۷/۸۹ درصد، پالمیتیک اسید با ۱۴/۴۷ درصد و تری‌بوتیل استیل‌سیترات با ۱۰/۵۳ درصد و در گونه *P. lanceolata* ترکیبات ۴،۲،۱-تری‌کلروبنزن با ۱/۳۰ درصد، دی-کارون با ۸/۱۴ درصد، پیپریتون اکساید با ۲/۱۶ درصد، ترانس-کاریوفیلین با ۱/۱۳ درصد، فیتون با ۰/۹۵ درصد، آدیپیک اسید دی‌اکتیل استر با ۸۲/۵۶ درصد و اسکوالن با ۱/۹۰ درصد شناسایی شدند (جدول ۵).

جدول ۵: ترکیبات شیمیایی اسانس گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* جمع‌آوری شده از منطقه ماسوله

گونه	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیب شیمیایی	حضور در اسانس (درصد)
<i>P. major</i>	۱۹/۲۶۱	1,2,4-trichlorobenzene	۳۸/۱۶
	۲۰/۷۱۳	Pulegon	۲۱/۰۵
	۳۳/۷۳۹	Phytone	۷/۸۹
	۳۶/۱۹۶	Palmitic acid	۱۴/۴۷
	۴۱/۸۶۹	Tributyl acetylcitrate	۱۰/۵۳
<i>P. lanceolata</i>	۱۹/۲۶۱	1,2,4-trichlorobenzene	۱/۳۰
	۲۰/۷۳۸	D-Carvone	۸/۱۴
	۲۳/۴۷۴	Piperitenone oxide	۲/۱۶
	۲۵/۳۴۸	Trans-caryophyllene	۱/۱۳
	۳۳/۷۳۹	Phytone	۰/۹۵
	۴۴/۸۹۹	Adipic acid, dioctyl ester	۸۲/۵۶
	۵۴/۵۰۶	Squalene	۱/۹۰

نتایج بدست آمده از آنالیز اسانس گونه‌های مختلف جنس بارهنگ، ترکیبات شیمیایی متفاوتی را گزارش کرده‌اند. ترکیبات شیمیایی مهم موجود در اسانس گونه *P. ovata* شامل تیمول، ۴و۲-دکادینال، لینولئیک اسید و اولئیک اسید بودند (Seifi et al., 2014). ترکیبات شیمیایی عمده موجود در اسانس گونه *P. asiatica* شامل لینالول، منتن-۳و۲-دیول، اوژنول، بایسیکلوزماکرن و فنچول بودند (Chung et al., 2008). عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی در آنالیز اسانس گونه *P. amplexicaulis* شامل پالمیتیک اسید، ۳-متیل‌آندکان، ۱-اتیل-۲-متیل‌سیکلوهگزanol و ۹و۲-دی‌متیل‌دکان و در گونه *P. boissieri* شامل ۳-پروپ-۲-انیل‌بایسکلو (۱و۲و۱) هپتان، ۱-دودکان-۳-آل، ۳-اتیل‌فنول و نوناکوزان بودند (Al-Mazroa et al., 2012). آنالیز اسانس گونه *P. lanceolata* نشان داد که عمده‌ترین گروه‌های ترکیبات شیمیایی شامل اسیدهای چرب، مونوترپن‌های اکسید شده، آلدهیدها-کتون‌ها و الکل‌ها بودند که بیشترین ترکیب هر گروه به‌ترتیب شامل پالمیتیک اسید، لینالول، پنتیل‌وینیل‌کتون و ۱-اُکتین-۳-آل بودند. ترکیباتی نظیر دی-کارون، ترانس‌کاریوفیلین و فیتون نیز در این گونه گزارش شدند که از جمله ترکیبات مشترک با مطالعه حاضر روی گونه *P. lanceolata* بودند (Bajer et al., 2016). در این پژوهش، پولگون از ترکیبات شاخص موجود در اسانس گونه *P. major* بود درحالی که دی-کارون، پیپریتنون اکساید، اسکوالن و ترانس-کاریوفیلین از ترکیبات شاخص گونه *P. lanceolata* بودند (جدول ۵). نتایج اشاره دارد به اینکه اسانس گونه‌های مختلف این جنس متابولیت‌های متفاوتی را نشان می‌دهند که می‌توان از این داده‌ها در مطالعات کموتاکسونومی گونه‌های این جنس استفاده نمود؛ اگرچه مطالعاتی وسیع‌تر و از مناطق اکولوژیکی متفاوت ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

بنابراین، نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که گونه‌های *P. lanceolata* و *P. major* از لحاظ فیتوشیمیایی متفاوت هستند. بررسی اسانس حاصل از اندام هوایی این دو گونه، متابولیت‌های شاخص متفاوتی نظیر پولگون را برای گونه *P. major* و دی-کارون، پیپریتنون اکساید، اسکوالن و ترانس-کاریوفیلین را برای *P. lanceolata* نشان داد. همچنین بررسی عصاره‌های اندام هوایی نشان داد که به‌طور میانگین گونه *P. lanceolata* بترتیب میزان قندهای محلول، ساپونین، فنول، آنتوسیانین و کاروتنوئید کل بیشتری نسبت به گونه *P. major* دارد. با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که علاوه بر تفاوت‌های ریخت‌شناسی این دو گونه، تفاوت‌های فیتوشیمیایی آنها بویژه تفاوت در میزان فنول، ساپونین و قندهای محلول صفات مهمی هستند که می‌توانند در مطالعات کموتاکسونومی این دو گونه مورد استفاده قرار گیرند. همچنین مقایسه جمعیت‌های مختلف نشان داد که هر دو گونه در منطقه لغور، بیشترین مقدار از متابولیت‌های ارزشمندی مانند فنول، ساپونین و قندهای محلول را داشتند. این نتایج در انتخاب گونه‌ها و جمعیت‌های برتر با بازده تولید متابولیت‌های بیشتر و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کمک شایانی خواهد نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا بدین وسیله از سرکار خانم دکتر نجمه احمدیان جهت راهنمایی‌های ایشان در مراحل انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Corporation 804 Pp. Illinois.
- Adom, M.B., Taher, M., Mutalabisin, M.F., Amri, M.S., Kudos, M.B.A., Sulaiman, M.W.A.W., Sengupta, P. and Susanti, D. (2017). Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 96: 348–360.
- Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols, 2: 875–877.
- Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M. and Başer, K.H.C. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry, 108: 942–949.
- Al-Mazroa, S.A., Al-Wahaibi, L.H., Mousa, A.A., and Al-Khathlan, H.Z. (2015). Essential oil of some seasonal flowering plants grown in Saudi Arabia. Arabian Journal of Chemistry, 8: 212–217.
- Aminian, R., Mardani, M. and Davoodnia, B. (2018). The effect of hydro alcoholic extract of *Plantago major* and *Astragalus hamosus* on some gram-positive and gram-negative bacteria. Iranian Journal of Plant Researches, 31: 956–967. (In Persian)
- Amiri, M.S., Saeidi Mehrvarz, Sh. and Memariani, F. (2018). *Plantago lagocephala* (Plantaginaceae), a new record for the flora of Iran. Nova Biologica Reperta, 5: 320–323.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1–15.
- Bajer, T., Janda, V., Bajeroová, P., Kremr, D., Eisner, A. and Ventura, K. (2016). Chemical composition of essential oils from *Plantago lanceolata* L. leaves extracted by hydrodistillation. Journal of Food Science and Technology, 53: 1576–1584.
- Bazzaz, B.S.F. and Harirzadeh, G. (2003). Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology, 41: 573–583.

- Beara, I.N., Lesjak, M.M., Jovin, E.D., Balog, K.J., Anackov, G.T., Orčić, D.Z. and Mimica-Dukić, N.M. (2009). Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9268–9273.
- Beara, I.N., Lesjak, M.M., Orčić, D.Z., Simin, N.Đ., Četojević-Simin, D.D., Božin, B.N. and Mimica-Dukić, N.M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT - Food Science and Technology*, 47: 64–70.
- 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.
- Chung, M., Park, K.W., Kim, K.H., Kim, C., Baek, J.P., Bang, K., Choi, Y. and Lee, S. (2008). Asian plantain (*Plantago asiatica*) essential oils suppress 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A reductase expression *in vitro* and *in vivo* and show hypocholesterolaemic properties in mice. *British Journal of Nutrition*, 99: 67–75.
- Dalar, A., Türker, M. and Konczak, I. (2012). Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 2: 42–51.
- Dubois, M., Gilles, k.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350–356.
- Ferrazzano, G.F., Cantile, T., Roberto, L., Ingenito, A., Catania, M.R., Roscetto, E., Palumbo, G., Zarrelli, A. and Pollio, A. (2015). Determination of the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity on salivary Streptococci and Lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a *Plantago lanceolata* infusion. *Biomed Research International*, 2015: 1-8.
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J. and Ayuso, M.J. (2005). Antioxidant Activity of Methanol Extracts Obtained from *Plantago* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1927–1933.
- Gonçalves, S. and Romano, A. (2016). The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products*, 83: 213–226.
- Hassemer, G. (2018). Notes on the montane Indo-Iranian species in *Plantago* subgenus *Plantago* (Plantaginaceae). *Phytotaxa*, 336: 59–68.
- Hemmati, K.H., Ghasemnejad, A., Mashayekhi, K. and Bashiri-Sadr, Z. (2012). Site effect on some important flavonoid compounds of Linden tree (*Tilia platifolia* L.). *Journal of Plant Production Research*, 19: 141-148. (In Persian)
- Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29: 116–122.

- Janighorban, M. (1995). Plantaginaceae. Pages 1–53 in Assadi *et al.*, eds. Flora of Iran, Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands.
- Janković, T., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakušić, D., Stešević, D. and Šavikin, K. (2012). Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42: 69–74.
- Karakaş, F.P., Yildirim, A. and Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36: 641–652.
- Kobeasy, M.I., Abdel-Fatah, O.M., El-Salam, S.M.A. and Mohamed, Z.E.M. (2011). Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 3: 83–91.
- Kolak, U., Boğa, M., Uruşak, E.A. and Ulubelen, A. (2011). Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities. *Turkish Journal of Chemistry*, 35: 637–645.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382.
- Madland, E. (2013). Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from *Herniaria incana*. Master's thesis. Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, Pp 67.
- Makhmudov, R.R., Abdulladzhanova, N.G. and Kamaev, F.G. (2011). Phenolic compounds from *Plantago major* and *P. lanceolata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47: 288–289.
- Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science*, 164: 259–265.
- Matini, M., Bakhtiarnejad, S., Dastan, D., Maghsood, A.H. and Fallah, M. (2017). *In-Vitro* efficacy of *Plantago lanceolata* L. extracts on *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 20: 74–82. (In Persian)
- Mehni, A.M. and Shahdadi, F. (2014). Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran. *International Journal of Biosciences*, 4: 224–228.
- Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N. and Mirzaei, M. (2011). The Antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 1: 160–167. (In Persian)
- Mohsenzadeh, S., Nazeri, V. and Mirtadzadini, A.S. (2007). *Plantago lachnantha* Bge. (Plantaginaceae), a new record for flora of Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 13: 107–108.

- Nostro, A., Germanò, M.P., D'angelo, V., Marino, A. and Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 379–84.
- Patzak, A. and Rechinger, K.H. (1965). Plantaginaceae. Pages 1–21 in Rechinger KH, ed. *Flora Iranica*, Graz: Akademische Druck und Verlagsantalt.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1142–1145.
- Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P. Jaroszewski, J.W. and Jensen, S.R. (2003). Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 242: 63–82.
- Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 1–21.
- Seifi, H., Masoum, S., Seifi, S. and Ebrahimabadi, E.H. (2014). Chemometric resolution approaches in characterisation of volatile constituents in *Plantago ovata* seeds using gas chromatography-mass spectrometry: methodology and performance assessment. *Phytochemical Analysis*, 25: 273–81.
- Stewart, A.V. (1996). Plantain (*Plantago lanceolata*) a potential pasture species. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 58: 77–86.
- Stiles, E.A., Cech, N.B., Dee, S.M. and Lacey, E.P. (2007). Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*. *Physiologia Plantarum*, 129: 756–765.
- Tutel, B. (1982). *Plantago* L. Pages 505–521 in Davis PH, ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., and Pérez-Gutiérrez, M. S. (2006). Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 36–42.
- Yahyaabadi, Y., Mahmoudi Otaghvari, A. and Nazifi, E. (2019). Phytochemical and palynological study of several species of *Mentha* L. in north of Iran. *Iranian Journal of Plant Researches*, 33: 843–853. (In Persian)

Phytochemical study of *Plantago major* and *Plantago lanceolata* in north of Iran

S.S. Amininasab¹, A. Mahmoudi Otaghvari², E. Nazifi^{3*}

Received:2021.02.23

Accepted:2021.4.20

Abstract

Plantago major and *Plantago lanceolata* are abundant species of *Plantago* family in the north of Iran which are recognized as valuable medicinal plants. In this study, eight populations of these species were collected from different regions of north of Iran and studied phytochemically. The results on average showed that *P. lanceolata* had more metabolites than *P. major*. The mean differences for phenols, anthocyanins, saponins, carotenoids, and soluble sugars were statistically significant at the level of 0.05. Analysis of the essential oil of Masuleh populations showed that the pulegon and palmitic acid were main components of *P. major* whereas the D-carvone and adipic acid, dioctyl ester were main components of *P. lanceolata*. These findings help to select species and populations with higher metabolic content followed by optimal use in food, pharmaceutical and health industries.

Keywords: *D-carvone, Essential oil, Plantago, Plant metabolites, Pulegon*

1- MSc. of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.

2- Associate Prof., Department of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.

3- Assistant Prof., Department of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. Iran.

*(Corresponding author: nazifiehsan@yahoo.com / e.nazifi@umz.ac.ir)

تولید آنزیم تاناز توسط شبه گونه‌های تریکودرما (*Trichoderma spp.*) با استفاده از تانن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی

مهدی بهگر^{۱*}، پروین شورنگ^۲، فرحناز معتمدی سده^۲، سمیرا شهبازی^۳

چکیده

آزمایشی بمنظور بررسی تولید آنزیم تاناز توسط قارچ‌های *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma viride* و *Trichoderma ressei* در محیط کشت حاوی اسید تانیک انجام شد. کلنی‌ها ابتدا صاف بود و سپس دستجات پشیمی سفید رنگ در آنها ظاهر و به مرور سبز رنگ شدند. بزرگترین اسپور مربوط به *T. longibrachiatum* و کوچکترین مربوط به *T. ressei* بود. بیشترین و کمترین تعداد اسپور در محیط کشت MYG به ترتیب مربوط به *T. harzianum* ($5/48 \times 10^6$) و *T. viride* ($2/12 \times 10^6$) بود. بیشترین رشد ریشه در *T. longibrachiatum* و کمترین در *T. ressei* مشاهده شد. پروتئین تولیدی توسط تریکودرما رسانی کمتر از سه گونه دیگر بود ($P < 0/05$). فعالیت ویژه آنزیمی در شبه گونه *T. longibrachiatum* بیشتر از *T. viride* (به ترتیب $1/33$ و $0/68$ واحد به ازای میلی گرم پروتئین) بود ($P < 0/05$). وزن مولکولی پروتئین تولیدی در سوپرناتانت محیط کشت TFM تولیدی 131 کیلودالتون با دو زیر واحد به وزن تقریبی 62 و 69 کیلودالتون بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، فعالیت آنزیمی، قارچ، محیط کشت

۱- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

* (نویسنده مسئول: mbehgar@aeoi.org.ir)

۲- دانشیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

مقدمه

آنزیم تاناز (E.C 3.1.1.20) که تانن آسیل هیدرولاز هم نامیده می‌شود به خانواده هیدرولازها تعلق دارد که باعث هیدرولیز آنزیمی تانن می‌شود. تاناز باندهای موجود در مولکول تانن‌های قابل هیدرولیز و استرهای اسید گالیک را هیدرولیز می‌کند و اسید گالیک آزاد تولید می‌کند (Van-de Lagemaat & Pyle, 2001). اسید گالیک در صنایع غذایی برای سنتز شیمیایی یا آنزیمی ترکیباتی همانند گالات‌ها و پیروگالول‌ها (پروپیل گالات به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی) در نگهداری مواد غذایی و در صنعت دارویی برای سنتز داروهای ضد باکتریایی کاربرد دارند (Aguilar et al., 2007).

از دیگر کاربردهای آنزیم تاناز در صنایع غذایی تهیه چای فوری و تهیه نوشیدنی‌های الکلی است. همچنین در تهیه آب‌میوه‌های طبیعی برای بهبود طعم و مزه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Iqbal & Kapoor, 2012). بسیاری از آب میوه‌های طبیعی (همانند انار، قره قاط، تمشک و غیره) که بواسطه مقادیر آنتی اکسیدانت بالا و جلوگیری از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این آب میوه‌ها مقادیر بالای تانن باعث کدورت، رسوب و مزه گس می‌شود که با افزایش زمان نگهداری افزایش می‌یابد. بنابراین در این محصولات از استفاده از فرآیند آنزیمی بسیار ضروری است (Aguilar et al., 2007).

در مطالعه ای استفاده از تاناز به تنهایی و با استفاده از تاناناز در ترکیب با ژلاتین (نسبت ۱ به ۱) در آب انار باعث تجزیه تانن به ترتیب به مقدار ۲۵ و ۴۹ درصد شد (Rout & Banerjee, 2006). در مطالعه مشابهی نیز محققان نشان دادند که استفاده از تاناز تولیدی توسط *T. harzianum* موفق به کاهش ۴۰ درصدی تانن و ایجاد شفافیت در آب انار شد (Kapoor & Iqbal, 2013).

در سال‌های اخیر استفاده از این آنزیم علاوه بر استفاده در صنایع غذایی و دارویی، کاربردهای دیگر آن همانند استفاده در پرورش طیور و محیط زیست نیز مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای افزودن تاناز به خوراک جوجه‌های گوشتی در مقایسه با گروه شاهد باعث بهبود انرژی متابولیسمی ظاهری، ابقای نیتروژن، ابقای ماده خشک، قابلیت هضم چربی و ضریب تبدیل غذایی شد (Abdulla et al., 2016). مطالعاتی نیز در خصوص تجزیه تانن در پساب حاصل از فعالیت دباغی و کاهش مشکلات زیست محیطی آنها انجام شده است (Gammoun et al., 2007).

آنزیم تاناز به روش غوطه‌وری و یا کشت جامد توسط طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شود. همچنین مطالعات جامعی بر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده تاناز انجام شده است (Aguilar et al., 2007). Gammoun et al., (2007). مطالعاتی به منظور شناسایی توانایی تولید برخی گونه‌های قارچی انجام شده و نتایج نشان دادند که بالاترین تولید آنزیم تاناز در *Trichoderma spp.* مشاهده شد در حالی که گونه *T. viride* دارای توان تولیدی متوسطی بود (Bradoo et al., 1996). در مقایسه با سایر گونه‌های قارچی، مطالعات محدودی بر تولید آنزیم تاناز توسط گونه‌های قارچی *Trichoderma spp.* انجام شده است در حالیکه این جنس قارچ‌های خاکزاد، دارای تنوع متابولیتی و آنزیمی بسیار زیادی هستند (Shajitha, & Nisha).

Shajitha,) *T. viride* مانند *Trichoderma spp.* مطالعات نشان داده است برخی از قارچ‌های (Iqbal & Kapoor, 2012; 2018). *T. harzianum* و (Nisha 2018) به عنوان جدایه های کارآمد تولید تاناز با استفاده از پسماندهای صنایع غذایی به شمار می‌روند و می‌توانند برای طراحی خطوط تولید آنزیم در کارخانجات تولید آبمیوه و کنساتره از مواد پسماندهای خط تولید، قابل توصیه باشند (Kapoorand & Iqbal, 2013). هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و توانایی تولید آنزیم تاناز توسط قارچ‌های *Trichoderma spp.* در محیط‌های کشت حاوی تانن به عنوان تنها منبع کربنی بود.

مواد و روش‌ها

شبه گونه‌های قارچ *Trichoderma spp.* (شامل *T. viride*, *T. harzianum*, *T. ressei* و *T. longibrachiatum*) از نمونه خاک‌های جمع آوری شده از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ جداسازی شدند (شهبازی و عسکری، ۱۳۹۷). جدایه‌های *Trichoderma spp.* از طریق رقیق‌سازی سوسپانسیون خاک و کشت روی محیط‌های پیتون رزبنگال و سیب زمینی/دکستروز/آگار بهینه‌سازی شده (Papavizas & Lumsden, 1982)، جداسازی و خالص‌سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها نیز بر اساس ویژگی‌های کلنی‌ها، خصوصیات ریخت‌شناسی کنیدیوم‌ها، کنیدیوفرها و فیالیدها با استفاده از کلید شناسایی گامس و بیست انجام شد (Gams et al., 1998). تایید شناسایی شبه گونه‌ها از طریق تعیین ترادف اسیدهای نوکلئیک حاصل از تکثیر با آغازگرهای ITS1 و ITS4، و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA6 بر اساس توالی ناحیه ITS1 در قارچ‌های *Trichoderma spp.* در کنار گونه‌های دیگری که از دیگر منابع اطلاعاتی یا بانک‌های ژنی دریافت شده بودند و با استفاده از روش Neighbor-Joining انجام شد (Ghasemi et al., 2019). جدایه قارچ *T. ressei* (PTCC ۵۱۴۲) از کلکسیون قارچ و باکتری مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

به منظور شناسایی شبه گونه‌ها خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌ها شامل شکل کلنی، رنگ کلنی، سرعت رشد میسلیم، و تعداد اسپور روی محیط کشت MYG حاوی مالت، مخمر و گلوکز (حاوی ۵٪ درصد عصاره مالت، ۲۵٪ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد گلوکز و ۲ درصد آگار) استفاده شد. برای اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌شناسی ابتدا پلاک‌های میسلیم (به عرض و طول ۵ میلی‌متر) از کشت‌های تازه هر یک از جدایه‌های قارچ *Trichoderma spp.* به مرکز ظرف پتری حاوی محیط کشت MYG انتقال داده شد و در دمای ۲۵ C° گرمخانه‌گذاری شد. اندازه‌گیری سرعت رشد ریشه (سانتی‌متر/روز) در فواصل ۲۴ ساعت به مدت ۳ روز (۷۲ ساعت) انجام شد. به منظور مقایسه شکل کلنی‌ها و رنگ آنها در جدایه‌های برتر از پلیت‌های MYG کشت شده برای اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی ریشه‌ها استفاده شد و مشخصات کلنی‌ها شامل شکل و رنگ آنها ثبت شد. ابعاد اسپور با استفاده از لام گلبول شمار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری و برای ۱۰۰ اسپور از هر جدایه انجام و میانگین‌گیری شد.

با اضافه کردن محلول سرم فیزیولوژیک استریل (محلول ۹ گرم در لیتر NaCl) به کشت‌های ۷ روزه جدایه‌های قارچ بر روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز آگار (PDA)، سوسپانسیون اسپور تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور (10^6) تهیه شده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل *Trichoderma spp.* (TCM، حاوی گرم/لیتر: پپتون ۱/۰، اوره ۰/۳، KH_2PO_4 ۲/۰، $(NH_4)_2SO_4$ ۱/۴، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۳، $CaCl_2 \cdot H_2O$ ۰/۳، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۰۵، $MnSO_4$ ۰/۰۰۲، $ZnSO_4$ ۰/۰۰۲، $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۰۲) اضافه شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از رشد توده میسلیوم، محیط‌های کشت با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه حذف و فاز بالایی حذف گردید و فاز پایینی (ریسه قارچ) دوبار متوالی با اضافه کردن یک میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیک شستشو شدند و برای اطمینان از عدم حضور نمک اضافی مجدداً با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه فاز بالایی حذف گردید و میسلیوم به عنوان فاز جامد پایینی جداسازی شد. پس از رشد توده میسلیوم، محیط‌های کشت برای دوبار متوالی شستشو و سانتریفیوژ شد. سپس میسلیوم‌ها برای تولید آنزیم به محیط‌های کشت تخمیری TFM (شهبازی و عسکری ۱۳۹۷) که ۱۰ گرم در لیتر تانن به عنوان تنها منبع کربن به عنوان القاء کننده تولید آنزیم تاناز به آن افزوده شده بود، اضافه شدند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس محیط‌های کشت مذکور سانتریفیوژ شد و مایع فوقانی که حاوی ترکیبات پروتئینی (آنزیم تاناز) بود در ادامه کار به منظور سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم تاناز به وسیله روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (Libuchi et al., 1967). برای این کار ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت محیط کشت (آنزیم خام) به ۲ میلی لیتر از محلول اسید تانیک ۳۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار (pH ۵/۵) در لوله‌های آزمایشی اضافه شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش برداشته شد و ۲ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد برای توقف واکنش به آن اضافه شد. جذب در طول موج ۳۱۰ خوانده شد. یک واحد از فعالیت تاناز بر اساس مقدار آنزیمی که برای هیدرولیز ۱ میکرو مول استر در ۱ دقیقه و به صورت واحد در میلی لیتر در دقیقه بیان شد.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین (Bradford, 1976) ابتدا ۳ میلی لیتر معرف برادفورد (Bradford) را در لوله‌های آزمایش انتقال داده و سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بدست آمده از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM به آن اضافه شد و جذب نوری آن در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیمی، به صورت مقدار فعالیت آنزیم (U/ml) به مقدار کل پروتئین ($\mu g/ml$) موجود در محیط، تعریف شد.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌ها

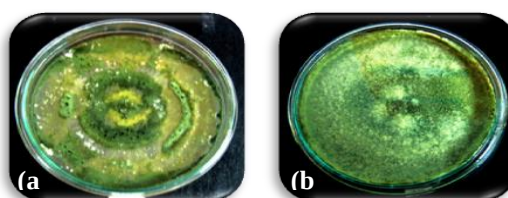
آزمون الکتروفورز (Laemmli, 1970) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴ درصد و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ درصد انجام شد. جهت آماده‌سازی پروتئین، ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با مقدار ۵ میلی‌لیتر از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) مخلوط شد و رسوب پروتئینی آن با استفاده از سانتریفیوژ در سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه جمع‌آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به آنها اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه به آنها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک تزریق شد. آزمون الکتروفورز در شدت جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت بلو R-250 رنگ آمیزی شد و با استفاده از رنگبر حاوی متانول:اسید استیک:آب به نسبت‌های ۸:۱:۱ رنگبری شد. برای تعیین وزن مولکولی باندهای پروتئینی مجهول از روش تعیین ارزش RF و برازش آن در برابر وزن مولکولی استانداردها تعیین شد.

مقایسه تولید آنزیم تاناز و غلظت پروتئین در محیط کشت توسط *Trichoderma spp.* در قالب طرح کاملاً تصادفی و در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و روش GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۱ انجام شد.

نتیجه و بحث

خصوصیات ماکروسکپی و مورفولوژیک

کلنی‌های *Trichoderma spp.* در محیط کشت MYG ابتدا صاف بود و سپس به تدریج دستجات پشیمی سفید رنگ در آنها ظاهر و به مرور سبز رنگ شد (شکل ۱ و جدول ۱). رنگ کلنی *Trichoderma spp.* مورد مطالعه سبز روشن، رنگ پشت کلنی‌ها سفید و شکل ظاهری کلنی‌ها صاف بود. تعداد و ابعاد اسپور *Trichoderma spp.* در محیط کشت MYG در جدول ۱ نشان داده شده است. بزرگترین اسپور مشاهده شده مربوط به *T. longibrachiatum* و کوچکترین مربوط به *T. ressei* بود. بیشترین و کمترین تعداد اسپودر در هر میلی‌لیتر محیط کشت به ترتیب در *T. longibrachiatum* ($5/4 \times 10^6$) و *T. viride* ($2/12 \times 10^6$) مشاهده شد.



شکل ۱: ظروف پتری کشت‌های قارچی: (a) *T. viride*، (b) *T. harzianum*، (c) *T. ressei*، (d) *T. longibrachiatum*

جدول ۱: خصوصیات مورفولوژیکی اسپور در *Trichoderma spp.* (در محیط کشت MYG در دمای ۲۵ °C)

شکل کلنی	پشت کلنی	رنگ کلنی	تعداد اسپور در میلی لیتر ($\times 10^6$)	ابعاد اسپور (میکرو متر)		جدایه
				عرض	طول	
صاف	سفید	سبز روشن	۲/۱۴	۲/۱۲	۲/۰۹	<i>T. viride</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۵/۴۸	۲/۸۴	۲/۹۲	<i>T. harzianum</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۳/۶۰	۱/۰۸	۱/۷۸	<i>T. ressei</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۲/۱۹	۲/۰۴	۳/۱۹	<i>T. longibrachiatum</i>

سرعت رشد ریشه‌های گونه‌های *Trichoderma spp.* بر حسب سانتی‌متر در روز در جدول ۲ نشان داده شده است. سرعت رشد ریشه در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح اسپور در محیط کشت بین گونه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). بیشترین رشد ریشه در *T. longibrachiatum* با ۱/۲۵ سانتی‌متر در روز و کمترین در *T. ressei* با ۰/۴۵ سانتی‌متر در روز مشاهده شد. این روند رشدی در ۷۲ ساعت نیز مشابه بود.

اندازه اسپور *T. harzianum* در محدوده عرض و طول ۲/۵×۲/۵ تا ۳/۰×۳/۰ میکرومتر مربع گزارش شده است با رنگ کلنی سبز تیره، که اسپورهای مشاهده شده در مطالعه حاضر در این محدوده قرار دارد، اما رنگ کلنی در مطالعه حاضر سبز روشن بود (Kannangara et al., 2017). در مطالعه حاضر اندازه اسپور و ریشه در *T. viride* کوچک‌تر از *T. harzianum* بود که مخالف با گزارشات بود، با این حال رنگ کلنی آن مشابه گزارشات بود (Kannangara et al., 2017). در این مطالعه بر خلاف مطالعه حاضر اندازه ریشه در *T. viride* بیشتر از *T. harzianum* بود.

رنگ کلنی *T. longibrachiatum* سبز تیره-زیتونی گزارش شده است (Devi et al., 2012). رنگ کلنی‌های *T. ressei* سبز متمایل به زرد و رنگ پشت کلنی زرد رنگ پریده گزارش شده است (Sekhar et al., 2017). در این مطالعه رشد ریشه در *T. viride* و *T. ressei* مشابه هم و بیشتر از *T. harzianum* بود که مغایر با نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر بود.

خصوصیات مورفولوژیک قارچ‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی همانند نوع محیط کشت (ترکیبات، pH و ...)، مراحل رشدی، شرایط دمایی و حتی جدایه مورد بررسی متفاوت است. تفاوت جدایه‌ای در مورفولوژی قارچ‌ها بسیاری از مطالعات گزارش شده است (Kannangara et al., 2017). گزارش شده است که در *T. harzianum* وجود زیر گونه‌ها (۳، ۴ یا ۵ زیرگونه) با توجه به جدایه مورد بررسی می‌تواند خصوصیات مورفولوژیکی متفاوتی را نشان دهد (Grondona et al., 1997).

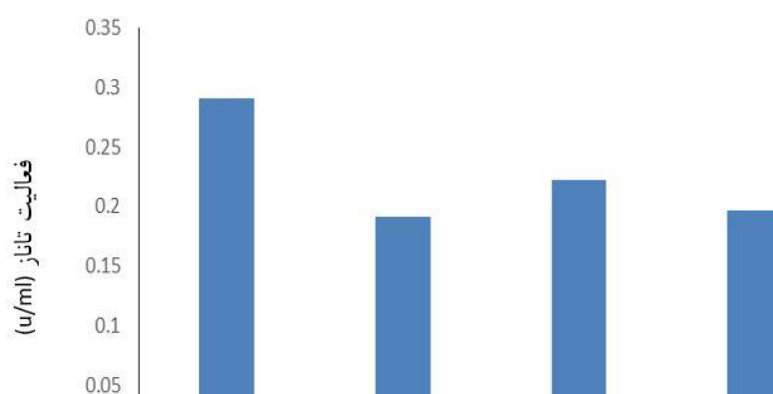
جدول ۲: سرعت رشد میسیلیوم در *Trichoderma spp.* (در محیط کشت MYG در دمای ۲۵ C°)

نام جدایه	سرعت رشد شعاعی ریشه (سانتی‌متر/روز)	
	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
<i>T. viride</i>	0.10 ± 0.07	0.18 ± 0.05
<i>T. harzianum</i>	0.10 ± 0.09	0.17 ± 0.06
<i>T. ressei</i>	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.07
<i>T. longibrachiatum</i>	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.07

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشد.

فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه آنزیمی و مقدار پروتئین در محیط کشت

نتایج حاصل از فعالیت آنزیمی (U/ml) در شکل ۲ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنزیمی شبه‌گونه‌های مختلف *Trichoderma spp.* مشاهده نشد. با وجود این کمترین مقدار فعالیت آنزیمی در *T. ressei* (۰/۱۹) واحد در میلی‌لیتر) و بیشترین مقدار در *T. longibrachiatum* (۰/۲۹) واحد در میلی‌لیتر) مشاهده شد.



شکل ۲: فعالیت آنزیمی تاناز (U/ml) تولید شده در *Trichoderma spp.*

نتایج حاصل از مقدار پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت ویژه آنزیمی در سوپرناتانت محیط های کشت در جدول ۳ نشان داده شده است. کمترین مقدار پروتئین تولیدی در *T. ressei* (۱۶۶/۳۳ میلی گرم در میلی لیتر) در مقایسه با دیگر شبه گونه های *Trichoderma spp.* مشاهده شد ($P > 0.05$). به طور عددی *T. longibrachiatum* مقدار پروتئین بیشتری در محیط کشت تولید کرد (۲۳۷/۶۷ میلی گرم در میلی لیتر). فعالیت ویژه آنزیمی تفاوت معنی داری ($P > 0.05$) بین شبه گونه ها داشت و در *T. longibrachiatum* بیشترین مقدار (۱/۳۳ واحد در گرم پروتئین) و در *T. viride* کمترین مقدار (۰/۸۶ واحد در گرم پروتئین) بود. مقادیر متوسط از فعالیت آنزیمی در *T. ressei* و *T. harzianum* دیده شد.

جدول ۳: مقدار پروتئین و فعالیت ویژه آنزیمی تاناز در شبه گونه های *Trichoderma*

<i>Trichoderma spp.</i>			
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. ressei</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>
۲۳۳/۱۸±۱۵/۳۸ ^a	۱۶۶/۳۳±۸/۷۴ ^b	۲۳۷/۶۷±۲۱/۶۷ ^a	۲۸۸/۰۰±۱۲/۳۳ ^a
۱/۳۳±۰/۲۰ ^a	۱/۱۶±۰/۱۲ ^{ab}	۰/۹۷±۰/۱۷ ^{ab}	۰/۸۶±۰/۳۵ ^b

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمامی قارچ های *Trichoderma spp.* مورد استفاده توانایی رشد در محیط های کشت حاوی اسید تانیک به عنوان تنها منبع کربن را داشتند. فعالیت های آنزیمی مشاهده شده در آزمایش حاضر در محدوده (۰/۸۷-۰/۱۹ واحد در میلی لیتر) بود. در داخل کشور مطالعه ای در خصوص توانایی تولید آنزیم تاناز توسط *Trichoderma spp.* نگارندگان یافت نشد. همچنین گزارشات اندکی از مطالعه تولید آنزیم تاناز توسط گونه های *Trichoderma spp.* در سایر کشورها توسط نگارندگان یافت شد (Shajitha & Nisha 2018; Iqbal & Kapoor, 2012). در مطالعه ای (Bradoo et al., 1996) از روش غربالگری سریع با استفاده از محیط های کشت جامد حاوی اسید تانیک به عنوان تنها منبع کربن برای بررسی توان تولیدی تاناز در گونه های قارچی استفاده کرد و نشان داد قارچ های *Aspergillus spp.* دارای توانایی بالا و برخی همانند *Penicillium spp.* و *Trichoderma spp.* دارای توانایی متوسط در تولید تاناز هستند. در این مطالعه مقدار فعالیت آنزیمی *T. viride* و *T. harzianum* به ترتیب ۱/۲۹ و ۹/۵۷ واحد در میلی لیتر بود که به خصوص در مورد *T. viride* بیشتر از تاناز تولیدی در آزمایش حاضر بود.

در تحقیقاتی بر *T. harzianum*، محققین (Aguilar et al., 2007) نشان دادند که فعالیت آنزیم تاناز در این قارچ بین ۱۶/۳۶- ۸/۶۱ واحد در میلی‌لیتر متغیر بود. در مطالعه‌ای (Lokeswari et al., 2010) تولید آنزیم تاناز توسط *T. viride* در شرایط مختلف دمایی و pH مورد بررسی و نشان داده شد که فعالیت آنزیمی تاناز تولیدی در بهترین شرایط دمایی کشت (۴۵ درجه سانتی‌گراد) و pH ۵/۵ به ترتیب برابر با ۲۲/۶۴ و ۲۳/۴۶ واحد در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه حداقل فعالیت آنزیمی ۱۲/۰ واحد در میلی‌لیتر گزارش شد.

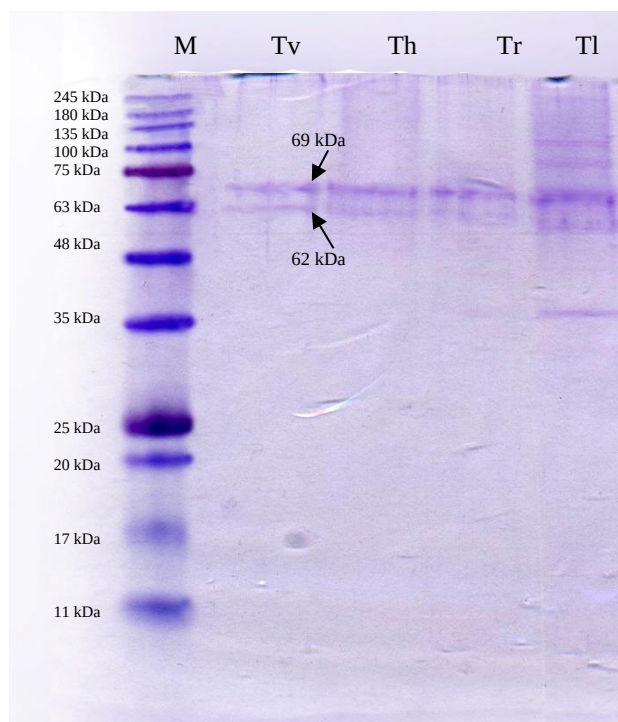
از دلایل اصلی پایین بودن فعالیت تاناز در آزمایش حاضر در مقایسه با دیگر مطالعات می‌تواند عدم استفاده از قندها در محیط کشت باشد. در مطالعه‌ای (Kannan et al., 2010) نشان داده شد که تولید تاناز توسط *Lactobacillus plantarum* در محیط‌های کشتی که تنها از اسید تانیک برای تامین کربن استفاده شد در مقایسه با محیط‌های کشت حاوی گلوکز و گالاکتوز بسیار کمتر و حدود ۰/۷ واحد در میلی‌لیتر بود. به غیر از ترکیب محیط کشت از دیگر عوامل تاثیرگذار بر فعالیت تاناز زمان گرمخانه‌گذاری، درجه حرارت، pH و مقدار سوبستراست که می‌تواند مقدار تاناز تولیدی را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه‌ای (Iqbal & Kapoor, 2012) تولید تاناز در شرایط کشتی مختلف برای *T. harzianum* مورد بررسی قرار گرفت و بهترین دما و pH به ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۵/۵ گزارش شد.

پروفایل پروتئین‌های ترشح شده خارج ریشه‌ای در سوپرناتانت محیط‌های کشت TFM شبه گونه‌های *Trichoderma spp* در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به وجود تانن به عنوان تنها منبع انرژی در محیط‌های کشت، وزن تاناز تولیدی حدود ۱۳۱ کیلودالتون تخمین زده شد (دو زیر واحد ۶۲ و ۶۹ کیلودالتونی) که در تمامی شبه گونه‌های *Trichoderma spp* مورد مطالعه وجود داشت. دیگر باندهای پروتئینی مشاهده شده در محیط کشت *T. longibrachiatum* می‌تواند به دلیل لیز شدن دیواره سلولی قارچ و در نتیجه ورود دیگر پروتئین‌ها در محیط کشت باشد. زیرا فرآیند لیز شدن و کدر شدن محیط کشت در فلاسک‌های حاوی این شبه گونه در روز پایانی قابل مشاهده بود.

اطلاعاتی در خصوص وزن مولکولی تانازهای تولیدی توسط *Trichoderma spp* توسط نگارندگان یافت نشد. وزن مولکولی تاناز در دیگر میکروارگانیسم‌ها ۵۰ تا ۳۲۰ کیلودالتون است و گزارش شده است که تاناز دارای دو یا تعداد بیشتری زیر واحد است (Chávez-González et al., 2012). در مطالعه حاضر دو زیر واحد با وزن ۶۲ و ۶۹ کیلودالتون مشاهده شد. در مطالعه‌ای (Nadaf et al., 2011) گزارش شد که باکتری *Rhodococcus spp* دو آنزیم تاناز با دو زیر واحد با وزن مولکولی حدود ۶۰ و ۶۲ کیلودالتون تولید می‌کند.

عموماً تاناز تولیدی توسط *Aspergillus spp* نیز دارای چند زیر واحد پپتیدی با وزن مولکولی ۱۶۸ تا ۳۱۰ کیلودالتون گزارش شده است (Sabu et al., 2005; Hatamoto et al., 1996). هاتاموتو و همکاران (Hatamoto et al., 1996) گزارش کردند

که *Aspergillus oryzae* دارای چهار جفت از دو نوع مختلف زیر واحد (۳۰ و ۳۳ کیلودالتون) هستند که با استفاده از پیوندهای دی‌سولفیدی بهم متصل شده‌اند که وزن ۳۰۰ کیلودالتون را ایجاد می‌کنند. در مطالعه‌ای وزن مولکولی تاناز *Aspergillus phoenicis* را ۲۱۸ کیلو دالتون با زیر واحد ۱۲۰ و ۹۳ کیلودالتون گزارش شد (Riul et al., 2013).



شکل ۳: پروفایل پروتئین‌های ترشح شده در روش‌های کشت‌های *T. viride* (Tv)، *T. harzianum* (Th)، *T. ressei* (Tr) و *T. longibrachiatum* (Tl).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر برای نخستین بار چهار شبه گونه *Trichoderma spp.* را از نظر تولید آنزیمی تاناز، تنها با استفاده با اسید تانیک به عنوان تنها منبع تامین کننده انرژی، مورد بررسی قرار داد که سه جدایه بومی ایران برای نخستین بار جداسازی و شناسایی شدند. نتایج این بررسی نشان داد که هر چهار شبه گونه مورد بررسی توانستند در محیط کشت‌های دارای تانن به عنوان تنها منبع کربنی رشد نموده و آنزیم تاناز تولید کنند. کلیه جدایه‌های جدید جدا شده از خاک در مقایسه با جدایه قارچ *T. ressei* (PTCC ۵۱۴۲) تهیه شده توانایی تولید پروتئین و آنزیم تاناز بالاتری داشتند که نشان می‌دهد احتمال دستیابی به جدایه‌های قارچی که کاندید مناسبی برای تولید آنزیم تاناز باشند وجود دارد. این مطالعه اولین گام در غربالگری به منظور دستیابی به چنین منابع ژنتیکی در قارچ‌های ساپروفیت ایرانی بوده است. پروفایل پروتئینی جدایه‌های قارچی مورد بررسی نشان دادند که وزن مولکولی تاناز تولید ۱۳۱ کیلودالتون با دو زیر واحد به وزن تقریبی ۶۲ و ۶۹ کیلودالتون است. با توجه به این که

مطالعات اندکی بر تولید تاناز توسط *Trichoderma spp.* انجام شده است و همچنین از آنجا که برای اولین بار در آزمایش حاضر تولید تاناز در *T. ressei* و *T. longibrachiatum* بررسی شده است، بهینه سازی محیط تخمیر به منظور القای تولید آنزیم تاناز در ادامه مطالعات ضرورت دارد. مطالعه دقیق تر خصوصیات تاناز تولیدی و همچنین تعیین توالی نواحی کد کننده آنزیم در مطالعات آتی نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- Abdulla, J., Rose S.P., Mackenzie, A.M., Mirza, W. and Pirgozliev, V. (2016). Exogenous tannase improves feeding value of a diet containing field beans (*Vicia faba*) when fed to broilers. *British Poultry Science*, 57: 246-250.
- Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A. and Contreras-Esquivel, J.C. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76: 47-59.
- 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.
- Bradoo, S., Gupta, R. and Saxena, R. (1996). Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid simple plate assay. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42: 325-329.
- Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L.V., Balagurusamy, N., PradoBarragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J.C. and Aguilar, C.N. (2012). Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology*. 445-459.
- Devi, P., Prabhakaran, N., Kamil, D., Pandey, P. and Borah, J.L. (2012) Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma spp.* and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 11: 15150-15160.
- Gammoun, A., Moros, J., Tahiri, S., Garriques, S. and Guardia, M. (2006). Partial least-squares near-infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by tanned solid wastes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 766-770.
- Gams, W. and Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London, 3-34.

- Ghasemi, S., Safaie, N., Shahbazi, S., Shams-Bakhsh, M. and Askari, H. (2019). Enhancement of Lytic Enzymes Activity and Antagonistic Traits of *Trichoderma harzianum* Using γ -Radiation Induced Mutation. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 21:1035-1048.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. and Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3189-3198.
- Hatamoto, O., Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K. and Sekine, H. (1996). Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 175: 215-221.
- Iqbal, H. and Kapoor, A. (2012). Culture Conditions for the Production of Tannase from *Trichoderma harzianum* MTCC 10841. *International Journal of Science and Technology*, 1: 584-595.
- Kannan, N., Aravindan, R. and Viruthagiri, T. (2010). Effect of culture conditions and kinetic studies on extracellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *Indian Journal of Biotechnology*, 10: 321-328.
- Kannangara, S.R., Dharmarathna, M.G.C.S. and Jayarathna, D.L. (2017) Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* Species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*, 12: 51-62.
- Kapoor. A. and Iqbal, H. (2013). Efficiency of Tannase Produced by *Trichoderma Harzianum* MTCC 10841 in Pomegranate Juice Clarification and Natural Tannin Degradation. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4: 641-650.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K. (1967). Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part II. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption. *Agricultural and Biological Chemistry*. 31: 513-518.
- Lokeswari, N., Jaya Raju, K., Pola, S. and Bobbarala, V. (2010). Tannin acyl hydrolase from *Trichoderma viride*. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 1: 106-109.
- Nadaf, N.H. and Ghosh, J.S. (2011). Production, Purification and Characterization of Tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3: 246-253.

- Papavizas, G.C. and Lumsden, R.D. (1982). Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant Disease*, 66: 1019-1020.
- Riul, A.J., Gonc, H.B., Goncalves, H.B., Jorge, J.A. and Guimaraes, L.H.S. (2013). Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85: 126-133 .
- Rout, S. and Banerjee, R. (2006). Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 351-356.
- Sabu, A., Kiran, G.S. and Pandey, A. (2005). Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620 *Food Technology and Biotechnology*, 43: 133-138.
- Shahbazi, S. and Askari, H. (2017) Investigating of the Influence of Cellulase Enzymes from Mutated Isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on Biodegradation of Cellulose Ia, Ib and III. *Agriculture Biotechnology*, 17: 35-44.
- Sekhar, Y.C., Ahammed, S.K., Prasad, T.N.V.K.V. and Devi, R.S.J. (2017). Identification of *Trichoderma* species based on morphological characters isolated from rhizosphere of groundnut (*ARACHIS HYPOGAEA* L). *International Journal of Science, Environment and Technology*, 6: 2056-2063.
- Shajitha, G. and Nisha, M.K., 2018. Tannase production from agro-wastes as substrate by *Trichoderma viride*. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(05), pp.1994-1997.
- Van-de Lagemaat, J. and Pyle, D.L. (2001). Solid-state Fermentation and Bioremediation: Development of a Continuous Process for the Production of Fungal Tannase. *Chemical Engineering Journal*, 84: 115-123 .

Tannase Production by *Trichoderma* Species in Tannin Containing Medium as a Sole Carbon and Energy Source

M. Behgar¹, P. Shawrang², F. Motamedi Sedeh², S. Shahbazi³

Received:2021.1.22

Accepted:2021.3.15

Abstract

This study investigated tannase production by *Trichoderma viride* (*Tv*), *Trichoderma harzianum* (*Th*), *Trichoderma longibrachiatum* (*Tl*) and *Trichoderma reesei* (*Tr*) in the medium containing tannin as the sole carbon and energy source. *Trichoderma* colonies were flat, and then gradually showed a white unsmooth appearance and finally turned to green. The largest and smallest spores were belonged to *Tl* and *Tr*, respectively. The highest and lowest spore numbers in MYG were belonged *Th* (5.48×10^6) and *Tv* (12.26×10^6), respectively. The largest growth rate of mycelium was observed in *Tl* and the lowest in *Tr* (1.25 and 0.45 cm/d, respectively). The level of protein produced in TFM by *Tr* was lower ($P<0.05$) than the other species. The tannase production and its specific activity were similar across species. The enzyme-specific activity in *Tl* was significantly more ($P<0.05$) than *Tv* (1.33 and 0.68 ul/mg protein). The molecular weight of the produced tannase was 131 kDa with two subunits weighing approximately 62 and 69 kDa.

Keywords: *Enzyme, Enzyme activity, Fungi, Medium*

1-Assistant Professor, Nuclear Science & Technology Research Institute

*(Corresponding author: mbehgar@aeoi.org.ir)

2-Associate professor, Nuclear Science & Technology Research Institute

3- Assistant Professor, Nuclear Science & Technology Research Institute

بررسی روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای در برآورد مشخصه‌های کمی جنگل

رضاحسین حیدری^{۱*}، کوثر خالقی^۲، نسیم سلیمی خواه^۲

چکیده

آگاهی از وضعیت تراکم و تاج‌پوشش درختان جنگل‌های زاگرس برای حفظ، احیا و گسترش آنها اهمیت دارد. هدف این بررسی معرفی مناسب‌ترین برآوردکننده روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای برای برآورد مشخصه‌های کمی این جنگل‌ها است. برای این منظور درختان و دو قطر بزرگ و کوچک تاج آنها در ۳۳ قطعه نمونه دایره‌ای شکل برداشت گردید. در هر قطعه نمونه دایره‌ای روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای نزدیکترین فرد، نزدیکترین همسایه، دومین نزدیکترین همسایه، ترکیبی، مربع T، نقطه مشترک و مربعی با نقطه مرکزی برداشت گردیدند. بعد تراکم و تاج پوشش درختان با روش دایره‌ای و برآوردکننده‌های روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای محاسبه گردید، با استفاده از معیار صحت نتایج برآوردکننده‌های فاصله‌ای با نتایج قطعه نمونه دایره‌ای شکل مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که براساس صحت قابل قبول (دامنه ۱۰ ± درصد)، از بین ۱۶ برآوردکننده روش‌های مذکور، مناسب‌ترین آنها برای برآورد تراکم و تاج پوشش درختان این جنگل‌ها، سومین برآوردکننده روش مربعی با نقطه مرکزی (PCQ3) بود.

واژه‌های کلیدی: تاج پوشش، تراکم، صحت، کرمانشاه، مقدار واقعی.

۱- استادیار، گروه منابع طبیعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

* (نویسنده مسئول: rhaidari@razi.ac.ir)

۲- کارشناس ارشد، گروه منابع طبیعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

مقدمه

بنا به گزارش سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری کشور قدمت جنگل‌های بلوط زاگرس ۵۵۰۰ سال است. ایجاد و گسترش جنگل در این ناحیه به خاطر بارندگی‌های ناشی از استقرار سیستم مدیترانه‌ای و دریای سیاه بوده و از ناحیه سردشت آذربایجان غربی تا فیروزآباد فارس امتداد دارد. مساحت این منطقه اکولوژیکی ۵۴۴۰۴۹۴ هکتار است. یکی از معیارهای تعیین مرز این ناحیه گونه گیاهی غالب آن، بلوط ایرانی است (F.R.W.M.O.¹, 2021). به دلیل اهمیت زیاد این جنگل‌ها در ایران، به‌ویژه از نظر حفاظت آب، خاک و تنوع زیستی، مدیریت بهینه آنها ضرورت پیدا می‌کند (Bazrafkan et al., 2014). جنگل‌ها دارای ارزش‌های مختلفی مانند تولید چوب، حفاظت از سیستم هیدرولوژیکی، ثبات اقلیمی (مثل جذب و ذخیره کربن)، تولید اکسیژن، تثبیت خاک و ... هستند، که در جنگل‌های زاگرس به تولید ۲/۵ تن اکسیژن و جذب ۶۸ تن گرد و غبار در هکتار در سال و آزادکردن ماده ضد عفونی کننده و از بین برنده میکروارگانیسم‌های مضر و بعضی از حشرات مضر به نام فیتونسید اشاره کرد (Badehian, 2017). دو کارکرد مهم جنگل‌های بلوط زاگرس حفاظت آب و خاک هستند که با توجه به غالب بودن آب و هوای خشک و نیمه‌خشک در کشور از اهمیتی انکارنشدنی برخوردارند؛ آنچنانکه هر نوع سرمایه‌گذاری حفاظتی و احیایی را توجیه پذیر نشان می‌دهد. جنگل‌های زاگرس با توجه به زادآوری محدود و پایین، جزو جنگل‌های حفاظتی و حمایتی قرار می‌گیرد (F.R.W.M.O., 2021). هرگونه برنامه ریزی برای مدیریت توده‌های جنگلی نیازمند اطلاعاتی همه جانبه، دقیق و بهنگام است تا هدف حفاظت و استمرار این جنگل‌ها تحقق و تداوم یابد (Salehi & Taheri Sarteshnizi, 2014). جمع‌آوری اطلاعات کمی و کیفی شرط لازم برای برنامه‌ریزی صحیح و اصولی در هر زمینه‌ای است (Karamshahi et al., 2012). در صورت وجود شرایط مورد نیاز، آماربرداری جنگل بر اساس اندازه‌گیری تک تک درختان در توده و به صورت صددرصد انجام می‌شود که این روش در شرایط خاص و به ندرت استفاده می‌شود. با توجه به اینکه جنگلداران نیاز به اطلاعات ارزان و راحت دارند تا شرایط گذشته و فعلی را مشخص کنند تا بوسیله آن تغییرات ساختار جنگل تحت نظارت خود را بررسی نمایند (Savage et al., 2018). بنابراین در اغلب موارد، جمع‌آوری اطلاعات براساس نمونه‌برداری انجام می‌شود که این اندازه‌گیری یا در قالب قطعات نمونه و یا بصورت روش‌های فاصله‌ای انجام می‌گیرد (Sheikholeslami et al., 2017). روش‌های نمونه برداری جنگل از نظر دقت، صحت، کارایی و هزینه تنوع زیادی دارند (Seraj et al., 2019). در تحقیقات بوم‌شناسی هدف اصلی نمونه‌گیری، دریافت اطلاعات کافی با کمترین تلاش و زمان دغدغه عمده در مورد نمونه‌برداری از پوشش گیاهی است. هنگامی که نمونه‌برداری با قطعه نمونه دشوار یا پرهزینه است از روش‌های فاصله‌ای استفاده می‌شود (Borges Silva et al., 2017). در روش‌های نمونه‌برداری فاصله‌ای که انواع مختلفی دارد، برخی از مشخصه‌های مربوط به یک گیاه یا درخت که در فاصله‌ای از یک نقطه

(نقطه شروع نمونه‌برداری)، یک گیاه یا درخت دیگر قرار دارد برای هدف یا اهدافی خاص اندازه‌گیری می‌شوند (Haidari et al., 2008). یکی از مزایای استفاده از روش‌های نمونه‌برداری فاصله‌ای سرعت اجرا و پرهیز از نمونه‌های مملو از درخت یا کاملاً بی‌درخت است، زیرا این روش‌ها همیشه با تعداد مشخصی درخت انجام می‌گیرد (Kleinn & Vilcko, 2006). از سوی دیگر پیچیدگی و تنوع بوم‌سازگان‌ها ما را قادر به استفاده از روش‌های ساده و ارزان‌تر مانند روش‌های فاصله‌ای در این جنگل‌ها می‌سازد. پیدا کردن ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش و همچنین دقیق‌ترین روش، در میان تمام روش‌های فاصله‌ای، برای جوامع جنگلی بسیار مهم است (Basiri et al., 2018).

گرچه در مواردی قابلیت این روش‌ها مورد تأیید قرار گرفته است، اما موارد دیگری نیز وجود دارد که این روش‌ها را اریب نشان داده‌اند. از جمله مهمترین عوامل تأثیرگذار بر صحت برآوردها در این روش، الگوی پراکنش مکانی افراد است. بنابراین می‌توان برای جنگل‌های مختلف و نیز گونه‌های مختلف جنگل انتظار نتایج متفاوتی از نظر اریبی این روش‌ها داشت (Askari et al., 2013). از طرف دیگر فرمول‌های ارائه شده برای برآورد تراکم با هریک از روش‌های فاصله‌ای اولاً فرمول‌های تجربی هستند و از طرف دیگر برای هر روش گاهی چندین برآوردکننده (رابطه) بوسیله افراد مختلف ارائه شده است که در شرایط یکسان نیز نتایج یکسانی را ارائه نمی‌دهند، که برای نمونه به موارد زیر می‌توان اشاره کرد.

حیدری و همکاران برای روش مربعی با نقطه مرکزی (چهارگوش) برآوردکننده جدیدی را پیشنهاد و در جنگل‌های زاگرس استان کرمانشاه در یک توده با الگوی کپه‌ای مورد بررسی قرار دادند، نتایج بررسی آنها نشان داد که برآوردکننده جدید نسبت به دو برآوردکننده قبلی همین روش که توسط Cottm و Curtis (1954) و Polard (1971) ارائه شده بودند، مناسب‌تر بود، هرچند هیچکدام از سه برآوردکننده روش مربعی با نقطه مرکزی برای کارهای پژوهشی مناسب نبودند (Haidari et al., 2007). کیانی و همکاران به مقایسه کارایی روش‌های نمونه‌برداری فاصله‌ای در تاغ‌زارهای منطقه سیاهکوه استان یزد پرداختند، نتایج تحقیق آنها نشان داد که برای برآورد تراکم از بین روش فاصله‌ای، روش‌های فاصله مرتب برای سومین فرد و مربع تی پس از روش‌های چنددرختی و برای برآورد تاج پوشش روش‌های مربع با نقطه مرکزی و چند درختی در این منطقه مناسب بودند (Kiani et al., 2013). شیخ الاسلامی و همکاران تحقیقی با هدف بررسی تأثیر توزیع مکانی درختان بر کارایی روش‌های نمونه‌برداری فاصله‌ای و قطعه‌نمونه‌ای انجام دادند. برای این منظور، یک توده بلوط ایرانی با الگوی مکانی پراکنده در استان کهگیلویه و بویراحمد و یک توده بنه با الگوی مکانی کپه‌ای در استان فارس انتخاب کردند. شش روش فاصله‌ای و شش روش قطعه‌نمونه‌ای در یک شبکه ۱۰۰متر در ۱۰۰متر در هر دو توده برای برآورد تراکم و درصد تاج‌پوشش استفاده کردند. کارایی روش‌ها با مقایسه آماری نتایج با مقدار واقعی، معیار صحت و درصد مجذور میانگین مربعات خطا ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که از میان روش‌های فاصله‌ای، دو روش نزدیکترین فرد و نزدیکترین همسایه در توده بنه و روش خط‌نمونه در توده بلوط ایرانی

کارآمد بودند. همچنین همه روش‌های قطعه‌نمونه‌ای در دو توده کارآیی لازم را داشتند. بطور کلی نتایج نشان داد که بر خلاف روش‌های قطعه‌نمونه‌ای، پراکنش مکانی درختان بر صحت و دقت روش‌های فاصله‌ای مورد بررسی به طور معنی‌داری تاثیر می‌گذارد (Sheikholeslami et al., 2017). تحقیقی تحت عنوان ارزیابی روش‌های فاصله‌ای برای برآورد تراکم جمعیت توده‌های طبیعی *Populus euphratica* Olivier در جنگل‌های کنار رودخانه مارون ایران توسط Basiri و همکاران انجام شد (Basiri et al., 2018). آنها ۴۰ برآوردگر برای ارزیابی تراکم درختان *Populus euphratica* Olivier در توده‌های خالص و آمیخته استفاده کردند. ترکیبی از سه روش نمونه‌برداری فاصله‌ای به صورت پایه و روش n درختی در هر دو توده برطبق همه معیارهای برآورد تراکم بهترین بوده‌اند. علاوه بر این روش ترانسکت توسط پارکر ($g = 3$) و روش کوادرات بهترین روش‌ها برای برآورد تراکم تنها در توده خالص بوده و روش مربعی با نقطه مرکزی زاویه پراکنده برترین روش در توده آمیخته بوده است.

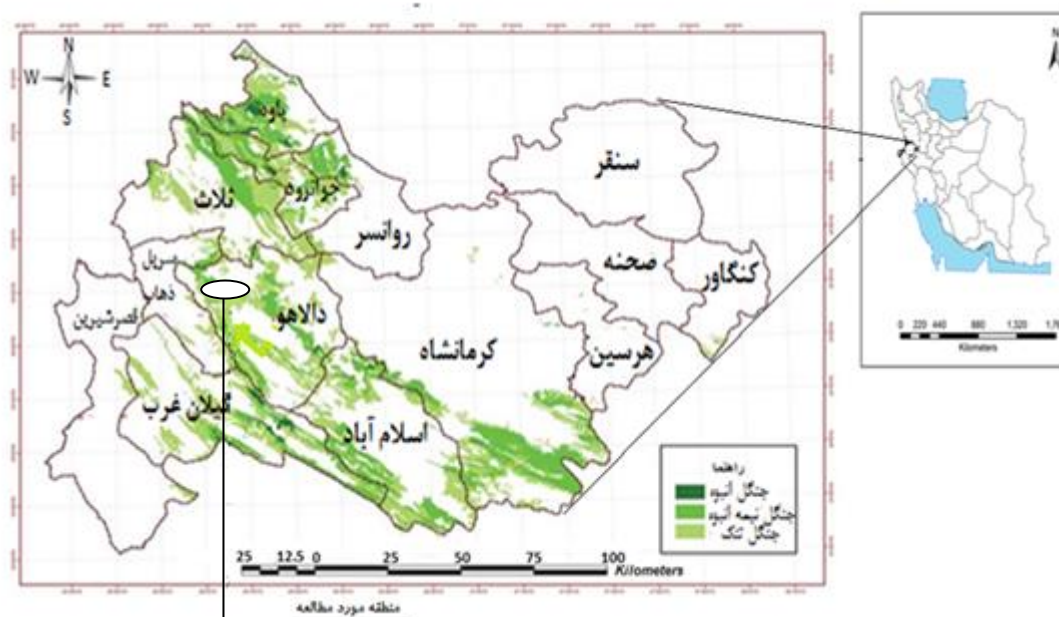
در پژوهشی تحت عنوان تجزیه و تحلیل جامعه جنگلی و روش مربعی با نقطه مرکزی ۱۴ توده جنگلی متفاوت را از نظر سن، ارتفاع و رژیم‌های آشفستگی با استفاده از روش‌های قطعه نمونه ثابت و مربعی با نقطه مرکزی اندازه‌گیری کردند (Bryant et al., 2004). در برآورد تراکم، این دو روش اریب بودند، وقتی که پایه‌ها متراکم بودند، برآورد تراکم با استفاده از روش مربعی با نقطه مرکزی کمتر از برآورد تراکم در روش قطعه نمونه ثابت بود و برعکس، وقتی پایه‌ها بطور یکنواخت فاصله دار بودند، مقدار تراکم در روش مربعی با نقطه مرکزی بیشتر از این مقدار در روش قطعه نمونه ثابت بود. پژوهشگران این تحقیق بیان کردند که اریب مشاهده شده نشان دهنده این است که در آنالیزهای سطح جامعه، با احتیاط روش مربعی با نقطه مرکزی بکار برده شود. در مطالعه Kint و همکاران صحت و کارایی شاخص‌های ساختاری در هنگام استفاده از قطعات نمونه و همچنین روش‌های فاصله‌ای را مورد بررسی قرار داده و به محاسبه چهار شاخص مبتنی بر نزدیکترین همسایه پرداخته و بیان کردند که استفاده از روش‌های قطعه‌نمونه برای تعیین شاخص‌های ساختاری در سطح دقت بالا اغلب نیازمند قطعات نمونه خیلی بزرگ است و البته روش‌های فاصله‌ای بطور کلی موثرتر از قطعات نمونه بودند (Kint et al., 2004). به مقایسه سه روش فاصله‌ای، ترانسکت و ترانسکت با عرض ثابت برای تعیین تراکم درختی در جنگل‌های تروپیکال، در پارک Bwindi اوگاندا پرداخته‌اند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که روش‌های فاصله‌ای حتی در شرایط سخت بهترین نتایج را ارائه می‌دهند (Kissa & Sheli., 2012). در مطالعه‌ای، سه روش نمونه‌برداری مربع T، مربعی با نقطه مرکزی N و درختی را در جنگل مورد تخریب قرار گرفته *Pittosporum undulatum* مورد مقایسه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که روش مربع تی دقیق تر و صحیح‌تر بوده و بعد از آن روش مربعی با نقطه مرکزی مناسب است (Silva et al., 2017).

هدف این تحقیق، بررسی کارایی تعدادی از برآودکننده‌های روش‌های نمونه‌برداری فاصله‌ای جهت برآورد تراکم و تاج پوشش درختان جنگل‌های زاگرس از نظر معیار صحت و معرفی مناسب ترین برآودکننده (روش نمونه برداری فاصله‌ای) برای

برآورد مشخصه‌های مذکور است. لازم به توضیح است که در این بررسی برای اولین بار برآوردکننده ارائه شده توسط Haidari et al. (2007) برای روش مربعی نقطه مرکزی با ۱۵ برآوردکننده دیگر روش‌های فاصله‌ای آن هم در سه الگوی پراکنش مختلف (کپه ای، تصادفی و پراکنده) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: منطقه مورد مطالعه در داخل جنگل آموزشی، پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه، در حد فاصل شهرستان‌های کرد غرب و سرپل ذهاب استان کرمانشاه واقع شده است. مساحت جنگل مذکور حدود ۱۶۰۰۰ هکتار است، که در غرب به روستای حبیب وند، در شمال به کوه‌های دالاهو و در شرق به روستای سرمیل و در جنوب به دامنه ارتفاعات کوه نوا محدود می‌شود. این منطقه از نظر موقعیت جغرافیایی در حد فاصل عرض‌های جغرافیایی $34^{\circ}53'$ تا $34^{\circ}53'$ شمالی و طول‌های جغرافیایی $45^{\circ}55'$ تا $46^{\circ}07'$ شرقی واقع شده است. از نظر توپوگرافی منطقه‌ای است کوهستانی و دامنه ارتفاعی آن از سطح دریا از ۷۶۰ متر تا ۲۵۰۰ متر است (شکل ۱).



جنگل آموزشی، پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه (منطقه مورد مطالعه)

شکل ۱: موقعیت منطقه مورد مطالعه در استان کرمانشاه

پوشش گیاهی منطقه از نظر جوامع جنگلی در جامعه بلوط ایرانی *Quercetum persicum* قرار داشته و گونه بلوط ایرانی *Quercus Persica J.& SP.* گونه غالب جنگل را تشکیل می‌دهد (Khaleti, 2019). در منطقه مورد نظر ۶۵ گونه گیاهی متعلق به ۵۱ جنس و ۲۹ خانواده شناسایی گردیده است (Haidari et al., 2019). خاک منطقه بیشتر از نوع شنی-رسی است. براساس آمار

ایستگاه هواشناسی شهرستان دالاهو (کندغرب)، میانگین بارش سالیانه ۳۴۸/۱ میلی متر در دوره آماری ده ساله است. متوسط بیشینه‌ی دمای گرمترین ماه سال، کمینه سردترین ماه و میانگین سالیانه شهرستان دالاهو به ترتیب ۳۷/۵۷، ۱۰/۱۳- و ۱۳/۷۲ درجه سانتی گراد است. اقلیم این شهرستان با روش دومارتن، نیمه‌خشک و با روش آمبرژه نیمه خشک سرد است (Dehshiri, 2019). منطقه مورد مطالعه سازند آسماری-شهبازان مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی را دارا است. هرچند در محدوده نقشه‌های ۱/۲۵۰۰۰، این سازند تفکیک نشده و با سازند آسماری شناسایی و نقشه‌برداری شده اما سازند شهبازان با نظم و بطور هم‌شیب بر روی افق‌های قرمز رنگ کاشان قرار گرفته و از نظر لیتولوژی شامل دولومیت و آهک‌های دولومیتی سفید تا قهوه‌ای رنگ حفره‌دار است. واحد پایینی سازند کربناتی شهبازان، سازند آواری کاشان بصورت تدریجی و همساز بوده و حد بالایی سازند شهبازان به سازند آسماری ختم می‌شود. در هر صورت تفکیک این دو در روی زمین میسر نبوده و از هر دو به صورت یک واحد غیرقابل تفکیک سازند آسماری-شهبازان بر روی نقشه دیده می‌شود. خاک‌های منطقه نیمه‌عمیق و کم عمق با بافت متوسط بر روی سنگ و سنگریزه بوده و همچنین فرسایش، محدودیت عمق خاک نیز در منطقه وجود داشته و رخنمون سنگی در نقاط مرتفع به چشم می‌خورد. بر اساس طبقه‌بندی خاک‌های متداول ایران، خاک منطقه در کوهستان‌های جنگلی در قسمت‌هایی که خاک کم‌عمق و توام با بیرون‌زدگی سنگی زیاد است، زمین معمولاً بدون خاک بوده و در برخی قسمت‌ها دارای خاک کم‌عمق است. ولی در بیش‌تر مناطق دارای خاک نیمه‌عمیق بر روی مواد آهکی است که دارای اسیدیته حدود ۸/۱-۷/۵ و هدایت الکتریکی عصاره گل اشباع آنها از دو میلی‌موس کم‌تر است. حدود ۴۰-۵۰ درصد کربنات کلسیم داشته و میزان کربن آلی در طبقه سطحی حدود ۰/۷-۱/۲ است و کلا گروه بزرگ خاک colluvial soils-colicisols را تشکیل می‌دهند (Khaleti, 2019).

روش نمونه‌برداری

در داخل جنگل مذکور، ابتدا با بازدید میدانی محدوده‌ای به مساحت ۳۳ هکتار مشخص گردید. در مرحله‌ی بعد از جامعه‌ی مورد نظر با استفاده از شبکه آماربرداری ۱۰۰ متر در ۱۰۰ متر و با استفاده از طرح آماربرداری منظم- تصادفی تعداد ۳۳ نقطه نمونه برداری ابتدا بر روی نقشه منطقه منتقل گردید و بعد با مراجعه به منطقه، نقاط بر روی زمین مشخص گردیدند. بعد در هر نقطه نمونه برداری یک قطعه نمونه دایره‌ای شکل ۱۰ آری بر روی زمین مشخص و تعداد درختان داخل آن شمارش و همچنین دو قطر بزرگ و کوچک تاج درختان آن اندازه گیری و یادداشت گردید. هم‌زمان با برداشت هر قطعه نمونه دایره‌ای شکل، روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای نزدیکترین فرد، نزدیکترین همسایه، ترکیبی، دومین نزدیکترین همسایه، مربع T، نقطه مشترک و مربعی با نقطه مرکزی به طوری که نقطه‌ی شروع آنها (نقطه نمونه برداری) با مرکز قطعه نمونه دایره‌ای شکل یکی بود، برداشت گردیدند.

تعیین الگوی مکانی درختان

آماردانان توزیع های آماری متفاوتی را برای توصیف الگوی پراکنش افراد در جمعیت‌های تحت بررسی به کار گرفته اند. یکی از این توزیع ها برای تعیین الگوی پراکنش گیاهان در روش قطعه نمونه، توزیع پواسون است، که در آن از نسبت واریانس به میانگین داده‌ها (رابطه ۱) استفاده می‌شود (Moghadam, 2001).

$$I = s^2 / \bar{x} \quad \text{رابطه ۱}$$

I = شاخص پراکنش، s^2 = واریانس تعداد گیاه در قطعات نمونه، $\bar{x}$ = میانگین تعداد گیاه در قطعات نمونه
اگر واریانس برابر میانگین باشد، مقدار این نسبت برابر یک خواهد بود و الگوی پراکنش افراد به شکل تصادفی خواهد بود. اگر نسبت واریانس به میانگین کمتر از یک باشد، جمعیت دارای الگوی پراکنش یکنواخت و اگر از یک بیشتر باشد دارای الگوی پراکنش تجمعی (کپه‌ای) خواهد بود. ساده ترین آزمون آماری برای این شاخص، استفاده از آزمون کای اسکویر (رابطه ۲) است.

$$\chi^2 = I(n-1) \quad \text{رابطه ۲}$$

I = شاخص پراکنش، n = تعداد قطعه نمونه، χ^2 = مربع کای با درجه آزادی $n-1$
اگر کای اسکویر محاسبه شده بین دو حد $\chi^2_{0.025}$ و $\chi^2_{0.975}$ باشد، فرض تصادفی بودن پراکنش گیاهان پذیرفته می‌شود، اگر کمتر از $\chi^2_{0.975}$ باشد، گیاهان دارای توزیع یکنواخت و اگر بیشتر از $\chi^2_{0.025}$ باشد، گیاهان دارای توزیع کپه‌ای خواهند بود (Moghaddam, 2001).

یکی از معیارهای مقایسه نتایج روش‌های نمونه‌برداری در جنگل معیار صحت است. صحت، نزدیکی اندازه یک مشخصه اندازه‌گیری یا محاسبه شده به مقدار واقعی آن است. در این بررسی صحت با استفاده از رابطه (۳) محاسبه گردید (Southwood & Henderson, 2000).

$$A\% = \pm 100 \cdot ((Estimated - True) / True) \quad \text{رابطه ۳}$$

در فرمول فوق، مقدار بدست آمده از روش دایره‌ای به عنوان مقدار واقعی و مقادیر بدست آمده از روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای به عنوان مقدار برآوردی در نظر گرفته شده اند. هرچه مقدار صحت کمتر باشد، نشان دهنده نزدیکی مقدار برآورد شده به مقدار واقعی است. برای کارهای پژوهشی مقدار صحت در دامنه $\pm 10\%$ درصد است (Southwood & Henderson, 2000). در این بررسی هدف یافتن مناسب‌ترین برآوردکننده از بین برآوردکننده‌های روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای با توجه به معیار صحت قابل قبول، جهت امور پژوهشی در جنگل‌های زاگرس است.

آنالیزهای آماری

برای انجام محاسبات، داده‌های جمع‌آوری شده در فرم‌های آماربرداری به کامپیوتر وارد گردید و برای آمار توصیفی داده‌ها از نرم افزار SPSS 22، برای رسم نمودارها و محاسبه تاج پوشش از نرم افزار Excel و برای محاسبه تراکم روش‌های فاصله‌ای و الگوی پراکنش درختان از نرم افزار Ecological Methodology (Krebs., 1989) استفاده گردید. ابتدا الگوی پراکنش درختان با استفاده از داده‌های روش قطعه نمونه دایره‌ای شکل (نسبت واریانس به میانگین) محاسبه گردید. در مرحله بعد تعداد و سطح تاج پوشش درختان در هکتار با روش دایره‌ای شکل و نیز با رابطه‌های روش‌های فاصله‌ای (جدول ۱)، محاسبه گردیدند. در نهایت تعداد در هکتار و سطح تاج پوشش بدست آمده با برآورد کننده‌های روش‌های فاصله‌ای با استفاده از معیار صحت با مقادیر بدست آمده با روش قطعه نمونه دایره‌ای شکل به عنوان مقدار واقعی (چون روش‌های فاصله‌ای در داخل روش قطعه نمونه دایره‌ای برداشت گردیدند)، مقایسه گردیدند. بعد از اینکه مشخص گردید که توده مورد بررسی دارای الگوی کپه‌ای بود، برای بررسی کارایی برآورد کننده‌های روش‌های فاصله‌ای در حالت‌های دیگر الگوی پراکنش (تصادفی و پراکنده)، الگوهای مذکور شبیه سازی گردیدند. برای شبیه سازی الگوهای تصادفی و پراکنده، در مرحله اول تعدادی از داده‌های جمع‌آوری شده (قطعات نمونه دایره‌ای) که انحراف معیار بیشتری داشتند، حذف شدند تا نسبت واریانس به میانگین برابر یک (الگوی تصادفی) و در ادامه نسبت واریانس به میانگین کمتر از یک (الگوی پراکنده) بدست آمد و در نهایت در این دو حالت (تصادفی و پراکنده) نیز تراکم و تاج پوشش بدست آمده با برآورد کننده‌های روش‌های فاصله‌ای با روش دایره‌ای مانند حالت کپه‌ای براساس معیار صحت مقایسه گردیدند (Haidari, 2020). برای الگوهای پراکنش درختان این بررسی مراحل کار در سه مرحله زیر انجام گرفت: الف- ابتدا برای تمامی نمونه‌های برداشت شده در جنگل با استفاده از نسبت واریانس به میانگین داده‌ها، برای درختان توده الگو تعیین گردید (الگوی کپه‌ای بدست آمد). بعد برای بدست آوردن الگوهای تصادفی و پراکنده با استفاده از داده‌های اصلی از روش‌های زیر (شبیه سازی) استفاده گردید: ب- برای الگوی تصادفی، تعدادی از قطعات نمونه که بیشترین انحراف نسبت به میانگین داده‌ها را داشتند، حذف گردیدند تا نسبت واریانس به میانگین برابر یک (الگوی تصادفی) شد. پ- برای الگوی پراکنده، کار مانند مرحله "ب" ادامه یافت تا نسبت واریانس به میانگین کمتر از ۰/۵ (الگوی پراکنده) بدست آمد.

جدول ۱: رابطه‌های برآوردکننده تراکم درختان روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای

روش نمونه برداری	برآوردکننده‌های روش‌های فاصله‌ای	منبع	علامت
نزدیکترین فرد	$\hat{N} = n / (\pi \sum r_{pi}^2)$	Byth & Ripley (1980)	NI1
	$\hat{N} = 1 / (\sum r_{pi}^2 / n)$	Cottam & Curtis (1956)	NI2
	$\hat{N} = (n - 1) / (\pi \sum r_{pi}^2)$	Morisita (1957)	NI3
نزدیکترین همسایه	$\hat{N} = n / (\pi \sum r_{ni}^2)$	Byth & Ripley (1980)	NN1
	$\hat{N} = 1 / (\sum r_{ni}^2 / n)$	Cottam & Curtis (1956)	NN2
	$\hat{N} = 1 / (\sum r_{ni}^2 / n)$	Cottam & Curtis (1956)	NN3
دومین نزدیکترین همسایه	$\hat{N} = 1 / (\sum r_{mi}^2 / n)$	Cottam & Curtis (1956)	SNN
ترکیبی	$\hat{N} = (NI2 + NN3) / 2$	Cottam & Curtis (1956)	CM
نقطه مشترک	$\hat{N} = [NI2 + NN3 + SNN] / 3$	Engeman <i>et al.</i> (1994)	JPM
مربع تی	$\hat{N} = 2n / (\pi \sum r_{ni}^2)$	Krebs C.J. (2001)	TS1
	$\hat{N} = n^2 / [\sum r_{pi}^2 * \sum r_{ni}^2]$	Byth (1982)	TS2
	$\hat{N} = 2n / [\pi \sum r_{pi}^2 + 0.5 \pi \sum r_{ni}^2]$	Diggle (1975)	TS3
	$\hat{N} = n / [\pi (\sum r_{pi}^2 * 0.5 \pi \sum r_{ni}^2)^{0.5}]$	Diggle (1975)	TS4
مربعی با نقطه مرکزی	$\hat{N} = 1 / [\sum r_{ij}^2 / 4n]$	Cottam & Curtis (1956)	PCQ1
	$\hat{N} = [4(n-1)] / \pi \sum r_{ij}^2$	Pollard (1971)	PCQ2
	$\hat{\lambda}_i = [r_{i1}r_{i2}r_{i3}r_{i4}]^2 / [\sum r_{ij}^2 / 4]^{10}, \hat{N} = \sum \lambda_i / n$	Haidari <i>et al.</i> (۲۰۰۷)	PCQ3
قطعه نمونه دایره‌ای	Plot	-----	-----
تاج پوشش درختان	$\bar{cc}_i = \sum cc_i / k$, $cc_i = (\pi / 4)(CD_{1i}^2 * CD_{2i}^2)$	Zobeiri (2007)	----

که: $\hat{N}$ = تعداد در واحد سطح (در مترمربع)، r_{pi} = فاصله نزدیکترین فرد تا نقطه نمونه برداری، r_{ni} = فاصله نزدیکترین همسایه تا نزدیکترین فرد، r_{mi} = فاصله دومین نزدیکترین همسایه، r_{pij} = فاصله نزدیکترین فرد در نقطه نمونه برداری i در چارک j ($j = 1; 2; 3; 4$)، n = تعداد نمونه، $\hat{\lambda}_i$ = تعداد در واحد سطح در نقطه نمونه برداری i در فرمول حیدری و همکاران (۱۳۸۶)، $\pi = 3/14$ ، CD_{1i} = قطر بزرگ تاج درخت، CD_{2i} = قطر کوچک تاج درخت، cc_i = سطح تاج پوشش درخت، $\bar{cc}$ = متوسط سطح تاج درختان در هر روش، k = تعداد درختان هر روش (در نزدیکترین فرد $k = n$ ، در نزدیکترین همسایه، ترکیبی، دومین همسایه و مربع T $k = 2n$ ، نقطه مشترک $k = 3n$ و مربعی با نقطه مرکزی با فرمولهای کوتام و کورتیس (۱۹۵۴) و پولارد (۱۹۵۴) است)، برای برآورد تعداد در هکتار از فرمول $\hat{N}_{tree/ha} = 10000 \times \hat{N}$ و برای برآورد سطح تاج درختان در هکتار با روش‌های فاصله‌ای از فرمول $\bar{CC}_{m^2ha-1} = \hat{N}_{treeha-1} * \bar{CC}$ استفاده شد.

نتایج و بحث

آمار توصیفی در توده مورد بررسی نشان داد که توده مورد بررسی یک توده خالص بلوط ایرانی است، زیرا بلوط ایرانی بیشترین درصد فراوانی و درصد تاج پوشش را در توده مورد بررسی داشت (جدول ۲).

جدول ۲: آمار توصیفی توده مورد مطالعه با روش قطعه نمونه دایره‌ای شکل

گونه	تعداد در هکتار	تعداد کل	فراوانی (%)	تاج پوشش (%)
بلوط ایرانی	۱۵۲/۱۲	۵۰۲	۹۹/۱۱	۲۲/۱۹
سایر گونه‌ها	۴/۵۵	۱۵	۰/۸۹	۰/۲
کل توده	۱۵۶/۶۷	۵۱۷	۱۰۰	۲۲/۳۹

اگر فراوانی یک گونه بیش از ۹۰ درصد باشد، آن توده جنگلی خالص است (Marvie Mohadjer, 2006)، بنابراین دیده می‌شود که توده مورد نظر یک توده خالص بلوط ایرانی است.

برای مشخص کردن الگوی پراکنش درختان توده مورد بررسی، با استفاده از داده‌های مربوط به تعداد درختان در قطعات نمونه دایره‌ای شکل (۳۳ قطعه نمونه)، نسبت واریانس به میانگین داده‌ها محاسبه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که این نسبت برابر ۱/۸۳ بود که با آزمون آماری مشخص گردید که توده دارای الگوی کپه‌ای بود و بعد برای حالت‌های شبیه‌سازی شده یعنی الگوهای تصادفی و پراکنده تعداد قطعات نمونه مشخص گردید (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج الگوی پراکنش درختان توده مورد بررسی

نسبت واریانس به میانگین	مربع کای	مقادیر بحرانی مربع کای		الگوی پراکنش	تعداد قطعات نمونه
		۰/۰۲۵	۰/۹۷۵		
۱/۸۳	۵۸/۵۶	۵۰/۶۹	۱۹/۰۸	کپه‌ای	۳۳
۱/۰۱	۱۶/۴۶	۴۰/۶۴۶	۱۳/۱۲۰	تصادفی	۲۶
۰/۴۵۲	۸/۰۹۶	۳۱/۵۲۶	۸/۲۳۱	پراکنده	۱۹

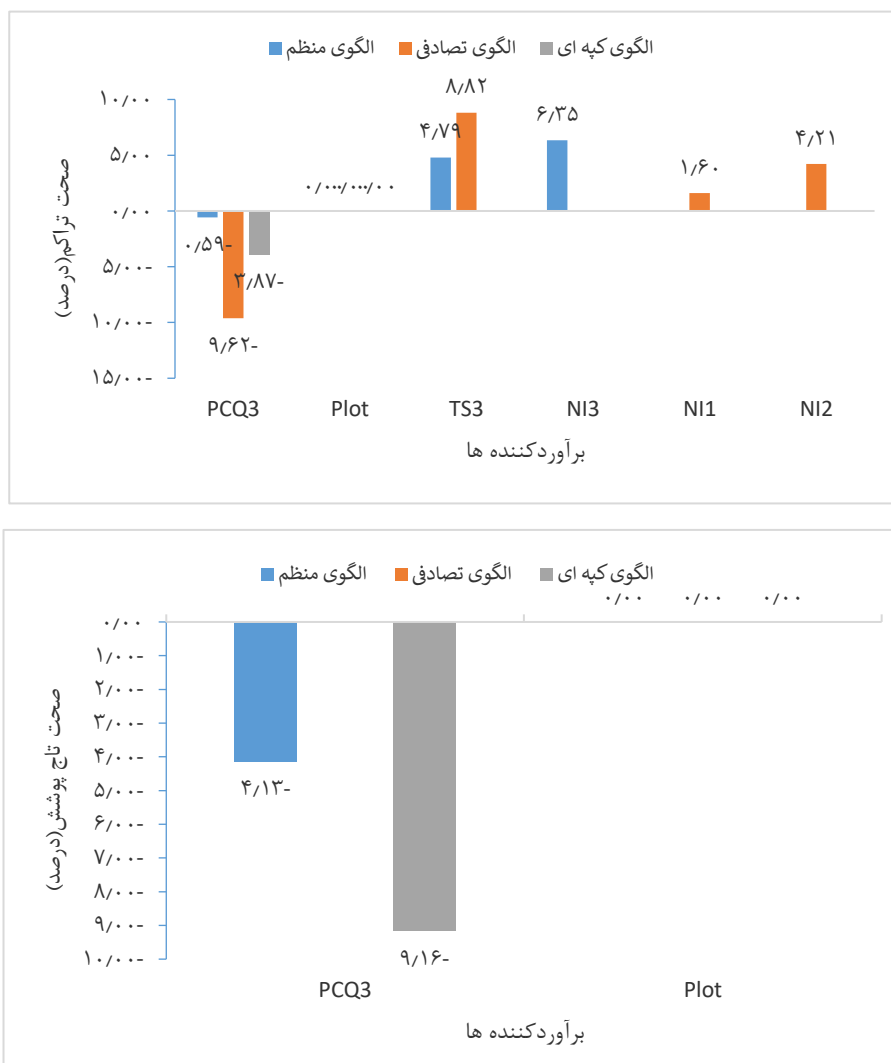
یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر صحت برآوردها در روش‌های فاصله‌ای، الگوی پراکنش مکانی درختان است. بنابراین می‌توان برای جنگل‌های مختلف و نیز گونه‌های مختلف جنگل انتظار نتایج متفاوتی از نظر اریبی این روش‌ها داشت (Askari et al., 2013). نتایج این بررسی نشان داد (جدول ۳) که توده مورد بررسی دارای الگوی کپه‌ای بود و برآوردکننده‌های روش‌های فاصله‌ای در این حالت (الگوی کپه‌ای) تراکم و تاج پوشش درختان توده را (جدول ۴ ستون‌های ۴ و ۸) بطور یکسان برآورد نکردند. این نتایج با نتایج حیدری و همکاران (۲۰۰۷)، کیانی و همکاران (۲۰۱۳)، عسکری و همکاران (۲۰۱۳) و شیخ الاسلامی و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد و تأثیر الگوی پراکنش بر نتایج برآوردکننده‌های فاصله‌ای را نشان می‌دهد. مقایسه نتایج برآوردکننده‌های روش‌های فاصله‌ای با روش قطعه نمونه دایره‌ای شکل (به عنوان مقدار واقعی) براساس معیار صحت در

جدول ۴ آمده است. نتایج بدست آمده در جدول ۴ نشان می‌دهد که تعدادی از برآوردکننده‌های روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای از جمله CM (روش ترکیبی) و JPM (نقطه مشترک) و نیز تعدادی از برآوردکننده‌های روش‌های مربع T (TS1 و TS4)، نزدیکترین همسایه (NN3) و مربعی با نقطه مرکزی (PCQ1 و PCQ2) با توجه به صحت قابل قبول این بررسی (دامنه $\pm 10\%$ درصد)، در تمامی حالات الگوهای پراکنش درختان نتایج قابل قبولی نداشتند، ولی تعدادی از برآوردکننده‌ها نتایج مناسبی از نظر معیار صحت ارائه دادند که در شکل ۲ آمده است. برای برآورد تراکم و تاج پوشش درختان در هکتار با روش قطعه نمونه دایره‌ای و برآوردکننده‌های فاصله‌ای، در سه حالت کپه‌ای (۳۳ نمونه)، تصادفی (۲۶ نمونه) و پراکنده (۱۹ نمونه) محاسبات انجام گرفت. در مرحله بعد با استفاده از معیار صحت، مقادیر بدست آمده با برآوردکننده‌های مختلف روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای با نتایج روش قطعه نمونه دایره‌ای شکل در سه حالت الگوی پراکنش درختان (کپه‌ای، تصادفی و پراکنده) مقایسه گردیدند که نتایج آنها در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴: مقادیر صحت (درصد) برآوردکننده‌های روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای در سه حالت کپه‌ای، تصادفی و پراکنده

الف-صحت تراکم (درصد)				ب-صحت سطح تاج پوشش (درصد)			
	کپه‌ای	تصادفی	پراکنده		کپه‌ای	تصادفی	پراکنده
PCQ3	-۳/۸۷	-۹/۶۲	-۰/۵۹	Plot	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
Plot	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	PCQ3	۶/۹۱	-۱۰/۹۷	۷/۲۱
NI1	۱۳/۹۳	۱/۶	۱۲/۲۶	TS3	۱۹/۰۹	۱۴/۰۶	۱۶/۴۲
TS3	۱۶	۸/۸۲	۴/۷۹	NI1	۱۸/۰۰	۱۲/۸۹	۲۸/۴۷
NI2	۱۷/۵۶	۴/۲۱	۱۸/۸۸	NN2	۱۴/۱۷	۲۴/۶۵	۲۱/۱۲
NI3	۱۰/۴۷	۲۵/۰۵	۶/۳۵	NI2	۲۱/۷۷	۱۵/۷۹	۳۶/۰۴
TS2	۲۴/۶۲	۱۷/۴۹	۱۲/۴۳	NI3	۱۴/۴۳	۳۸/۹۴	۲۱/۷۱
NN2	۱۶/۹۴	۳۰/۲۱	۲۲/۵۲	TS2	۲۷/۹۸	۲۳/۱۴	۲۴/۹۱
NN1	۱۵/۶۸	۴۳/۱	۳۵/۹۲	NN1	۱۲/۹۴	۳۶/۹۹	۳۴/۳۶
PCQ1	۳۰/۸۵	۲۸/۸۲	۳۶/۸۳	SNN	۳۴/۱۶	۳۳/۳۱	۲۲/۸۵
PCQ2	۳۳/۴	۳۱/۲۷	۴۱/۴۹	JPM	۳۳/۸۷	۳۷/۱۶	۳۶/۱۲
CM	۴۲/۹۷	۴۵/۸۵	۴۷/۶۵	CM	۳۹/۵۸	۳۹/۶۲	۴۵/۹۶
JPM	۴۹/۵۶	۵۴/۴۱	۵۰/۷۷	PCQ1	۴۵/۵۱	۴۰/۰۶	۴۷/۵۳
SNN	۶۲/۷۳	۷۱/۵۴	۵۷/۰۱	PCQ2	۴۸/۳۵	۴۲/۷۲	۵۲/۵۶
NN3	۶۸/۳۹	۸۷/۴۸	۷۶/۴۱	NN3	۶۴/۳۹	۷۹/۴۸	۷۴/۳۹
TS1	۱۸/۱۴	۱۷/۱۵	۱۲۴/۵۲	TS4	-۳۲/۷۸	-۳۵/۴۷	۱۰۶/۷۶
TS4	-۳۴/۵۳	-۳۸/۴۳	۸۶/۱	TS1	۲۱/۳۳	۲۲/۷۸	۱۴۹/۴۵

در ادامه به منظور مشخص کردن مناسب‌ترین برآوردکننده برای برآورد تراکم و تاج پوشش درختان براساس معیار صحت قابل قبول این بررسی ($\pm 10\%$ درصد)، برآورد کننده‌هایی که در هر یک از الگوهای پراکنش درختان (کپه‌ای، تصادفی و یکنواخت) در این دامنه قرار گرفت، انتخاب گردیدند (شکل ۲).



شکل ۲: برآوردکننده‌هایی که صحت آنها در محدوده $\pm 10\%$ درصد است، برای برآورد تراکم (ردیف اول) و برای برآورد تاج پوشش (ردیف دوم)

برای مشخص کردن مناسب‌ترین برآوردکننده در محدوده مورد نظر در این بررسی (صحت $\pm 10\%$ درصد)، با توجه به شکل ۲ دیده می‌شود که مناسب‌ترین برآورد کننده‌ها برای برآورد تراکم درختان (شکل ۲ الف) در حالت الگوی پراکنده، برآورد کننده‌های PCQ3 (روش مربعی با نقطه مرکزی)، TS3 (روش مربع T)، NI3 (روش نزدیکترین فرد) بودند. در حالت الگوی تصادفی، برآورد کننده‌های PCQ3 (روش مربعی با نقطه مرکزی)، TS3 (روش مربع T)، NI1,2 (روش نزدیکترین فرد) بودند و در حالت الگوی کپه‌ای، فقط برآورد کننده PCQ3 (روش مربعی با نقطه مرکزی) مناسب بود.

برای برآورد تاج پوشش درختان با توجه به شکل ۲ (ب)، در حالت‌های الگوی پراکنده و کپه‌ای، فقط برآورد کننده PCQ3 (روش مربعی با نقطه مرکزی) برای توده مورد بررسی مناسب بود، ولی در حالت الگوی پراکنش تصادفی، هیچکدام از برآوردکننده‌ها مناسب نبودند.

در نهایت با توجه به تنوع الگوی پراکنش درختان در جنگل‌های زاگرس که عمدتاً کپه‌ای و گاهی تصادفی است و نتایج این بررسی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که برای برآورد تراکم روش‌های نمونه برداری مربعی با نقطه مرکزی (برآورد کننده PCQ3)، مربع T (TS2,3)، نزدیکترین فرد (NI1,2,3) و نزدیکترین همسایه (NN1,2) برای این جنگل‌ها مناسب هستند. این نتایج با نتیجه تحقیق کیانی و همکاران (Kiani et al., 2013) که روش مربع T را برای برآورد تراکم و روش مربعی با نقطه مرکزی را برای برآورد تاج پوشش؛ (Sheikholeslami et al., 2017) که دو روش نزدیکترین فرد و نزدیکترین همسایه را در الگوی کپه‌ای، (Basiri et al., 2018) روش مربعی با نقطه مرکزی (Bryant et al., 2004) روش مربعی با نقطه مرکزی و Silva et al., (2017) روش‌های مربع T و مربعی با نقطه مرکزی را مناسب دانسته‌اند، مطابقت دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۴ و شکل ۲)، دیده می‌شود در بین تمامی برآوردکننده‌های این بررسی (۱۶) برآوردکننده، بهترین نتیجه را برآورد کننده PCQ3 (غیر از حالت تصادفی که مقدار صحت ۱۰/۹۳- درصد بود) نشان داد. احتمالاً دلیل این یک مورد انحراف، نحوه‌ی محاسبه تاج پوشش درختان با این برآورد کننده باشد، زیرا برآورد تاج پوشش درختان با این فرمول، مانند روش‌های قطعه نمونه است، یعنی تاج پوشش درختان در هر نقطه نمونه برداری (با استفاده از میانگین سطح تاج ۴ درخت در هر نقطه نمونه برداری ضرب در تعداد درختان برآورد شده در هکتار در همان نقطه نمونه برداری) محاسبه می‌گردد و بعد برای برآورد تاج پوشش توده مورد بررسی، میانگین مقادیر بدست آمده از نقاط نمونه برداری (مانند تعداد قطعات نمونه) لحاظ می‌گردد (Haidari et al., 2008) همانطور که شکل ۲ نشان می‌دهد این نحوه محاسبه تاج پوشش درختان در حالت تصادفی نتیجه مناسبی نداد که برای رفع این مشکل در برآوردکننده PCQ3 محاسباتی به شرح زیر انجام گرفت. بعد از محاسبه تراکم درختان مانند روش‌های قطعه نمونه با این برآوردکننده، برای برآورد تاج پوشش درختان از روش مربوط به روش‌های فاصله‌ای (که در این بررسی برای بقیه روش‌های فاصله‌ای استفاده شده است و نحوه اجرای آن در قسمت توضیحات جدول ۱ آمده است) استفاده گردید یعنی متوسط تاج تمامی درختان اندازه‌گیری شده با روش مربعی با نقطه مرکزی ($\bar{cc} = \sum c_i / n$) در تراکم محاسبه شده با آن ضرب گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که صحت بدست آمده با این نحوه برآورد تاج پوشش درختان در حالت‌های مختلف الگوی پراکنش کپه‌ای، تصادفی و پراکنده به ترتیب ۶۱/۶، ۷۵/۱- و ۲۱/۷ درصد بدست آمد. بنابراین نه تنها در حالت تصادفی بلکه در حالت‌های پراکنده و کپه‌ای نیز با این نحوه محاسبه نتایج بسیار مناسبی بدست آمد. بطور خلاصه نتایج نشان داد که بکارگیری روش مربوط به روش‌های فاصله‌ای در برآورد تاج پوشش درختان توده جنگلی برای

فرمول PCQ3، این برآوردکننده از بین تمامی برآوردکننده‌های این بررسی برآوردکننده و روش مربعی با نقطه مرکزی مناسب‌ترین روش برای برآورد تراکم و تاج‌پوشش توده مورد بررسی بود، که برای اطمینان بیشتر پیشنهاد می‌گردد این برآوردکننده در نقاط دیگر جنگل‌های زاگرس بررسی گردد. همان‌طور که در مقدمه آمده است، جنگلداران و پژوهشگران بوم‌شناسی نیاز به اطلاعات ارزان و راحت دارند تا شرایط گذشته و فعلی را ارزیابی و تغییرات ساختار اکوسیستم تحت نظارت خود را بررسی نمایند. بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهند که روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای با توجه به ویژگی‌هایی که دارند می‌توانند تا حدودی این نیاز پژوهشگران فوق را برآورده کنند. با این وجود به سبب تنوع اکوسیستم‌های طبیعی به ویژه جنگل‌ها و از سوی دیگر به علت قدمت کمتر روش‌های فاصله‌ای نسبت به روش‌های قطعه نمونه نیاز به بررسی‌های بیشتری جهت ارائه مناسب‌ترین آن‌ها برای هر اکوسیستم است.

منابع

- Askari, Y., Kafassh Saei, E & ,Rezaei, D(2013).Evaluation of different sampling methods to study of shrub density in Zagros forest. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 121-128.
- Badehian, Z., Mansouri, M. & Sanjabi, H. (2017). Economic valuation of some of the most important functions and services of Quercus forests in the central Zagros (Case study: Lorestan province). *J.Env. Sci. Tech.*, 19(5):353-363 .
- Basiri, R., Moradi, M., Kiani, B & ,Maasumi Babaarabi, M(.2018).Evaluation of distance methods for estimating population density in *Populus euphratica* Olivier natural stands (case study: Maroon riparian forests, Iran). *Journal Of Forest Science*, 64 (5), 230–244.
- Bazrafkan, A., Bavaghar, M.P., & Fathi, P. (2014). Capability of Liss III data for forest canopy density mapping in Zagros forests (Case study: Marivan Forests). *Iranian Journal of Forest*, 6(4), 387-401.
- Borges Silva, L., Mário, A., Rui Bento, E & ,Silva, L(.2017).Comparison of T-Square, point centered Quarter, and N-Tree sampling methods in *Pittosporum undulatum* Invaded woodlands .*International Journal of Forestry Research*, 28(13), 1-15.
- Bryant, D.M., Ducey, M.J., Innes, J.C., Lee, T.D., Eckert, R.T & ,Zarin, D.J. (2004). Forest community analysis and the point-centered quarter method. *Plant Ecology*, 175(2), 193-203.
- Byth K. (1982): On robust distance-based intensity estimators. *Biometrics*, 38: 127–135.
- Byth K., Ripley B.D. (1980): On sampling spatial patterns by distance methods. *Biometrics*, 36: 279–284.
- Cottam G., Curtis J.T. (1956): The use of distance measures in phytosociological sampling. *Ecology*, 37: 451–460.

- Dehshiri, M.M., (2019). Study on the plant species diversity along an altitudinal gradient in Nova Mountain, Kermanshah Province of Iran. *Journal of Applied Biology*, 33(1):61-77 .
- Diggle P.J. (1975): Robust density estimation using distance methods. *Biometrika*, 62: 39–48 .
- Engeman R.M., Sugihara R.T., Pank L.F., Dusenberry W.E. (1994): A Comparison of plotless density estimators using Monte Carlo simulation. *Ecology*, 75: 1769–1779. *J. FOR. SCI.*, 64, 2018 (5): 230–244 243
- F.R.W.M.O. (2021). Forests, Range and Watershed Management Organization. <https://frw.ir/>
- Haidari, R.H. (2020). Presentation a new Joint-point Sampling method estimator for tree density. *Journal of Forest Research and Development*. 6(3):505-517 .
- Haidari R.H., Zobeiri M., Namiranian M., Sobhani H. (2007). Application of T-square sampling method in Zagross forests (Case Study: Kerman-shah province) - Iran. *J. For. Poplar Res.* 15: 32-42 .
- Haidari, R.H., Zobeiri, M., Namiranian, M & ,Sobhani, H. (2008). Application of T-square sampling method in Zagross forests (Case Study: Kermanshah province). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 15(1), 32-42.
- Haidari, R.H., Sohrabi Zadeh A. and Haidari, M. (2019). Effect of Physiographic Factors on Plant Biodiversity in the Central Zagros Forests (Case Study: Educational Forest of Razi University of Kermanshah). *Ecology of Iranian Forests*. 7(1):66-75 .
- Karamshahi, A., Zobeiri, M., Namiranian, M., & Feghhi, J .(2012) . Investigation on application of k-nn (k-nearest neighbor) sampling method in Zagros forests (Case study: Karzan forest, Ilam). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 19(4), 453-465.
- Khaleti,K. (2019). Comparison of quantitative characteristics of Sorkhe-dizeh forest in beginning and end of 13 Years period with plot-less sampling methods. M.Sc. Thesis in Forest Science and Engineering. Faculty of Agriculture, Razi University. 71p.
- Kiani, B., Fallah, A., Tabari, M., Hosseini, S.M & ,Iran-Nejad Parizi, M.H. (2013). Comparing Distance-based and Quadrature-based Methods to Identify Spatial Pattern of Saxaul Haloxylon ammodendron C.A.Mey (Siah-Kooh Region, Yazd Province). *Journal of Natural Environment, Iranian Journal of Natural Resources*, 65(4), 475-486.
- Kint, V., Wulf Robert, D & ,Noel, L. (2004). Evaluation of sampling methods for the estimation of structural indices in forest stands. *Ecological Modeling*, 180(4), 461-476.
- Kissa, D.O., & Sheil, D(.2012 .)Visual detection based distance sampling offers efficient density estimation for distinctive low abundance tropical forest tree species in complex terrain. *Forest Ecology and Management*, 263, 114-121.

- Kleinn, Ch & , Vilcko, F(.2006 .)A new empirical approach for estimation in k-tree sampling. *Forest Ecology and Management*, 237(1-3), 522-533.
- Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Harper Collins: New York. 653 PP.
- Marvie Mohadjer, M.R., (2006). *Silviculture*, University of Tehran Press, 388pp .
- Moghadam, M.R(.2001 .)Quantative plant ecology. Tehran University press. 285pp.
- Morisita M. (1957): A new method for the estimation of density by spacing method applicable to non-randomly distributed populations. *Physiology and Ecology*, 7: 134–144. (in Japanese with English summary)
- Pollard J.H. (1971): On distance estimators of density in randomly distributed forests. *Biometrics*, 27: 991–1
- Salehi, A., & Taheri Sarteshnizi, M.J. (2014). Comparison of accuracy assessment of canopy cover density using a device similar to Cajanus tube and line intersect sampling in a Persian oak stand. *Iranian Journal of Forest*, 6(3), 309-320.
- Savage, Sh.L., Lawrence, R.L., Squires, J.R., Holbrook, J.D., Olson, L.E., Braaten, J.D., & Cohen, W.B. (2018). Shifts in forest structure in Northwest Montana from 1972 to 2015 using the Landsat Archive from Multispectral Scanner to Operational Land Imager. *Forests*, 9(157), 1-20 .
- Seraj, H., B. Kiani & M. Mirabdollahi. (2019). Investigating the accuracy and precision of sector sampling in juniper forests of Amin Abad, FiroozkoohM, *Journal of Forest Research and Development*, 5(1): 1-13.
- Sheikholeslami, N., Erfanifard, S.Y., Fallah Shamsi, R., Masoudi, M & ,Khosravi, E. (2017). Effect of spatial pattern of trees on efficiency of distance and plot sampling methods in Zagros woodlands. *Iranian Journal of Forest*, 9(1), 101-117.
- Southwood, T.R.E. & Henderson, P.A. (2000). *Ecological Methods*. Blackwell Science. [http://www .Blackwell Science. Con/Southwood](http://www.Blackwell Science. Con/Southwood). 575 pp.Zobeiri, M. (2007). *Forest Biometry*, University of Tehran Press, 405pp.

Study of Distance Sampling Methods for Estimating Quantitative Characteristics of Forest

R.H. Haidari^{1*}, K. Khalati², N. Salimikhah²

Received:2021.1.16

Accepted:2021.4.24

Abstract

Awareness of the density and canopy cover of Zagros forests is important for their preservation, restoration and expansion. The purpose of this study is to introduce the most appropriate estimator of distance sampling method for estimating quantitative characteristics of these forests. For this purpose, their two large and small crown diameters in 33 circular sample plots in Kermanshah province inventoried. Within each circular plots, seven distance sampling methods such as nearest individual, nearest neighbor, second nearest neighbor, compound, T-square, joint-point method and point-centered quarter were sampled. After calculating the density and canopy cover of trees in circular method (true value) and distance sampling method estimators, the results of this estimators were compared with circular plots by using accuracy. The results showed that among 16 estimators of above distance sampling methods, the most suitable estimator for density and canopy cover of this forest was PCQ3 estimator.

Keywords: *Accuracy, canopy cover, density, Kermanshah, true density*

1- Assistant professor, Department of Natural Resources, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

*(Corresponding author: rhaidari@razi.ac.ir)

2- M.Sc., Department of Natural Resources, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) در پاسخ به تنش خشکی

محمدعلی اعظمی^{۱*}، اسحق شمسی نو^۲، محمدباقر حسن پور اقدم^۳

چکیده

بررسی اثرات تنش خشکی در چهار سطح در سه رقم انگور به مدت دو ماه انجام گردید. بیشترین میزان نشت الکترولیت و پراکسید هیدروژن در رقم خلیلی و سطح ۴۰ درصد تنش خشکی مشاهده گردید. رقم قیزیل/اوزوم در تنش خشکی ۶۰ درصد بالاترین میزان کاتالاز و در تنش خشکی ۸۰ درصد کمترین محتوای مالون دی‌آلدهید و بیشترین مقدار پروتئین محلول کل را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تمام سطوح تنش و گایاکول پراکسیداز در تنش خشکی ۶۰ درصد در رقم پرلت در بیشترین مقدار بود. پارامترهای فلورسانس کلروفیل تا سطح ۶۰ درصد تنش خشکی، در رقم قیزیل/اوزوم افزایش معنی‌داری را نشان دادند. سطوح خشکی ۴۰ درصد اثر تخریبی بالایی بر سه رقم انگور مورد مطالعه داشت و در بین سه رقم خلیلی، پرلت و قیزیل/اوزوم، رقم قیزیل/اوزوم با داشتن مکانیزم‌های تحمل کارآمدتر از جمله فعالیت آنزیمی مناسب و کاهش اثرات زیان‌بار خشکی، به عنوان رقم متحمل‌تر نسبت به دو رقم پرلت و خلیلی معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، انگور، تنش خشکی، پرولین، فلورسانس کلروفیل

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

* (نویسنده مسئول: Aazami58@gmail.com)

۲- کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

مقدمه

تنش‌های محیطی مانند سرما، شوری و خشکی از مهمترین عوامل موثر بر رشد و تولید محصول در گیاهان هستند. با توجه به رشد روز افزون جمعیت کره زمین و نیاز به غذای بیشتر، تولید گیاهان متحمل در برابر تنش‌های محیطی از اهمیت زیادی برخوردار است (Karimi et al., 1994). کمبود آب یکی از عوامل تهدید کننده بهره‌وری محصولات باغی بوده و کیفیت محصولات را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Escalona et al., 2013). اثرات اولیه خشکی در درختان معمولاً کاهش هدایت روزنه‌ای، پتانسیل آبی، پتانسیل اسمزی، رشد برگ و فتوسنتز است و در نهایت رشد گیاه مختل می‌گردد (Lovisolo et al., 2010). در طی تنش خشکسالی همزمان با تغییرات مورفولوژیکی، تغییرات بیوشیمیایی در قالب تجمع اسیدآبسیک (ABA) در آوند چوبی دمبرگ و برگ اتفاق می‌افتد (Dodd, 2005). کمبود آب موجب افزایش سطح ABA گشته و سلول‌های روزنه حجم خود را از طریق خروج آنیون‌ها و یون‌های پتاسیم کاهش می‌دهند، در نتیجه روزنه‌ها بسته می‌شوند (Kim et al., 2010). تنش خشکی باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود و محتوای کلروفیل را کاهش می‌دهد (Khan, 2011). برای جلوگیری از آسیب سلولی به علت تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در برابر تنش، گیاهان تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را جهت حفاظت ثانویه در برابر تنش اکسیداتیو تولید می‌کنند (Mittova et al., 2003; Osmolovskaya et al., 2018). متابولیسم آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از گیاهان از انواع مختلف تنش‌های محیطی مانند خشکسالی، دماهای شدید، آلودگی‌ها، اشعه ماوراءبنفش و سطوح نوری بالا نقش مهمی دارند (Singam et al., 2011). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌توانند اثرات زیان آور ROS را در محیط *in vivo* و *in vitro* بهبود بخشند (Mittova et al., 2003).

آسکوربات یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی مهم در سلول‌های گیاهی است که در تمامی اندامک‌های درون سلول و فضای آپوپلاستی حضور دارد. آسکوربات نقش مهمی در فتوسنتز دارد و به همین دلیل غلظت آن در کلروپلاست بالاست. نقش این مولکول حذف پراکسید هیدروژن تولید شده در طی واکنش احیای نوری اکسیژن در فتوسیستم I است (Thirupathi et al., 2011). گایاکول پراکسیداز (GPX) با مصرف H_2O_2 سلول‌ها را از آسیب ناشی از مقادیر بالای پراکسید هیدروژن تولید شده طی متابولیسم طبیعی گیاهان و یا در اثر شرایط تنش، نجات می‌دهد. در بین آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی مختلف گایاکول پراکسیداز از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا این آنزیم در درون و بیرون از سلول حضور داشته و در تجزیه H_2O_2 مشارکت می‌کند (Velikova et al., 2000). کاتالاز آنزیمی است که با سرعت بسیار پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که کاتالاز در تنظیم هومئوستازی سلولی نقش دارد (Thirupathi et al., 2011). پرولین در تنش‌ها دارای نقش چند منظوره مانند تنظیم اسمزی، تثبیت کننده ساختارهای سلولی، جاذب ROS ها، فعال کننده مسیرهای سم‌زدایی و سیگنال‌های مربوط به تنش است. مطالعات نشان داد پرولین در تنش‌های گیاهی، در تثبیت کردن پروتئین‌ها و ساختار غشاها، فراهم آوردن منبع کربن، نیتروژن و انرژی در طی از دست دهی آب سلولی نقش دارد (Szabados & Savoure, 2010).

انگور گیاه چندساله با نام علمی (*Viis vinifera L.*) متعلق به خانواده Vitaceae است که در سراسر جهان به طور گسترده مورد کشت قرار می‌گیرد و از نظر اقتصادی یکی از مهمترین محصولات میوه ای است (Alston & Sambucci, 2019) رشد و نمو انگور به واسطه تنش‌های غیر زنده مانند خشکی، شوری، درجه حرارت شدید، سمیت شیمیایی و تنش اکسیداتیو تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Ma et al., 2012). ارقام انگور متحمل به خشکی، میزان پرولین بیشتری در مقایسه با رقم‌های حساس داشتند ولی میزان MDA در رقم‌های متحمل در مقایسه با رقم‌های حساس پایین‌تر بود (Gambetta et al., 2020). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رقم متحمل به خشکی انگور شاهانی گزارش شده است (Talaie et al., 2009). با اعمال و آزمون تنش خشکی می‌توان ارقامی از انگور را انتخاب کرد که به احتمال زیاد با افزایش فعالیت آنزیمی و بیوشیمیایی نسبت به شرایط خشکی تحمل بیشتری دارند. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور (*Viis vinifera L.*) در پاسخ به تنش خشکی و انتخاب رقم متحمل به خشکی بوده و امکان سنجی گسترش آنها در کشور است.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این آزمایش به منظور بررسی تاثیر تنش خشکی بر برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور خلیلی، قیزیل‌اوزوم و پرلت (قلمه‌ها از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه گردید)، قلمه‌ها بعد از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های پلاستیکی ۵ لیتری حاوی یک سوم خاک معمولی، یک سوم پرلایت و یک سوم ماسه بادی انتقال داده شدند. محلول غذایی مورد استفاده، محلول هوگلند (Hogland & Arnon, 1950) بود و pH محلول غذایی در ۶/۵ تنظیم شد و هر پنج روز یک مرتبه آبشویی کامل محیط ریشه گیاهان با آب معمولی انجام گرفت تا تغییرات EC و pH در اثر آبشویی به حداقل برسد. جهت جلوگیری از خروج آب و مواد غذایی از گلدان‌ها، زیر هر گلدان یک زیرگلدانی قرار داده شد و بعد از هر آبیاری، مقدار آب اضافی خارج شده به گلدان‌ها برگردانده شد. اعمال تنش همه گلدان‌ها پس از ریشه‌دار شدن قلمه‌ها، استقرار کامل و رشد گیاهان در چهار سطح تیمار خشکی در سطوح صفر (شاهد) ۸۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۰ درصد FC به مدت ۲ ماه در چهار تکرار انجام گرفت. نمونه‌برداری از گیاهان (برگ‌های توسعه یافته) پس از اتمام تیمارهای خشکی به منظور استخراج پرولین و اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل، مالون‌دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) انجام شد و نمونه‌ها از زمان برداشت در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر (۸۰- درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. نمونه‌های برداشت شده جهت بررسی صفات به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

استخراج پرولین

جهت استخراج پرولین (نمونه‌های برگ) از روش Bates (1973) استفاده شد. غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد و با استفاده از فرمولی که در آن x مقدار جذب قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و y غلظت پرولین در نمونه است، محاسبه گردید. $Y = 0.0012X + 0.269$

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید در بافت تر گیاهی (MDA)

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک‌اسید با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید انجام شد. میزان جذب روشنوار در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدهید با استفاده از ضریب تصحیح $(\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$ ۰/۱۵۵ محاسبه و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) بیان شد (Health & Packer, 1968).

اندازه‌گیری غلظت پراکسید‌هیدروژن (H_2O_2)

برای اندازه‌گیری میزان پراکسید‌هیدروژن، ۰/۲ گرم نمونه برگ در ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد اسیدکلرواستیک (وزنی-حجمی) همگن شد و در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ گردید. سپس کمپلکس واکنش با ترکیب ۰/۵ میلی‌لیتر روشنوار، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار به دست آمد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۹۰ نانو متر اندازه‌گیری گردید. میزان پراکسید‌هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمد (Velikova *et al.*, 2000).

استخراج آنزیمی

جهت اندازه‌گیری پروتئین محلول کل، کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی (برگ) در نیتروژن مایع هموزن گردید و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH= ۷/۵) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌های هموزن شده در ۱۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ گردیدند. روشنوار بدست آمده در ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌دلیل نیمه عمر پایین آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز و جهت افزایش پایداری آن به محلول استخراج آنزیم، پلی‌وینیل‌پیرولیدین (۵ درصد) و آسکوربات اضافه شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول کل

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول کل از سنجش Bradford (1976) استفاده شد. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معین پروتئین استاندارد استفاده می‌گردد. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش

برادفورد به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی هر نمونه، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی کاهش مقدار پراکسیدهایدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) و پراکسیدهایدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر آغاز گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (Dezar et al., 2005).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷)، آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. کاهش جذب نور به علت پراکسیداسیون اسید آسکوربیک در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب در یک دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین استفاده شد (Dezar et al., 2005).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)، به صورت زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH = ۶/۸) و پراکسیدهایدروژن ۴۰ میلی‌مولار و گایاکول ۲۰ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر آغاز گردید. افزایش جذب به وسیله‌ی تشکیل تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گردید (Dezar et al., 2005).

اندازه‌گیری نشت الکترولیت

نشت یونی براساس روش نییر (Nayyar, 2003) اندازه‌گیری شد. هدایت الکتریکی نمونه‌ها با رسیدن به دمای محیط به عنوان EC اولیه توسط EC متر مدل CC-501 اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری EC ثانویه نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از رسیدن به دمای محیط مجدداً EC نمونه‌ها توسط EC متر به عنوان EC₂ اندازه‌گیری شد و در نهایت درصد نشت یونی از حاصل تقسیم EC اولیه بر EC ثانویه محاسبه گردید.

$$\text{فرمول نشت یونی} = 100 - (E_1/E_2) \times 100$$

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل

پس از اعمال تنش خشکی، اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر مدل (PAM 2500-WALZ, Germany) از آخرین برگ‌های توسعه یافته در حالت روشنائی اندازه‌گیری شد. شاخص‌های فلورسانس روشنائی بدون در نظر گرفتن تاریکی بر روی برگ، مقادیر فلورسانس حداقل (F_o)، فلورسانس حداکثر (F_m)، فلورسانس متغییر (F_v)، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (F_v/F_m)، فعالیت کمپلکس تجزیه کننده آب به عنوان دهنده الکترون فتوسیستم II (F_v/F_o)، پراکندگی گرما در گیرندهای فتوسیستم II (F_o/F_m) مورد سنجش قرار گرفتند.

تجزیه‌های آماری

آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SAS (v. 9.2) انجام گرفت. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۱۶) ترسیم شدند.

نتایج و بحث

جدول ۱: تجزیه واریانس تاثیر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سه رقم انگور

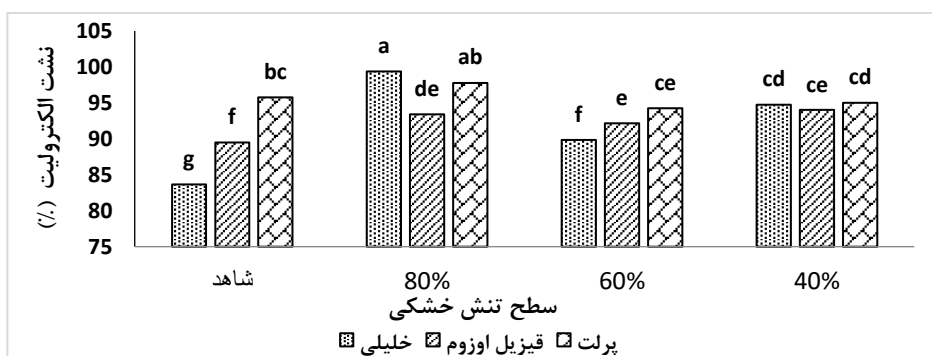
منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	پراکسید هیدروژن	پروتئین	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	نشت الکترولیت	مالون دی آلدئید
تیمار	۲	۱/۹۶**	۰/۱۸۴**	۰/۰۶۴**	۷۵/۳۴**	۴۳/۹۹**	۲۰/۵۷*	۵۳/۱۴**	۱۸۶۴/۵*
رقم	۳	۰/۱۵۱**	۰/۱۱**	۰/۰۲۴**	۳۶/۳۹**	۱۱/۱۲*	۲/۴۰۶ ^{NS}	۸۷/۷۶**	۹۸۰/۳۵*
تیمار*رقم	۶	۱/۳۱**	۰/۱۲**	۰/۰۱۱**	۲۳/۴۶**	۷/۵۲*	۱۸/۹۳*	۳۳/۸۷**	۶۶۸/۶*
خطا		۰/۰۱۰۷	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۵۸	۲/۳۰۹	۲/۱۴	۳/۴۵	۱/۸۱	۱۴۳/۲
ضریب تغییرات		۱۳/۶۰۷	۶/۶۰۱	۳/۵۸	۶/۴۵	۸/۵۴	۲۵/۳۳	۱/۴۴	۱۹/۰۱

NS، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

نشت الکترولیت

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثرات متقابل خشکی و رقم انگور در مورد نشت الکترولیت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. به طوری که بیشترین میزان آن مربوط به رقم خلیلی و سطح ۸۰ درصد تنش خشکی و کمترین آن مربوط به رقم خلیلی در تیمار شاهد بود (شکل ۱).

در تنش خشکی، برخی ROSها از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل افزایش یافته که به غشای سلولی آسیب می‌رساند و الکترولیت‌ها را به بیرون از سلول تراوش می‌کنند و این باعث می‌شود که لایه درون سلول بار منفی پیدا کند (Summart et al., 2010). در رقم قیزیل‌اوزوم کاهش در میزان نشت مواد محلول از غشاء به عنوان شاخصی برای افزایش تحمل به شرایط تنش خشکی است. کاهش خسارت به غشای سلولی در رقم قیزیل‌اوزوم را می‌توان به عنوان راهکاری برای توصیف تحمل به خشکی دانست که ممکن است با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای کاهش خسارت تنش اکسیداتیو مربوط باشد (Gou et al., 2010). افزایش نشت الکترولیت حاکی از کمتر شدن پایداری ساختار غشای سلول‌ها و در نتیجه عدم حفاظت از بافت‌های گیاهی است که با افزایش تولید ROS تحت تنش خشکی مطابقت دارد (Gou et al., 2010). کاهش مقدار نشت الکترولیت و پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود آب نشان از آسیب کمتر به گیاه است (Abid et al., 2020). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام گرفته روی ارقام مختلف انگور (Su et al., 2015) مطابقت داشت که با اعمال تنش‌های محیطی نشت الکترولیت در ارقام مختلف انگور افزایش یافت.



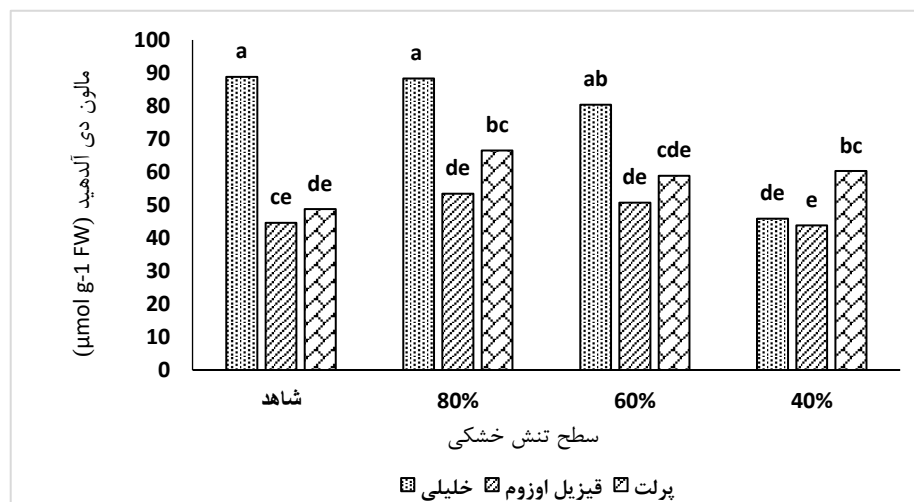
شکل ۱: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان نشت الکترولیت

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد است.

مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، سطوح مختلف خشکی و رقم و اثر متقابل آنها در سطح احتمال پنج درصد بر محتوای MDA تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). به طوری که افزایش تنش خشکی تا ۸۰ درصد باعث افزایش MDA شد. در بررسی اثر متقابل رقم و تنش خشکی رقم قیزیل‌اوزوم در تنش ۸۰ درصد کمترین محتوای MDA را نشان داد (شکل ۲).

MDA یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع‌نشده در فسفولیپیدها است که باعث آسیب به غشای سلولی می‌شود در گیاهانی که تحت تنش‌های مختلف غیرمحیطی قرار دارند افزایش پراکسیداسیون لیپیدی منجر به افزایش تولید ROS می‌گردد که با افزایش حساسیت گیاه به شرایط تنش همراه است (Tavallali *et al.*, 2010; Sarmadi *et al.*, 2019) در مقایسه با سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز که اولین روبشگر رادیکال‌های آزاد است، آنزیم آسکوربات پراکسیداز با توانایی بیشتری می‌تواند از طریق اکسیداسیون اسید آسکوربیک به دهیدروآسکوربات و MDA، سمیت پراکسید هیدروژن را کاهش دهد. که از این طریق نیز می‌توان افزایش میزان MDA را با افزایش تنش خشکی توجیه نمود تنش خشکی تغییرات اجزای لیپیدی و نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های گیاهی را تحریک می‌کند. افزایش در محتوای MDA در گیاهان تیمار شده با خشکی نشان می‌دهد که عوامل تنش‌زا باعث کاهش پایداری سلولی توسط تولید ROS می‌گردد (Sarmadi *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر تنش خشکی سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و در نتیجه سبب افزایش مقدار MDA در بافت سه رقم انگور شد. از آنجایی که سطح MDA بافت گیاهی شاخصی برای نشان دادن آسیب ناشی از تنش است، در پژوهش حاضر نیز با توجه به این که رقم قیزیل‌اوزوم کمترین افزایش محتوای MDA برگ را دارا بود، می‌توان گفت نسبت به دو رقم دیگر آسیب غشایی کمتری داشته و در مقابل تنش خشکی تحمل بیشتری از خود نشان داد. نتایج مشابهی در تاثیر تنش‌های محیطی بر محتوای MDA برگ در تحقیقات انجام شده روی ارقام مختلف انگور به دست آمده است (Ma *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2009).



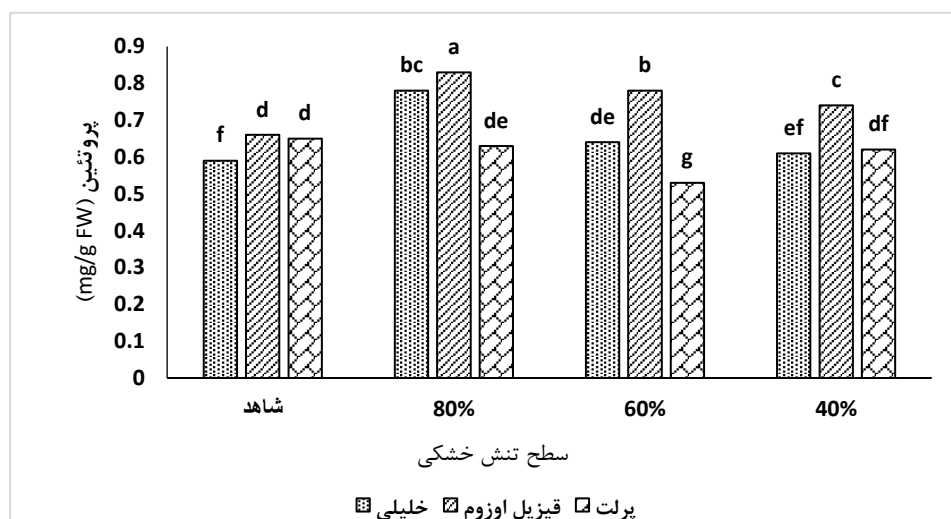
شکل ۲: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان مالون‌دی‌آلدئید.

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

پروتئین محلول کل

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، سطوح مختلف خشکی و رقم و اثر متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پروتئین تأثیر معنی داری داشت (جدول ۱). میزان پروتئین محلول کل با افزایش تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش یافت. رقم قیزیل اوزوم در هر چهار سطح تنش خشکی بیشترین محتوای پروتئینی را داشت. کمترین مقدار پروتئین مربوط به رقم پرلت در تنش ۶۰ درصد بود (شکل ۳).

مطالعات صورت گرفته روی متابولیسم گیاهان مختلف نشان داده است که بیوسنتز پروتئین ها بسته به رقم گیاهی و سطح تنش اعمال شده، اثر متفاوتی روی ساختار و متابولیسم سلولی می گذارند در برخی موارد این اختلالات باعث آسیب به پروتئین می شود و برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی سلول انباشته شده و در چنین شرایطی تغییر در بیوسنتز پروتئین مشاهده می شود (Yamaguchi *et al.*, 2010). در شرایط تنش پروتئین های شوک حرارتی در گیاهان از تجمع پروتئین و حل مجدد پروتئین های دناتوره شده جلوگیری کرده و با حفظ هموستازی سلولی موجب افزایش تحمل شرایط تنشی در گیاه می شوند (Huang *et al.*, 2019). در صورت سمیت، فعالیت برخی از پروتئین های عملکردی مثل آنزیم ها که عملکرد خود را از دست داده اند، مختل می شود. در مطالعه حاضر، میزان پروتئین محلول کل در رقم قیزیل اوزوم با افزایش سطوح تنش خشکی افزایش یافت. نتایج این پژوهش با یافته های سایر محققین روی زیتون (Amini *et al.*, 2014) و انگور (Mehri *et al.*, 2015) تحت تنش خشکی مشابه بود.



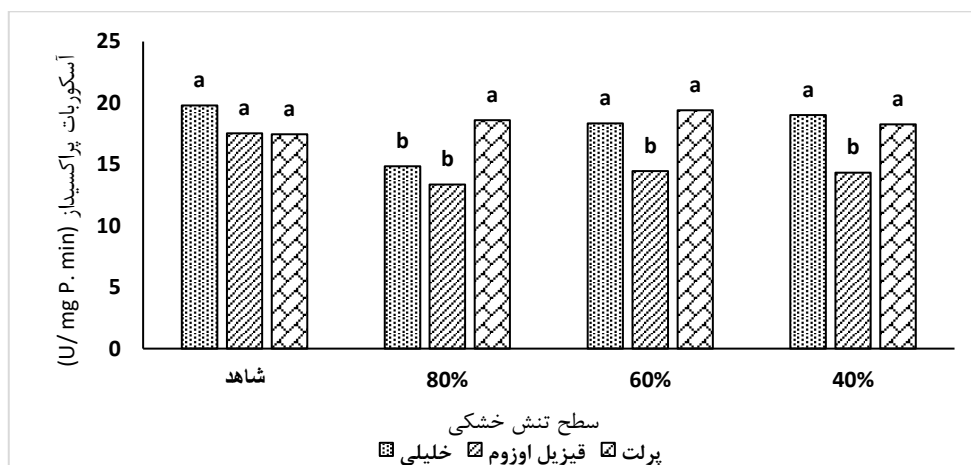
شکل ۳: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان پروتئین محلول کل.

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل تیمار خشکی و رقم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز انگور در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش سطح تنش خشکی در رقم پرت تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد. کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم قیزیل‌اوزوم تحت تنش خشکی ۸۰ درصد مشاهده شد در حالی که بیشترین مقدار آنزیم در رقم پرت در تمام تیمارها مشاهده گردید (شکل ۴).

در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آسکوربات پراکسیداز به عنوان جزئی از چرخه گلووتاتیون- آسکوربات است که باعث کاهش مولکول‌های ROS (رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن) و حفاظت از سلول‌ها در مقابل پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد (De Oliveira et al., 2018). در مطالعه حاضر عدم کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی در رقم پرت مشاهده شد که بیانگر توانایی این رقم در تنظیم فعالیت چرخه گلووتاتیون- آسکوربات بود. از طرفی نتایج حاکی از کاهش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط بدون تنش شوری بود. افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات- پراکسیداز در غلظت زیاد، می‌تواند ناشی از تولید بیش از حد رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باشد که منجر به مصرف بیشتر آسکوربات پراکسیداز، گلووتاتیون و اسید آسکوربیک می‌شود و سیستم دفاعی گیاه را کاهش می‌دهد (Mehri et al., 2015). آسکوربات پراکسیداز به عنوان مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در گیاه، احیاکننده بسیاری از رادیکال‌های آزاد به خصوص پراکسید هیدروژن است (Kafi et al., 2011). در بسیاری از گیاهان دیگر نیز بر اهمیت و نقش این آنزیم تاکید شده است. از آن جمله می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر تنش سرما در نارنگی (Tadjvar et al., 2011) و تحت تنش خشکی در انگور (Mehri et al., 2015) اشاره کرد.

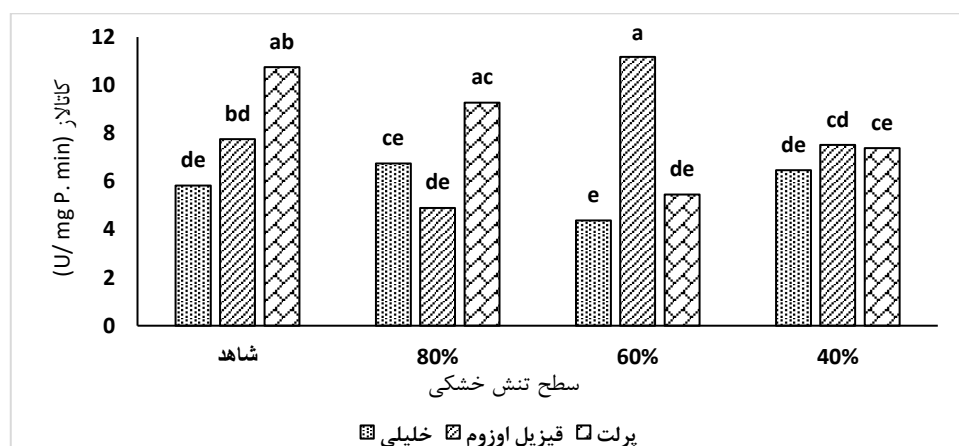


شکل ۴: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل تیمار خشکی و رقم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاه انگور در سطح یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم قیزیل‌اوزوم با افزایش سطح تنش خشکی نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت آنزیم در رقم خلیلی تحت تنش خشکی ۶۰ درصد یافت شد در حالی که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۶۰ درصد خشکی در رقم قیزیل‌اوزوم مشاهده شد (شکل ۵).

تنش خشکی باعث برهم زدن تعادل سلولی شده و تنش‌های ثانویه مانند تنش اسمزی و اکسیداتیو ایجاد می‌کند که به‌نوبه خود باعث برهم زدن تعادل بین تولید و حذف ROS می‌گردد (Yang *et al.*, 2010). سطوح بالای تنش خشکی باعث سوراخ شدن اپیدرم و اختلال در فعالیت‌های متابولیکی سلول می‌گردد. وقتی سطح تنش افزایش پیدا می‌کند، فعالیت آنزیم‌ها برای کاهش اثرات ROSها افزایش پیدا می‌کند. کاتالاز آنزیم مهمی است که در سیستم دفاعی برای تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن به کار می‌رود. به این صورت از تولید ROSها جلوگیری و تحمل گیاه را به شرایط تنش افزایش می‌دهد (De Oliveira *et al.*, 2018). افزایش فعالیت CAT به وسیله تنش‌های محیطی و غیرمحیطی پدید می‌آید که در بسیاری از گونه‌های گیاهی رخ می‌دهد (Mutlu *et al.*, 2009) و در حذف H_2O_2 از محیط آپوپلاست بهترین گزینه است (Alzahrani *et al.*, 2019). در رقم قیزیل‌اوزوم فعالیت آنزیم CAT نسبت به سایر ارقام، بیشتر بود که حاکی از ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی رقم قیزیل‌اوزوم است. به دلیل میزان بالای H_2O_2 تولیدی در شرایط تنش خشکی در رقم خلیلی توان مهار آنزیم CAT به نظر کافی نمی‌رسد. تعدادی از محققین پیشنهاد کردند که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش بهترین توانی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (Zhang *et al.*, 2011; Hasanuzzaman *et al.*, 2019).



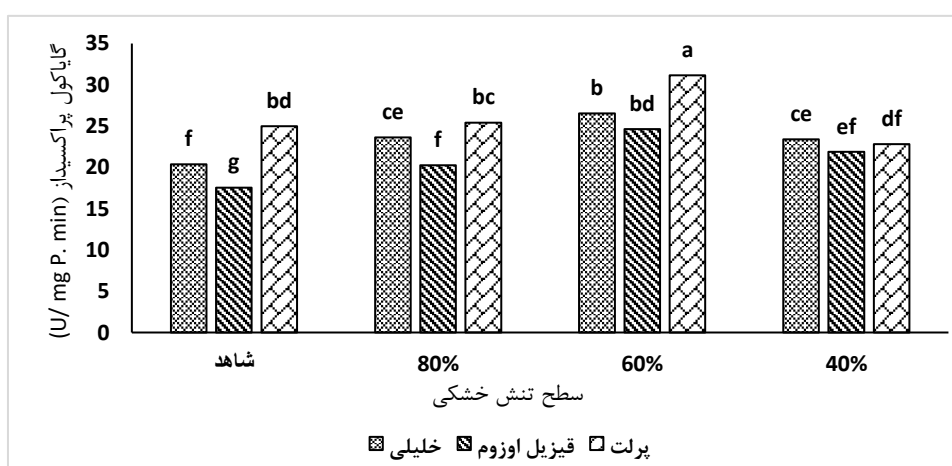
شکل ۵. اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم گایاکول پراکسیداز

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش سطح تنش خشکی نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت. اثرات متقابل تنش خشکی و رقم در میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود به طوری که کمترین میزان فعالیت آنزیم در رقم قیزیل اوزوم در تیمار شاهد و بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار ۶۰ درصد تنش خشکی در رقم پرلت مشاهده شد (شکل ۶).

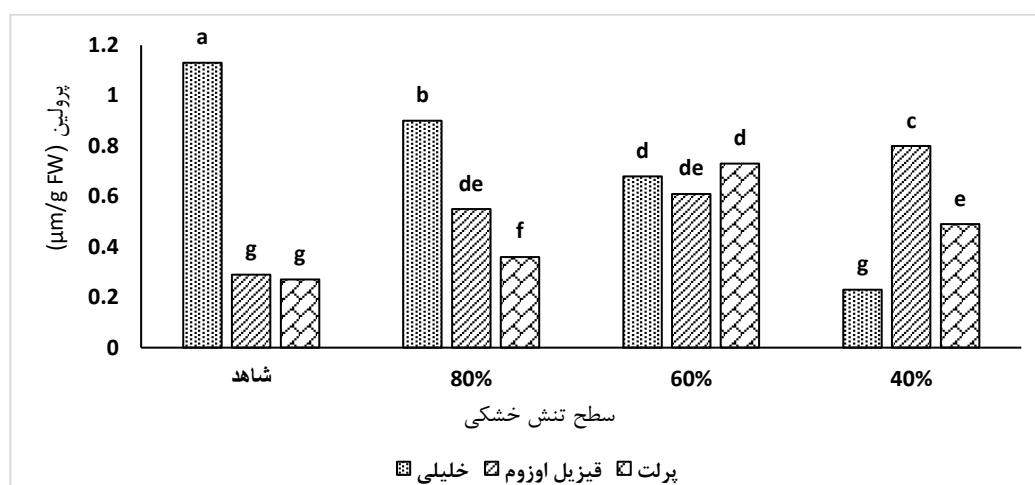
در شرایط تنش‌های محیطی مثل خشکی، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای بالای ترکیبات غیر آنزیمی برای افزایش تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است (Hasanuzzaman *et al.*, 2017). بررسی فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز نشان داد که تنش خشکی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را افزایش داد. در رقم قیزیل اوزوم، فعالیت GPX نسبت به شاهد در تمام سطوح تنش خشکی افزایش یافت هر چند هیچ اختلاف معنی‌داری میان تیمارها ۴۰ درصد و ۸۰ درصد یافت نشد و تنها تغییرات قابل توجه در سطح ۶۰ درصد خشکی یافت شد. نقش رقم انگور روی فعالیت GPX تا به حال بسیار کم مورد بررسی قرار گرفته است اما مطابق نتایج محققان پیشین (Wang *et al.*, 2014) کاربرد رقم‌های حساس در سطوحی بالا از تنش‌های محیطی از جمله خشکی با تولید بیش از حد ROSها باعث آسیب به عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌های گیاهی می‌شود (Hosseini *et al.*, 2020). افزایش فعالیت GPX می‌تواند بسته به رقم متفاوت باشد که در ارقام متحمل به تنش‌های محیطی میزان این آنزیم آنتی‌اکسیدان (GPX) نسبت به ارقام حساس بالا است. این چنین افزایش در فعالیت آنزیم GPX در ارقام متحمل نشان از غلبه این آنزیم بر تولید مازاد پر اکسید هیدروژن است. مهار پراکسید هیدروژن توسط این آنزیم در افزایش شرایط تنش به نظر می‌رسد که کافی نباشد (Alzahrani *et al.*, 2019).



شکل ۶: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

پرولین

سطوح مختلف خشکی و رقم و همچنین اثر متقابل آن دو در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پرولین تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). به طوری که افزایش تنش خشکی تا سطح ۸۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش محتوای پرولین شد. همچنین در میان ارقام خلیلی، پرلت و قیزیل‌اوزوم، رقم قیزیل‌اوزوم دارای یک روند افزایشی یکنواخت بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد داشت. بیشترین محتوای پرولین در شاهد و سپس تنش خشکی ۸۰ درصد در رقم خلیلی به دست آمد (شکل ۷).



شکل ۷: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان پرولین

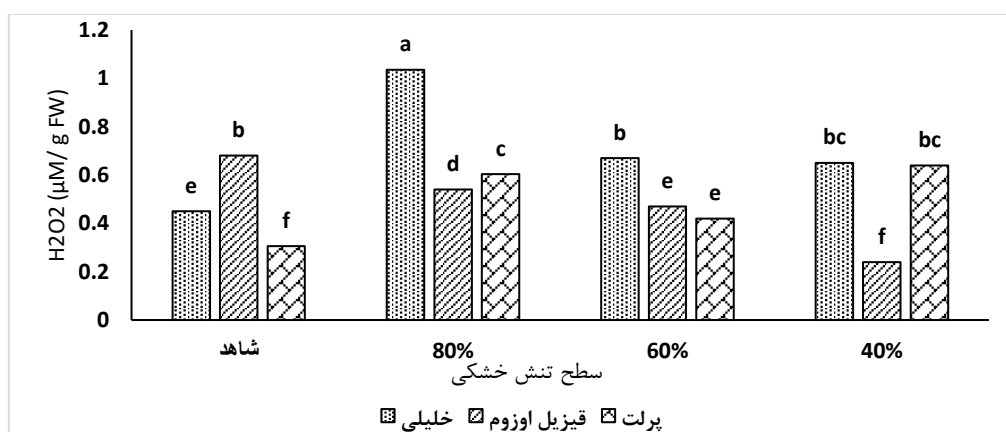
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

گیاهان پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را به تنش خشکی نشان می‌دهند. افزایش ترکیبات اسمزی مانند پرولین و تغییرات فیتوهورمون‌ها بعضی از رایج‌ترین واکنش گیاهان به تنش خشکی است (Hare et al., 1997; Kumar et al., 2011). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مقدار پرولین در ارقام مختلف و هنگام تنش خشکی می‌تواند افزایش یابد و این تجمع باعث تحمل گیاه به خشکی می‌شود (Seki et al., 2007; Zhang et al., 2009) که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. نتایج مشابه این تحقیق در گیاه جو (Gao et al., 2019) و توت فرنگی (Yaghubi et al., 2016) تحت تنش شوری مشاهده گردید.

پراکسید هیدروژن

اثر متقابل خشکی و رقم در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پراکسید هیدروژن موثر بود. کمترین محتوای پراکسید هیدروژن در سطح خشکی ۴۰ درصد در رقم قیزیل‌اوزوم به دست آمد و بیشترین محتوای آن در تیمار ۸۰ درصد در رقم خلیلی یافت شد (شکل ۸).

پراکسید هیدروژن در بسیاری از مکانیسم‌های مقاومت به تنش در گیاهان مشارکت دارد. اخیراً مشخص شده است که پراکسید هیدروژن می‌تواند به عنوان تنظیم کننده کلیدی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر پیری، تنفس نوری، فتوسنتز، حرکات روزنه‌ای، چرخه سلولی و رشد و نمو گیاهان ایفای نقش کند. انباشته شدن مقادیر زیاد پراکسید هیدروژن در سلول‌ها می‌تواند به تنش اکسیداتیو منجر شده و در نهایت موجب مرگ سلول شود. به طور کلی در مورد نقش‌های این مولکول در سلول‌ها عنوان می‌شود که پراکسید هیدروژن نقش دوگانه‌ای در گیاهان دارد. که در غلظت‌های کم به عنوان یک مولکول علامت عمل می‌کند، در صورتی که در غلظت‌های بالا، موجب مرگ سلول می‌شود (Amirjani, 2010; Singam *et al.*, 2011; Thirupathi *et al.*, 2011). در آزمایش حاضر افزایش میزان آن با کاهش مستقیم تحمل رقم به تنش خشکی و کاهش محتوای آن اثر مستقیمی در افزایش تحمل رقم قیزیل‌اوزوم به تنش خشکی داشت.



شکل ۸: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم هیدروژن پراکسید
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

اثر رقم و تنش خشکی روی پارامترهای فتوسنتزی

فلورسانس حداکثر (Fm)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که روند تغییرات فلورسانس حداکثر (Fm) در برگ‌های سازگار به روشنایی تحت تیمار خشکی و رقم انگور در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطح تیمار خشکی، فلورسانس حداکثر کاهش یافت و این کاهش معنی‌دار بود. فلورسانس حداکثر در اثر تابش فوتون‌های نوری و احیای همه ناقل‌های الکترون و بسته بودن همه مراکز واکنش ایجاد می‌شود (Mehta *et al.*, 2010). نتایج ارائه شده در آزمایش حاضر در خصوص فلورسانس حداکثر نشان داد که سطح تنش خشکی در ۸۰ درصد باعث افت میزان فلورسانس حداکثر (Fm) شد. به نظر می‌رسد کاهش فلورسانس حداکثر تحت تیمار خشکی می‌تواند به دلیل کاهش و آسیب کلروفیل و کاهش ظرفیت تبدیل انرژی فتوشیمیایی

در سلول‌های گیاهی باشد (Soheili movahhed *et al.*, 2017). در بررسی اثر متقابل رقم و تنش در رقم قیزیل‌اوزوم در سطح تنش ۶۰ درصد بیشترین میزان فلورسانس حداکثر را دارد که نشان دهنده تحمل بالای این رقم نسبت به دورقم خلیلی و پرلت است. مطالعات متعددی نشان داده است که وجود کوئینون در حالت اکسید شده در تیلاکوئیدهای ایزوله شده منجر به کاهش Fm در گیاه اسفناج گشته است (Mehta *et al.*, 2010) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین تحقیقات انجام گرفته روی گوجه‌فرنگی (Roosta & Sajjadinia, 2010) (*Solanum lycopersicum*) کاهش Fm در اثر سرما را نشان داد.

جدول ۲: تجزیه واریانس فلورسانس کلروفیل تحت تنش خشکی در ارقام مختلف انگور

منابع تغییرات	درجه آزادی	PAR	F	Y(II)	Y(NO)	ETR	FV/FM	Fo	Fm	FV	fv/fo
تیمار	۲	۱۰/۳**	۰/۰۳۶*	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۰۵۸ ^{ns}	۳/۴**	۰/۰۱۲ ^{ns}	۰/۰۲۵ ^{ns}	۱/۵۰۵*	۰/۵۶**	۰/۹۵**
رقم	۳	۳/۸**	۰/۰۹۵*	۰/۰۲۷*	۰/۰۱۴ ^{ns}	۶/۵**	۰/۰۲۳*	۰/۰۵۴ ^{ns}	۰/۵۳*	۰/۱۶*	۰/۸۵**
تیمار*رقم	۶	۲/۲**	۰/۰۷۶*	۰/۰۰۷۹ ^{ns}	۰/۰۱۲*	۲/۰۰۲**	۰/۰۰۲۴ ^{ns}	۰/۰۰۷۸ ^{ns}	۰/۱۴۱ ^{ns}	۰/۱۹۶**	۰/۰۳۹ ^{ns}
خطا		۲/۴	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۵۰۵	۰/۰۰۴۹	۲۶/۷	۰/۰۰۵۸	۰/۰۲۴	۰/۱۱	۰/۲۰۴	۰/۰۲۹
ضریب تغییرات		۵/۹۰۶	۷/۹۷	۱۴/۳۵	۱۳/۱۵	۱۲/۴۱	۱۵/۶۳	۱۲/۴۷	۱۴/۷۴	۱۱/۸۳	۱۶/۵۷

ns, * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

فلورسانس متغیر (Fv)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر تنش خشکی و رقم بر روند تغییرات فلورسانس متغیر در برگ‌های سازگار به روشنایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطح تنش خشکی تا ۶۰ درصد، میزان فلورسانس متغیر (Fv) به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد در رقم قیزیل‌اوزوم افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان فلورسانس متغیر مربوط به رقم قیزیل‌اوزوم در تنش خشکی ۶۰ درصد بود و کمترین میزان آن در تنش ۸۰ درصد در رقم خلیلی مشاهده شد (جدول ۳). فلورسانس متغیر (Fv) که از اختلاف فلورسانس حداکثر (Fm) با فلورسانس حداقل (Fo) بدست می‌آید، وضعیت جریان الکترون از بخش فتوسیستم II به QA را نشان می‌دهد (Hao *et al.*, 2012). از آنجایی که فلورسانس متغیر نشانگر احیای کامل پذیرنده الکترون (Q) است، بنابراین می‌توان استنباط نمود که تنش خشکی در انتقال الکترون به فتوسیستم I باعث ایجاد اختلال گردید (Hao *et al.*, 2012). کاهش فلورسانس متغیر تحت تیمار خشکی می‌تواند به دلیل کاهش محتوای کلروفیل و ظرفیت تبدیل انرژی فتوشیمیایی در سلول‌های گیاهی باشد (Wen *et al.*, 2016). به طور کلی کاهش در شاخص‌های فتوسنتز مانند فلورسانس متغیر در سطوح مختلف تنش خشکی از دو طریق باعث کاهش فتوسنتز می‌شود، یکی از طریق تغییر در فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز، از جمله فروکتوز ۶-۱ بیس فسفاتاز که در چرخه کلوین مؤثر است و آنزیم‌های گلوکونئوزن و تغییر در چرخه پنتوزفسفات اکسیداز که در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد، و دوم از طریق کاهش کلروفیل که

باعث عدم تحریک و کاهش در فتوسنتز می‌شود (Soheili movahhed *et al.*, 2017) که با نتایج آزمایش حاضر در ارتباط با کاهش و آسیب کلروفیل و تحریک کمتر فتوسنتز در سطوح بالای تنش های محیطی مطابقت دارد.

جدول ۳: اثرات متقابل رقم و تنش خشکی بر میزان فلورسانس متغیر (Fv) در ارقام مختلف انگور

رقم/ تنش خشکی	شاهد	۴۰ درصد	۶۰ درصد	۸۰ درصد
خلیلی	۱/۴۳ ^b	۱/۴۵ ^b	۱/۳۳ ^{bc}	۰/۷۹ ^d
قیزیل‌اوزوم	۱/۴۹ ^b	۱/۵۹ ^a	۱/۶۸ ^a	۱/۲۵ ^c
پرلت	۱/۱۶ ^c	۱/۳۵ ^{bc}	۱/۳۵ ^{bc}	۰/۸۵ ^d

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

فلورسانس حداقل (FO)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر تیمار خشکی و رقم روی فلورسانس حداقل (FO) در برگ میوه انگور نشان می‌دهد که اثر تیمارهای مذکور به تنهایی و اثر متقابل خشکی و رقم بر این صفت معنی‌دار نشد.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر رقم روی حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. با افزایش تنش خشکی از صفر تا ۶۰ درصد ظرفیت زراعی حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II افزایش یافت به طوریکه در تنش ۶۰ درصد بیشترین و در تنش ۸۰ درصد کمترین حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II را نشان داد. در ارزیابی اثر متقابل، تنش خشکی در سطح ۶۰ درصد و رقم قیزیل‌اوزوم بیشترین حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) را نسبت تیمار شاهد نشان داد.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) نشان دهنده ظرفیت انتقال الکترون فتوسیستم II است و به عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده می‌شود کاهش میزان Fv/Fm در شرایط اثر متقابل خشکی و رقم در سطح ۸۰ درصد نشانه کاهش میزان حفاظت نوری بوده و همچنین دلیل معنی‌دار بودن تنش خشکی بر کارایی فتوسنتز است. به طور کلی در بسیاری از گونه‌های گیاهی زمانیکه Fv/Fm در حد ۰/۸۳ و یا بیشتر شود به این مفهوم است که تنش بر گیاه اعمال نشده است و لذا مقادیر کمتر از آن نشانه وجود تنش در گیاهان است (Hao *et al.*, 2012) به نظر می‌رسد گیاهی که در سطوح بالای خشکی نسبت Fv/Fm بیشتری داشته باشد، توانایی انجام حفاظت نوری در شرایط تنش را خواهد داشت. نتایج حاصل از این پژوهش نیز حاکی از افزایش Fv/Fm در اثر متقابل تنش ۶۰ درصد در رقم قیزیل‌اوزوم است. در یافته‌های حاضر، تغییرات روشنی در کاهش Fv/Fm در اثر تنش خشکی تحت تیمار خشکی ۸۰ درصد یافت شد که در واقع دارای کمترین توانایی برای تحمل گیاه تحت تیمار به شرایط خشکی است. ممکن است دو دلیل برای کاهش

Fv/Fm در تنش‌های خشکی شدید وجود داشته باشد که یکی مربوط به آسیب کلروفیل و دیگری عدم تعادل یون در سطح بالایی از خشکی است (Lata & Prasad, 2011). سایر محققین در آزمایشی نشان دادند که سرما سبب کاهش حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در ارقام متحمل و حساس گندم به سرما می‌شود اما این کاهش در ارقام متحمل به‌طور معنی‌داری کمتر از ارقام حساس بود (Majdi et al., 2007).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان دهنده آسیب سیستم‌های فتوسنتزی و کاهش Fv/Fm، Fm، Fv، YII و افزایش Y(NO) در اثر تنش خشکی بود. بر اساس نتایج حاصله، خشکی ۴۰ درصد اثرات معنی‌داری بر اغلب شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در سه رقم انگور نداشت این درحالی بود که بیشترین آسیب به سیستم فتوسنتزی در اثر تنش خشکی ۸۰ درصد ثبت شد و در بین ارقام مورد مطالعه رقم خلیلی بیشترین آسیب را متحمل شد. تنش خشکی سبب افزایش نشت الکترولیت، افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن در ارقام مورد مطالعه گردید. رقم قیزیل‌اوزوم با کمترین غلظت پراکسید هیدروژن از کمترین افزایش در تجمع مالون‌دی‌آلدهید و نشت یونی (که معیاری از پراکسیداسیون لیپدها و آسیب غشایی هستند) نسبت به دو رقم دیگر برخوردار بود و در نتیجه کمتر دچار آسیب غشایی شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در ارقام مختلف به‌طور متفاوتی تحت تاثیر تنش قرار گرفتند و سطوح مختلف خشکی اثرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های مذکور داشتند. سطوح خشکی بالاتر از ۶۰ درصد ظرفیت زراعی اثر تخریبی بالایی بر سه رقم انگور مورد مطالعه دارد و در بین سه رقم خلیلی، پرلت و قیزیل‌اوزوم، رقم قیزیل‌اوزوم با داشتن سازوکارهای تحمل کارآمدتر از جمله فعالیت آنزیمی مناسب و کاهش اثرات زیان‌بار خشکی، به‌عنوان رقم متحمل‌تر نسبت به دو رقم پرلت و خلیلی معرفی گردید.

منابع

- Abid, G., Ouertani, R.N., Muhovski, Y., Jebara, S.H., Hidri, Y., Ghouili, E. and Jebara, M. (2020). Variation in antioxidant metabolism of faba bean (*Vicia faba*) under drought stress induced by PEG reveals biochemical markers associated with antioxidant defense. *Plant Biosystems*, 9:1-12.
- Alston, J.M. and Sambucci, O. (2019). *Grapes in the world economy*. 1th edn. Springer, Cham, 365 Pp. Bern.

- Alzahrani, S.M., Alaraidh, I.A., Migdadi, H., Alghamdi, S., Khan, M.A. and Ahmad, P. (2019). Physiological, biochemical, and antioxidant properties of two genotypes of *Vicia faba* grown under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 51: 786–798.
- Amini, Z., Moalemi, N. and Saadati, S. (2014). Effects of water deficit on proline content and activity of antioxidant enzymes among three olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Plant Research*, 27(2): 156-167.
- Amirjani, M.R. (2010). Effects of salinity stress on growth, mineral composition, proline content, antioxidant enzymes of soybean. *American Journal of Physiology*, 5:350-360.
- Bates, L.S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205- 207.
- 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.
- De Oliveira, W. F., dos Santos, S., Marcelino, P., Breitenbach Barroso Coelho, L. C., dos Santos, C. and Tereza, M. (2018). Plant Antioxidants and Mechanisms of Action. *Letters in Drug Design & Discovery*, 15(10): 1103-1115.
- Dezar, C.A., Gago, G.M., González, D.H. and Chan, R.L. (2005). Hahb-4, a sunflower Homeobox-Leucine Zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Research*, 14: 429-440.
- Dodd, I. C. (2005). “Root-to-Shoot Signalling: Assessing the Roles of ‘Up’ in the Up and Down World of Long-Distance Signalling in Planta,. *Plant and Soil*, 274 (1-2): 251-270
- Escalona, J.M., Fuentes, S., Tomás, M., Martorell, S. and Flexas J. (2013). Responses of leaf night Transpiration to drought stress in *Vitis vinifera* L. *Agricultural water management*, 118:50-58 .
- Gambetta, G.A., Herrera, J.C., Dayer, S., Feng, G., Hochberg, U. and Castellarin, S. (2020). The physiology of drought stress in grapevine: towards an integrative definition of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 71(16): 4658–4676.
- Gao, W., Feng, Z., Bai, Q., He, J. and Wang, Y. (2019). Melatonin-mediated regulation of growth and antioxidant capacity in salt-tolerant naked oat under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5): 1176-1181.

- Gou, J., Strauss, S.H. and Tsai, C.J. (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell*, 22: 623-639.
- Hao, H., Xiao, W. and Fashui, H. (2012). Effects of nanoanatase TiO_2 on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological trace Element Research*, 119(1): 68-76.
- Hare, P.D., W.A. Cress and J. van Staden. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulat*, 23:79–103.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M., Anee, T.I., Parvin, K. and Fujita, M. (2017). Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defense and glyoxalase system to confer PEG-induced oxidative stress in rapeseed. *Journal of Plant Interactions*, 12(1): 323-331.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A. and Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8: 384-396.
- Health, R.L. and Packer, L. (1968). Photo peroxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biophysics*, 125: 189-198.
- Hogland, D.R. and Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants with soil. *California Agriculture Experiment Station Circular*, 374: 1-32.
- Hosseini, N.S., Hagh, Z.G., and Koshghalb, H. (2020). Morphological, antioxidant enzyme activity and secondary metabolites accumulation in response of polyethylene glycol-induced osmotic stress in embryo-derived plantlets and callus culture of *Salvia leriifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140(1): 143-155.
- Huang, L.J., cheng, G.X., Khan, A., Wei, A.M., Yu, Q.H., Yang, S.B. and Gong, Z.H. (2019). CaHSP16.4, a small heat shock protein gene in pepper, is involved in heat and drought tolerance. *Protoplasma*, 256(1): 39-51.
- Kafi, M., Nabati, J., Masoumi, A. and Zare Mehrgerdi, M. (2011). Effect of salinity and silicon application on oxidative damage of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) moench. *Pakistan Journal of Botny*, 43(5): 396-404.
- Karimi Alvije, M., Abadi, A., Musavi, S.A. and Salami, S.A. (1994). Investigation of changes in catalase, peroxidase and total protein enzymes in response to cold stress in some grape cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 1(29): 103-110. (In Farsi)

- Khan, M.S. (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25 (3):2433-2442.
- Kim, T.-H., Böhmer, M. and Huet, H. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 561-591.
- Kumar, R.R., Karajol, K., and Naik, G.R. (2011). Effect of PEG induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Research in Science and technology*, 15(6): 256-262.
- Lata, C. and Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal Experimental Botany*, 62: 4731-4748.
- Lovisol C., Perrone, I. A., Carra, A., Ferrandino, J., Flexas, H., Medrano, F. and Schubert, A. (2010). "Drought-Induced Changes in Development and Function of Grapevine (*Vitis* spp.) Organs and in Their Hydraulic and Non-Hydraulic Interactions at the Whole-Plant Level. *Functional Plant Biology*, 37(3): 98-116 .
- Ma, Y.Y., Zhang, Y.L., Shao, H. and Lu, J. (2010). Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolerant and non-tolerant grapes (*Vitis* L.) from China. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(3): 212-219.
- Ma, Y., Qin, F. and Tran, L.S. (2012). Contribution of genomics to gene discovery in plant abiotic stress responses. *Molecular Plant*, 5 (6):1176-1178.
- Majdi, M., Karimzadeh, G. and Mahfuzi, S. (2007). Effect of Low Temperature and External Calcium on the Quantum Efficiency of Photosystem 2 (Fv / Fm) and Chlorophyll Levels in Sensitive Wheat Varieties Cold. *Research Construction*, 77(20): 175-181. (in Farsi).
- Mehri, H., Ghbadi, C., Baninasab, B., Ehsanzadeh, P. and Gholami, M. (2015) Evaluation of some physiological and morphological responses of four Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to drought stress under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Process and Function*, 3(10): 115-126.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. and Bharti, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant physiology and biochemistry*, 48(1): 16-20.

- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environment*, 26:845-856.
- Mutlu, S., Atici, O. and Nalbantoglu, B. (2009). Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53: 334-338.
- Nayyar, H. (2003). Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany*, 50: 253-264.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O.A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 4089-4096.
- Roosta, H.R. and Sajjadinia, A. (2010). Studying the effect of cold stress on green basil, violet basil, tomato and lettuce using chlorophyll fluorescence technique. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 3(1): 1-8.
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazon, J., Ghassempour, A. and Mirgalili, M.H. (2019). Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. Callus culture. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 137(2): 319-328.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:296–302.
- Singam, K., Juntawong, N., Cha-Um, S. and Kirdmanee, C. (2011). Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) roots under iso-osmotic conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10:1340-1346.
- Soheili movahhed, S., Esmaeili, M.A., Jabbari, F., Khorramdel, S. and Fouladi, A. (2017). Effects of water deficit on Relative Water Content, Chlorophyll Fluorescence indices and seed yield in four pinto bean genotypes. *Journal of Crop Production*, 10(1): 169-190. (In Farsi)
- Su, L., Dai, Z., Li, S. and Xin, H. (2015). A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. *BMC plant biology*, 15(1): 82-88.

- Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and McManus, M.T. (2010). Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*, 9(2): 74-75.
- Szabados, L. and Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15:89-97 .
- Tadjvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, H. and Hassan Sajedi, R. (2011). Physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9:1-12. (In Farsi).
- Talaie, A. R., Ghaderi, N., Ebadi, A. & Lesani, H. (2009). Biochemical responses of two varieties of seedless white grapes Sahany and changes in soil water potential. *Acta Horticulturae*, 42(3), 301-308.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Eshghi, S., Kholdebarin, B. and Ramezani, A. (2010). Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia Vera* L. 'Badami') seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(4): 349-359.
- Thirupathi K., Jun-Cheol, M., Changsoo, K., Kumariah, M. and Wook K. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6): 709-725.
- Velikova, V., Yordanov, J. and Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- Wan, S.B., Tian, L., Tian, R.R., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Wen, P.F. and Huang, W.D. (2009). Involvement of phospholipase D in the low temperature acclimation-induced thermo tolerance in grape berry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6): 504-510.
- Wang, C., Shangguan, L., Yang, G. and Kayesh, E. (2014). Depiction of Grapevine Phenology by Gene Expression Information and a Test of its Workability in Guiding Fertilization. *Plant molecular biology reporter*, 32 (5):1070-1084.
- Wen, Z.H., Shen, J.B., Blackwell, M., Li, H.G., Zhao, B.Q. and Yuan, H.M. (2016). Combined applications of nitrogen and phosphorus fertilizers with manure increase maize yield and nutrient uptake via stimulating root growth in a long-term experiment. *Pedosphere*, 26: 62-73.

- Yaghubi, K., Ghaderi, N., Vafae, Y. and Javadi, T. (2016). Potassium silicate alleviates deleterious effects of salinity on two strawberry cultivars grown under soilless pot culture. *Scientia Horticulturae*, 213: 87-95.
- Yamaguchi, M., Valliyodan, B. and Zhang, J. (2010). Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell Environment*, 33: 223-243.
- Yang, S., Vanderbeld, B., Wan, J. and Huang Y. (2010). Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. *Molecular Plant*, 3: 469-490.
- Zhang, X., Ervin, E.H., Evanylo, G.K. and Haering K.C. (2009). Impact of biosolids on hormone metabolism in drought-stressed tall fescue. *Crop Science*, 49: 1893-1901.
- Zhang, Q., Zhang, J.Z., Chow, W.S., Sun, L.L., Chen, J.W., Chen, Y.J. and Peng, C.L. (2011). The influence of low temperature on photosynthesis and antioxidant enzymes in sensitive banana and tolerant plantain (*Musa* sp.) cultivars. *Photosynthetica*, 49: 201-208.

Evaluation of some of the physiological and biochemical changes in three grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) in response to drought stress

M. A. Aazami^{1*}, E. Shamsinow¹, M. B. Hassanpouraghdam¹

Received:2020.12.6

Accepted:2021.4.24

Abstract

In this study, effects of drought stress on three grape cultivars ('Ghizil Ouzum', 'Khalili', and 'Perlet'), an experiment was conducted in a CRD with four replications. Grape plants were treated at four levels including control, drought stress of 40, 60, and %80 of field capacity for two months. Physiological and biochemical traits including proline content, electrolyte leakage, hydrogen peroxide, total soluble protein, malondialdehyde, and the enzymatic activity of catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase were studied, which showed different levels of significance. The highest amount of electrolyte leakage and hydrogen peroxide was observed in 'khalili' in %40 drought stress level. The 'Gizil ousum' showed the highest level of catalase in %60 drought stress and the lowest content of malondialdehyde in %80 drought stress and the highest amount of total soluble protein. The activity of the ascorbate-peroxidase enzyme at all levels of stress and the guaiacol peroxidase at %60 drought stress was in 'perlet' in the highest amount. In the study of chlorophyll fluorescence parameters including minimal fluorescence (F_o), variable fluorescence (F_v), maximal fluorescence (F_m), the effective photochemical quantum yield of photosystem (YII), the maximum photochemical quantum yield of photosystem II (F_v / f_m), Quantum yield of non-regulated non-photochemical II Y(NO) changes were significant in drought stress treatment, and 'ghizil ousum' in %60 FC compared to control. Drought stress levels above %60 FC have a high destructive effect on the three grape cultivars studied. Among three cultivars, the more efficient tolerance mechanisms including appropriate enzymatic activity and reduction of harmful effects of drought, 'ghizil ousum' was introduced as a more tolerant cultivar than 'perlet and 'khalili'.

Keywords: *Antioxidant enzymes, Chlorophyll fluorescence, Drought stress, Grape, Proline*

1- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran
*(Corresponding author: maryapeyvandi@gmail.com)

2- MSc Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran

3- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran

جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات معادن فسفاتی و بررسی پتانسیل آن‌ها در انحلال فسفات خاک

یعقوبعلی کرمی^۱، عباس صمدی^{۲*}، علیرضا فلاح نصرت آباد^۳، ابراهیم سپهر^۴، محسن برین^۵

چکیده

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از دو معدن فسفاتی و بررسی توانایی انحلال فسفات خاک توسط آنها بود. با به‌کارگیری محیط اسپربر مایع غنی‌شده با فسفات خاک اسفوردی و سری رقت‌سازی در محیط اسپربر جامد غنی‌شده با این فسفات خاک، ۸۵ کلنی با مورفولوژی‌های متفاوت، جداسازی و خالص‌سازی شدند. چهار جدایه از ۸۵ جدایه (Rpy از معدن اسفوردی، Ggd/4 و Rpd/4، Tkd/4 از معدن جیروود) با بالاترین مقدار فسفر حل‌شده در محیط کشت اسپربر مایع به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب گردیدند. با استفاده از توالی یابی ژن 16S rRNA جدایه‌های Rpy، Tkd/4، Rpd/4 و Ggd/4 با ۹۹ درصد مشابهت با شماره دسترسی‌های به‌ترتیب MW646604، MW646605، MW646606 و MW646607 به‌ترتیب، *Bacillus pumilus*، *Curtobacterium flaccumfaciens*، *Sphingobium yanoikuyae* و *Pantoea agglomerans* تشخیص داده شدند. آزاد سازی چندین برابری فسفر توسط این جدایه‌ها نسبت به‌شاهد، از سه منبع فسفاتی (تری کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و فسفات خاک) نشان داد، که این باکتری‌ها توانایی انحلال منابع فسفاتی دیگری را نیز دارند.

واژه‌های کلیدی: تری کلسیم فسفات، فسفات خاک، فیتات کلسیم، معدن فسفات اسفوردی یزد، معدن فسفات جیروود شمشک

- ۱- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران و مربی پژوهشی بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
- ۲- استاد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(نویسنده مسئول: a.samadi@urmia.ac.ir)
- ۳- دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- ۴- دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۵- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مقدمه

مقدار فسفر (P) کل خاک عموماً در حدود ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک است و تنها بخش کوچکی از آن (۱ میلی گرم بر کیلوگرم و یا کمتر) برای رشد گیاه، در دسترس قرار دارد. بخش بسیار بزرگتری از فسفر نیز به شکل خاک‌های فسفات و سایر رسوبات است که توسط گیاهان قابل جذب نیستند (Goldstein, 1994). خوشبختانه ریزجانداران خاک به‌ویژه ریزجانداران حل‌کننده فسفات، این ترکیبات غیرمحلول فسفر را تحت تأثیر قرار داده و به‌طور مؤثر فسفر را از این ترکیبات آزاد (Rodriguez & Fraga, 1999) و به اشکال محلول در اختیار گیاهان قرار می‌دهند. بر اساس گزارش‌های موجود، در این فرآیند برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای نقش ویژه و منحصر به‌فردی هستند (Babana & Antoun, 2006).

در سیستم کشاورزی پایدار، انحلال میکروبی فسفر مورد توجه بیشتری قرار می‌گیرد (Singh & Reddy, 2011) و همچنین، مشخص شده است که افزایش کارایی فسفات خاک با به‌کارگیری مستقیم باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان کود، می‌تواند به کاهش تقاضای کودهای فسفوری در کشورهای در حال توسعه کمک نماید. گزارش‌های متعددی در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از زیستگاه‌های مختلف همچون خاک (Mendoza-Arroyo et al., 2020; Liu, 2019)، ریشه‌سپهر (رایزوسفر) (Zhang et al., 2019; Pérez-Rodriguez et al., 2020; Teng et al., 2018; Babu et al., 2017)، کمپوست (Haouas et al., 2020) و معادن فسفات خاک (Yadav et al., 2015; Azaroual et al., 2020) در سایر نقاط جهان در دسترس می‌باشند.

بر اساس نتایج آزمایشی در چین، جدایه YC (*Stenotrophomonas maltophilia*) جداسازی‌شده از معدن فسفاتی هوئی چین توانست تری‌کلسیم‌فسفات را حل و فسفر محلول را در محیط کشت (NBRIP National Botanical Research Institute's phosphate) آزاد کند (Xiao et al., 2009). نتایج مطالعاتی در اندونزی نشان داد که باکتری *Serratia* ایزوله QC3.a.2 جداسازی شده از یک معدن، بالاترین توانایی حل فسفر در محیط مایع پیکوواسکایا را دارد (Mursyida et al., 2015). از ۱۱۰ باکتری حل‌کننده فسفات جداسازی شده از معادن فسفات خاک غنی از اکسیدهای آهن و آلومینیوم هندوستان، دو باکتری از جنس *Bacillus* و *Brevibacillus* بودند (Yadav et al., 2015).

در بررسی توانایی انحلال فسفات ریزجانداران، از دو روش کیفی و کمی استفاده می‌شود. در روش کیفی قطر هاله و یا نسبت قطر هاله‌ی شفاف به قطر کلنی در محیط کشت جامد (Liu et al., 2015) و در روش کمی، مقدار فسفر رهاسده در بخش مایع محیط کشت، معیاری برای سنجش توانایی انحلال فسفات در ریزجانداران است (Paul & Sinha, 2013). گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، اگرچه در انحلال تری‌کلسیم‌فسفات بسیار مؤثر هستند، اما قادر به تولید هاله در پلیت آگارهای حاوی فسفات آهن و یا فسفات آلومینیوم (Puentes et al., 2004; Perez et al., 2007) و فسفات خاک

(Yadav et al., 2015) نیستند. همچنین گزارش شده است که جدایه‌هایی که قادر به نشان‌دادن هیچ‌گونه هاله در محیط جامد آگار نیستند، قادر به انحلال اشکال مختلف فسفر در کشت مایع بودند (Gupta et al., 1994).

بر اساس سوابق ذکر شده احتمالاً معادن فسفاتی ایران نیز زیستگاه‌های ناشناخته‌ای برای تعداد زیادی از ریزجانداران به ویژه حل‌کننده‌های فسفات نامحلول هستند که به جداسازی آنها از این معادن کمتر توجه شده است. از طرفی در ایران در اغلب تحقیقات، فسفات‌خاک معدن اسفوردی یزد به‌عنوان یکی از منابع فسفوری نامحلول با خلوص بالا بکار رفته است (حیاتی و همکاران، ۱۳۹۰). معدن فسفاتی اسفوردی یزد مهم‌ترین معدن فسفات آذرین کشور است که با تولید سالانه حدود ۷۰ هزار تن کنستانتره فسفات، به‌عنوان باکیفیت‌ترین تولیدکننده فسفات در منطقه محسوب می‌شود. البته معادن دیگری نیز وجود دارند که رسوبی بوده و خلوص پایینی از فسفات را دارا هستند که معادن فسفات جیروود شمشک، لار و چادرملو از آن جمله هستند. با توجه به موارد ذکر شده، هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات از دو معدن فسفات‌خاک جیروود شمشک و اسفوردی یزد با استفاده از محیط اسپربر (Sperber) مایع و جامد اصلاح شده با فسفات‌خاک اسفوردی یزد و ارزیابی توان انحلال فسفات آن‌ها با به‌کارگیری سه منبع مختلف کم‌محلول و نامحلول فسفاتی شامل تری‌کلسیم‌فسفات، فیتات کلسیم و فسفات‌خاک در محیط اسپربر مایع بود.

مواد و روش‌ها

محل و روش نمونه‌برداری

معدن فسفات منطقه جیروود از توابع شمشک در ۴۵ کیلومتری شمال تهران در بخش مرکزی رشته کوه‌های البرز (طول جغرافیایی ۳۰° ۵۱' و عرض جغرافیایی ۰۰° ۳۶') واقع شده است. افق فسفاتی معدن منطقه‌ی جیروود شمشک شامل چندین لایه ماسه فسفات‌خاکی است که در یک واحد شیلی متورق سیاه جای گرفته است. آپاتیت و کوارتز کانی‌های اصلی و کلسیت، پیریت، اکسیدهای آهن و کانی‌های رسی کانی‌های فرعی این سازند هستند (مقدسی، ۱۳۹۵).

معدن فسفات‌خاک اسفوردی یزد نیز در ۲۶ کیلومتری شمال شرق شهر بافق یزد در طول جغرافیایی ۳۵° ۵۵' شرقی و عرض جغرافیایی ۴۸° ۳۱' شمالی واقع شده است. افق اصلی این معدن نیز شامل مجموعه‌هایی از کانی‌های آهن و آپاتیت و همچنین ترمولیت و اکتینولیت است (پاکنژاد، ۱۳۷۰).

برای تهیه نمونه‌های خاک چهار نمونه از خاک اطراف و ریزوسفر دو گیاه (*Glaucium oxylobum*, *Rumex scutatus*) (L. معدن فسفات‌خاک منطقه جیروود و یک نمونه از خاک اطراف معدن فسفات‌خاک اسفوردی یزد در سه تکرار برداشته شد. مساحت مناطق نمونه‌برداری در هر تکرار (۲۵ متر × ۲۵ متر در منطقه با فاصله ۱۰ متری از منطقه نمونه برداری دیگر) بود.

نمونه‌های خاک از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری سطح خاک توسط کوور سمپلر (رینگ نمونه‌برداری) با دهانه‌ی ۴ سانتی‌متر پس از کنار زدن بقایای سطحی ۳ سانتی‌متر بالا و نمونه‌های ریزوسفری از محل ریزوسفر ریشه‌ی گیاهان (با جداسازی خاک اطراف ریشه با برس) تهیه شد (Hamdali et al., 2012). نمونه‌ها چون در سه تکرار برداشته شده بودند پس از اختلاط نمونه‌های مشابه، چهار نمونه از معدن جیروود شمشک و یک نمونه از معدن اسفوردی یزد تهیه شد. نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی استریل قرار داده شدند و با یک باکس خنک فوراً به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات

هر نمونه خاک به‌طور جداگانه به‌خوبی مخلوط و از الک دو میلی‌متری عبور داده‌شد. یک گرم از خاک هر نمونه به‌طور جداگانه به محیط اسپربر مایع (ترکیبی از ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر (Yeast extract)، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم (CaCl₂)، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزوم (MgSO₄.7H₂O) و ۲/۷ گرم فسفات خاک اسفوردی یزد به‌جای ۲/۵ گرم تری‌کلسیم‌فسفات در یک لیتر) اضافه گردید (Sperber, 1958). نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۲۷ درجه سلسیوس تکان داده شدند.

برای تهیه کلنی‌ها یک میلی‌لیتر از هر نمونه، به‌صورت سری رقت در پتری‌دیش‌های حاوی محیط اسپربر جامد (محتویات ذکر شده در فوق به‌همراه ۱۵ گرم آگار در یک لیتر) پلیت شدند. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۷ شبانه‌روز در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس در گرم‌خانه نگهداری شدند. ۸۵ کلنی مختلف که مورفولوژی‌های متفاوتی را نشان دادند، به‌صورت جداگانه برداشته و خالص‌سازی شدند.

ارزیابی کمی انحلال فسفات خاک توسط جدایه‌ها

برای اندازه‌گیری توانایی کمی انحلال جدایه‌ها از محیط اسپربر مایع استفاده شد. بدین منظور ابتدا همه‌ی ۸۵ جدایه در محیط LB (Luria-Bertoni) کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه شیکردار با ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از هر محیط LB حاوی جدایه‌ها (با چگالی نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع به‌طور جداگانه مایه‌زنی شد و برای ۷ روز به گرم‌خانه شیکردار با ۱۲۰ rpm و دمای ۲۷ درجه سلسیوس منتقل گردید. سپس، ۲ میلی‌لیتر از هر محیط اسپربر برداشته و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm، سانتریفیوژ (UniCen, 15 DR, Herolab GmbH, Germany) شد، تا از محلول شفاف بدست آمده غلظت فسفر حل‌شده اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری غلظت فسفر با روش مولیبدات و انادات (Paul & Sinha 2013) انجام شد. چهار جدایه (Ggd/4، Rpd/4، Tkd/4 و Rpy) با بالاترین مقدار فسفر حل‌شده به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب گردیدند.

ارزیابی و مقایسه توانایی انحلال فسفات جدایه‌های برتر به صورت کمی با به کارگیری سه منبع مختلف فسفاتی

بر اساس گزارشات موجود جداسازی‌ها و آزمایش‌ها برای در نظر گرفتن سهم مستقیم گیاهان از فسفر، تنها بر اساس یک کانی غیر واقعی است، زیرا حداقل ۳۰ تا ۷۰ درصد از کل فسفر خاک‌های کشاورزی، فسفر آلی است (Rengel, 1999) و علاوه بر آن سایر اشکال معدنی فسفر مانند تری‌کلسیم فسفات، اکتاکلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، فسفات‌های آهن و آلومینیم و غیره نیز در خاک وجود دارند. بر این اساس با انجام آزمایشی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفر سه منبع مختلف فسفاتی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در چارچوب طرح آماری کاملاً تصادفی با دو فاکتور جدایه: Tkd/4, Rpy و Ggd/4, Rpd/4 و شاهد (بدون باکتری) و فاکتور منبع فسفاتی: تری‌کلسیم فسفات، فیتات کلسیم و فسفات خاک، در محیط کشت اسپریر مایع در سه تکرار انجام شد.

بدین منظور چهار جدایه برتر حاصل از ارزیابی کمی انحلال فسفات خاک به مدت ۴۸ ساعت در محیط LB در گرم‌خانه رشد داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر محیط LB حاوی جدایه‌ها (با چگالی نوری ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ارلن های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط اسپریر که در آن سه منبع فسفاتی (فسفات خاک یزد، فیتات کلسیم و تری کلسیم فسفات) به طور جداگانه استفاده شده بود مایه‌زنی و برای ۷ روز به گرم‌خانه‌ی شیکردار با ۱۲۰ rpm و دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس منتقل گردید. سپس، ۲ میلی‌لیتر از هر محیط اسپریر را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، تا از محلول شفاف به دست آمده غلظت فسفر حل‌شده اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری غلظت فسفر با روش مولیبدات وانادات (Paul, & Sinha, 2013) انجام شد. pH و EC هر نمونه نیز به ترتیب با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm مدل 691) و EC متر (JENWAY مدل 4510) قرائت شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات با استفاده از توالی یابی ژن 16S rRNA

به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید. برای تکثیر ژن مورد نظر یک میکرولیتر از آغازگرهای F27 و R1492 با غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر، ۴ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر، ۵ میکرولیتر منیزیم کلرید با غلظت ۵۰ میلی‌مول بر لیتر، یک میکرولیتر DNA تک پلی‌مراز (۵ واحد بر میکرولیتر) و دو میکرولیتر از DNA استخراج شده استفاده شد. مخلوط واکنش PCR (USA Biorad) ۵۰ میکرولیتر بود (Turan et al., 2006). شرایط انجام PCR به صورت زیر تنظیم گردید:

واسرشت اولیه (denaturation Initial) در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) در ۵۳ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و گسترش (Extension) در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۷ دقیقه.

محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد v/v در بافر TBE 1X با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت عبور داده شد. سپس ژل تحت نور UV نمایان شده و با استفاده از دستگاه ژل داک تصویر ژل ثبت گردید. مقایسه باند تکثیرشده با یک نشانگر DNA به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر بخش موردنظر ژنوم را نشان داد.

توالی‌یابی ژن 16S rRNA باکتری‌ها و آنالیز فیلوژنی

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA این جدایه‌ها با استفاده از کیت خالص‌سازی خالص شده و به‌منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و یک توالی کانتیگ برای هر جدایه به‌دست آمد. سپس این توالی‌های کانتیگ در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند. تعداد مناسبی از توالی‌های ژن 16S rRNA برای هر کدام از سویه‌های باکتری از طریق این پایگاه انتخاب و سپس به کمک نرم‌افزار MEGA 5.1 بین این توالی‌ها و توالی‌های ۴ جدایه باکتری هم‌ردیفی انجام شد. با استفاده از این نرم‌افزار، درخت فیلوژنتیکی به وسیله روش neighbor joining ترسیم و میزان صحت آن با روش bootstrap تعیین شد (Stocklin, 1968). در پایان و پس از شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، توالی ژن 16S rRNA همه آنها در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ثبت و شماره دسترسی (Accession number) برای هر یک از آنها به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل آماری شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

مرحله خالص‌سازی جدایه‌ها نشان داد همه ۸۵ جدایه که قادر به رشد در محیط جامد اسپربر غنی شده با فسفات‌خاک اسفوردی یزد بودند در این محیط هاله ندادند. بر اساس گزارشات موجود، سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، قادر به تولید هاله شفاف در پلیت آگارهای حاوی فسفات‌خاک (Yadav et al., 2015) نیستند. از طرفی گزارش شده است جدایه‌هایی که قادر به

ایجاد هیچ‌گونه هاله قابل مشاهده در محیط جامد آگار نیستند، قادر به انحلال اشکال مختلف فسفر در کشت مایع بودند (Gupta et al., 1994). بر همین اساس جدایه‌های برتر بر اساس توانایی انحلال فسفات‌خاک در محیط مایع اسپربر غنی شده با فسفات-خاک اسفوردی یزد انتخاب و پس از آن این توانایی با استفاده از سه منبع فسفاتی با انجام یک آزمایش آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. هاله شفاف جدایه Rpy روی پلیت اسپربر با منبع فیتات کلسیم در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱: توانایی انحلال فسفات (ایجاد هاله) توسط جدایه Rpy در محیط اسپربر جامد اصلاح شده با فیتات کلسیم

نتایج تجزیه واریانس تاثیر جدایه‌ها بر انحلال فسفات در سه منبع فسفاتی در محیط کشت اسپربر مایع (جدول ۱) نشان دادند، اثر ساده سویه باکتری، منبع فسفاتی و برهمکنش آن‌ها بر ویژگی‌های فسفر حل‌شده، pH و EC معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$).

بر اساس مقایسه میانگین فسفر حل‌شده (جدول ۲) بیشترین انحلال فسفر توسط جدایه‌ها به ترتیب از منابع فسفاتی تری‌کلسیم‌فسفات، فیتات کلسیم و فسفات‌خاک اتفاق افتاد. به‌طوریکه بیشترین مقدار فسفر حل‌شده از کانی تری‌کلسیم‌فسفات توسط دو جدایه Rpy و Tkd/4 به ترتیب به مقدار ۳۷۲ و ۳۶۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. پس از آن دو جدایه Ggd/4 و Rpd/4 از منبع فیتات کلسیم بیشترین مقدار فسفر حل‌شده را به ترتیب به مقدار ۳۳۰ و ۳۱۵ میلی‌گرم بر لیتر آزاد نمودند. بدین ترتیب تواناترین جدایه در انحلال تری‌کلسیم‌فسفات دو جدایه Rpy و Tkd/4، فیتات کلسیم جدایه Ggd/4 و فسفات‌خاک جدایه Rpy با مقدار ۸۲/۶۷ میلی‌گرم در لیتر فسفر حل‌شده بودند. نتایج یک جداسازی از معادن فسفات‌خاک غنی از اکسیدهای آهن و آلومینیوم در هندوستان نشان داد که از ۱۱۰ جدایه حل‌کننده فسفات جداسازی شده از این معادن دو باکتری *Brevibacillus* و *Bacillus* بیشترین توانایی را در انحلال منابع فسفاتی به‌کار برده شده داشتند (Yadav et al., 2015). بر اساس نتایج آزمایشی در چین جدایه *Stenotrophomonas maltophilia* YC جداسازی شده از معدن فسفاتی هوبی چین تری‌کلسیم‌فسفات را حل و باعث رهاسازی فسفر در محیط رشد NBRIP شد (Weisburg et al., 1991). نتایج بررسی‌های خوشرو و ساریخانی (۱۳۹۶) نیز نشان داد انحلال فسفر از منبع تری‌کلسیم‌فسفات، در مقایسه با فسفات‌خاک بیشتر بود. سویه Rpy که از معدن اسفوردی یزد جداسازی شده بود با توجه به نوع فسفات‌خاک به‌کاررفته در محیط کشت (فسفات‌خاک اسفوردی یزد)، توانایی بیشتری در انحلال فسفات‌خاک نسبت به جدایه‌های منطقه‌ی جیرود شمشک نشان داد و این فرض را ایجاد نمود که ممکن است از نظر اکولوژیکی

سازگاری سویه‌ها در انحلال فسفات‌خاک زیست‌گاه خود بیشتر از فسفات‌خاک غیر زیست‌گاه خود باشد (Xiao et al., 2015; Xiao et al., 2020)، هرچند این ادعا نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد. در گزارشی به اختلاف منشأ جداسازی سویه‌ها و تأثیر آن بر بروز تفاوت در انحلال منبع فسفاتی اشاره شده است (Yadav et al., 2015)، ضمن اینکه گوپتا و همکاران (Gupta et al., 2007) نیز ضمن تأکید بر تفاوت سویه‌ها در انحلال منابع فسفاتی با توجه به منشأ جداسازی سویه‌ها، بر تحمل ریزجانداز جداسازی شده از هر منشأ به نوع عناصر (فلز) موجود در زیست‌گاه خود اشاره کرده‌اند.

جدول ۱: تجزیه واریانس فسفر حل‌شده، pH و EC در محیط‌های کشت تحت تأثیر جدایه‌ها و منبع فسفاتی

منابع تغییر	درجه آزادی	فسفر حل‌شده	pH	EC
جدایه باکتری	۴	۴۳۳۱۶**	۸/۰۴**	۶۸۵۴۳**
منبع فسفاتی	۲	۱۷۷۹۷۴**	۰/۴۲**	۱۱۵۴۰۵**
جدایه‌ی باکتری* منبع فسفاتی	۸	۲۲۳۲۰**	۱/۹۶**	۴۰۵۶۶**
خطا	۲۸	۱۸	۰/۰۱	۹۶
ضریب تغییرات		۲/۳۴	۱/۳۷	۱/۳۵

* و **: به ترتیب وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های فسفر حل‌شده (میلی‌گرم بر لیتر) از سه منبع فسفاتی پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

منابع فسفات			جدایه	ردیف
فسفات‌خاک	فیتات کلسیم	تری کلسیم فسفات		
۴۱/۶۷i	۶۱/۶۷h	۱۰۹/۶۷f	شاهد	۱
۶۴/۳۳h	۳۳۰b	۲۵۲e	Ggd/4	۲
۶۵/۳۳h	۳۱۵/۳۳c	۲۶۲/۶۷e	Rpd/4	۳
۸۲/۶۷g	۲۹۳/۶۷d	۳۷۲a	Rpy	۴
۵۶/۳۳h	۸۲g	۳۶۵a	Tkd/4	۵

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

میانگین‌های داده‌های pH (جدول ۳) نشان داد که بیشترین کاهش pH به مقدار ۳/۳۰ واحد توسط جدایه Tkd/4 از منبع فسفات‌خاک و کمترین کاهش pH به مقدار ۶/۹۶ واحد توسط جدایه Ggd/4 از منبع فیتات کلسیم اتفاق افتاد. در آزمایشی مشابه بیشترین میزان کاهش pH از فسفات‌خاک توسط سویه‌های مورد استفاده به مقدار ۳/۰ واحد گزارش گردید (Kennedy & Smith, 1995). تواناترین جدایه در کاهش pH فسفات‌خاک و تری کلسیم فسفات، جدایه Tkd/4 و فیتات کلسیم جدایه Rpy بود. هرچند جدایه Tkd/4 با وجود کاهش pH فسفات‌خاک به مقدار ۳/۳ واحد نتوانست فسفر زیادی از این منبع نسبت به شاهد آزاد نماید، اما همین جدایه از منبع فسفاتی تری کلسیم فسفات ۳/۵ برابر شاهد فسفر آزاد نمود و یا هرچند تأثیر جدایه Rpy بر کاهش pH از منبع فیتات کلسیم بیشتر از جدایه Ggd/4 بود اما مقدار فسفر آزادشده توسط جدایه Ggd/4 ۳۰ درصد بیش از جدایه Rpy از این منبع بود. به نظر می‌رسد شاید بتوان این موارد را به تفاوت سازوکارهای انحلال و ماهیت منبع فسفاتی و

توانایی موجودات درگیر در فرآیند انحلال نسبت داد (Oliveira et al., 2009). به عقیده کائو و همکاران (Cao et al., 2018)، این تفاوت علاوه بر تفاوت توان انحلال فسفر نامحلول سویه‌ها ممکن است به تفاوت مقدار مصرف فسفر این باکتری‌ها نیز بستگی داشته باشد. ایشان همچنین این تفاوت را به تفاوت پتانسیل جذب فسفر باکتری‌ها از محیط نسبت دادند و نتیجه گرفتند، مصرف زیاد فسفر و سنتز بیولوژیکی آن، باعث کاهش فسفر محلول در محیط مایع خواهد شد. مقایسه میانگین‌های EC (جدول ۴) نشان داد که بیشترین EC از کانی تری‌کلسیم‌فسفات به مقدار ۰/۹۷۳ دسی‌زیمنس بر متر توسط جدایه Rpy تولید شد که ۱/۴ برابر شاهد بود. دو جدایه Rpy و Rpd/4، EC فیتات کلسیم را به یک اندازه بالا بردند و بالاترین EC را از این کانی تولید نمودند. همه جدایه‌ها نسبت به شاهدهای خود باعث افزایش معنی‌دار EC از منابع تری‌کلسیم‌فسفات و فیتات کلسیم شدند، اما هیچکدام از جدایه‌ها از نظر EC تولیدی از کانی فسفات‌خاک، تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. به‌طور کلی با کاهش pH مقدار EC افزایش یافت، که نشان دهنده‌ی انحلال بیشتر فسفر بود. گرچه این افزایش در مواردی از روند خاصی تبعیت نمود که می‌توان آن را به ماهیت انحلال پذیری منبع فسفاتی و سازوکار متفاوت باکتری‌های به‌کار گرفته شده در انحلال فسفات، نسبت داد (Oliveira et al., 2009). در آزمایشی، تلقیح با باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات باعث کاهش pH محلول، فسفر و مقدار EC در محیط شد (Tomer et al., 2017). اگرچه اسیدی شدن محیط، یکی از مکانیسم‌های شناخته‌شده در آزادسازی فسفر معدنی است که در بسیاری از مطالعات انجام شده با انواع ریزموجودات از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها، دیده شده است (Gothwal et al., 2006; Singh & Reddy, 2011). اما با این وجود، کاهش PH حتماً به معنای توانایی بیشتر برای حل فسفر نیست (li et al., 2019). در همین رابطه در حالی که مطالعات کیمی و همکاران (Qimei et al., 2000) ارتباط معنی‌داری بین pH محیط کشت و توانایی حل شدن P را نشان داد، آسا و همکاران (Asea et al., 1988) فقدان همبستگی یا فقط یک ارتباط ضعیف بین pH و انحلال فسفات را گزارش کردند.

جدول ۳: مقایسه میانگین تغییرات اسیدیته (pH) محیط‌های کشت پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

ردیف	جدایه	منابع فسفات		
		تری کلسیم فسفات	فیتات کلسیم	فسفات‌خاک
۱	شاهد	۵/۷۱e	۶/۶۹b	۶/۱۳Cd
۲	Ggd/4	۵/۹۵d	۶/۹۵a	۶/۲۶c
۳	Rpd/4	۵/۵۹ef	۴/۳۱hi	۶/۲۷c
۴	Rpy	۴/۷۲g	۴/۲۹i	۴/۱۲i
۵	Tkd/4	۴/۵۲gh	۵/۴۴f	۳/۳۰j

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

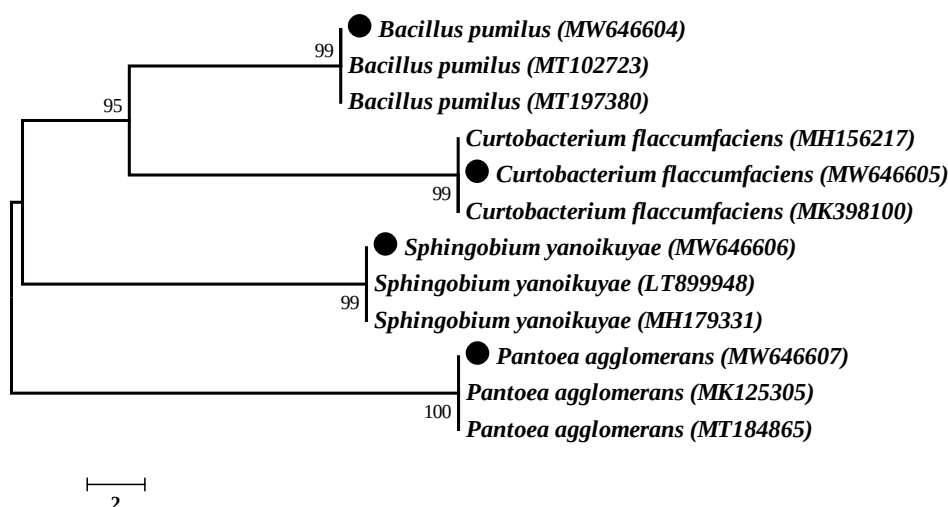
جدول ۴: مقایسه میانگین تغییرات هدایت الکتریکی (EC) محیط‌های کشت بر حسب دسی‌زیمنس بر متر پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در روز هفتم

ردیف	جدایه	منابع فسفات		
		تری کلسیم فسفات	فیتات کلسیم	فسفات خاک
۱	شاهد	۰/۷f	۰/۴۲h	۰/۶۴g
۲	Ggd/4	۰/۷۵de	۰/۷۸d	۰/۶۴g
۳	Rpd/4	۰/۷۴e	۰/۸۸bc	۰/۶۲g
۴	Rpy	۰/۹۷a	۰/۸۶c	۰/۶۴g
۵	Tkd/4	۰/۹۰b	۰/۶۵g	۰/۶۵g

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

توالی نوکلئوتید و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

استفاده از روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی 16S rRNA منجر به شناسایی دقیق‌تر جوامع باکتریایی می‌شود. در این پژوهش، از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA برای شناسایی چهار جدایه باکتری برتر در انحلال فسفات استفاده شد. برای مقایسه توالی‌های 16S rRNA سویه‌ها با توالی‌های موجود، از Blastn پایگاه NCBI استفاده شد و سطح بالایی از همانندی (≥۹۹) برای تعریف همه جدایه‌ها به‌دست آمد. در بسیاری از پژوهش‌ها از روش 16S rRNA برای تعریف باکتری‌های حل‌کننده فسفات استفاده شده است (Weisburg et al., 1991). درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌های 16S rRNA جدایه‌ها نشان داد که ۴ باکتری برتر در ۴ گونه متفاوت متعلق به ۴ جنس دسته‌بندی شدند (شکل ۲). بر این اساس جدایه‌های Rpd/4، Tkd/4، Rpy و Ggd/4 با بیش از ۹۹ درصد مشابهت به‌ترتیب، *Bacillus pumilus*، *Curtobacterium flaccumfaciens*، *Sphingobium yanoikuyae* و *Pantoea agglomerans* با شماره دسترسی‌های به‌ترتیب MW646604، MW646605، MW646606 و MW646607 معرفی شدند.



شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA درخت فیلوژنتیکی به‌وسیله روش neighbor joining ترسیم شده است. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر bootstrap (درصد) را نشان می‌دهند که بر اساس ۱۰۰۰ تکرار است. شماره دسترسی GenBank برای هر باکتری در داخل پرانتز آورده شده است. علامت دایره تیره نشان‌دهنده جدایه‌های باکتریایی شناسایی شده، در این مطالعه است.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق چهار جدایه انتخاب شده از منابع فسفاتی به‌کار رفته، چندین برابر شاهد فسفر آزاد نمودند. جدایه *Bacillus pumilus* Rpy جداسازی شده از معدن اسفوردی یزد، نسبت به جدایه‌های منطقه‌ی جیرود شمشک توانایی بیشتری در انحلال فسفات خاک اسفوردی یزد نشان داد و این فرض را ایجاد نمود که از نظر اکولوژیکی ممکن است سازگاری سویه‌ها در انحلال فسفات خاک زیستگاه خود بیشتر از فسفات خاک غیر زیستگاه خود باشد. هرچند این ادعا نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان دادند معادن فسفاتی ایران زیستگاه‌های خوبی برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات هستند که علاوه بر توانایی انحلال فسفات خاک، توانایی انحلال فسفات‌های دیگر نظیر فیتات کلسیم و تری‌کلسیم‌فسفات را نیز دارند.

منابع

- حیاتی، م.، قلی‌زاده، ع.، فلاح نصرت آباد، ع و رضوانی، م. ۱۳۹۰. تأثیر باکتری *coagulans Bacillus* و منابع مختلف سنگ فسفات بر گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). مجله دانش آب و خاک، ۲۱: ۱۲۷-۱۳۶.
- خوشرو، ب و ساریخانی، م (۱۳۹۶). جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاتی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). ۳۲: ۱۵۵-۱۶۷.

مقدسی، س.ج. (۱۳۹۵). کانی‌شناسی و زمین‌شیمی عناصر خاکی کمیاب نهشته فسفات جیرود در دره شمشک، شمال تهران.

فصلنامه علمی علوم زمین. ۲۶: ۳۱۳-۳۲۴.

پاکنژاد، ح. (۱۳۷۰). اکتشافات تکمیلی کانسار اسفوردی. نقشه‌برداری ایران. ۸۹ صفحه. تهران.

Asea, P.E.A., Kucey, R.M.N. and Stewart, J.W.B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20: 459-464.

Azaroual, S.E., Hazzoumi, Z., Mernissi, N.E., Aasfar, A., Kadmiri, M. and Bouizgarne, B. (2020). Role of inorganic phosphate solubilizing bacilli isolated from moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphorus uptake. *Current Microbiology*, 77: 2391-2404.

Babana, A.H. and Antoun, H. (2006). Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant soil*, 287: 51-58.

Babu, S.V., Triveni, S., Reddy, R.S. and Sathyanarayana, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from maize rhizosperic soils. *Bulletin of Environment Pharmacolgy and Life Science*, 6: 194-200.

Cao, Y., Fu, D., Liu, T., Guo, G. and Hu, Z. (2018). Phosphorus solubilizing and releasing bacteria screening from the rhizosphere in a natural wetland. *Water*, 10: 2. 195.

Goldstein, A.H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. 197-203. ASM Press, Washington, DC.

Gothwal, R.K., Nigam, V.K., Mohan, M.K., Sasmal, D. and Ghosh, P. (2006). Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants. *Indian Journal of Microbiology*, 46: Pp355.

Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R.C. and Saxena, R.K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40: 255-260.

- Gupta, N., Sabat, J., Parida, R. and Kerkatta, D. (2007). Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Botanica Croatica*, 66: 2. 197-204.
- Hamdali, H., Moursalou, K., Tchangbedji, G., Ouhdouch, Y. and Hafidi, M. (2012). Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *African Journal of Biotechnology*, 11: 312-320.
- Haouas, A., El Modafar, C., Douira, A., Ibnsouda-Koraichi, S., Filali-Maltouf, A., Moukhli, A. and Amir, S. (2020). *Alcaligenes aquatilis* GTE53: Phosphate solubilising and bioremediation bacterium isolated from new biotope "phosphate sludge enriched-compost". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28: 371-379.
- Kennedy, A.C. and Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and soil*, 170: 75-86.
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. and Mou, Z. (2019). Characteristics of inorganic phosphate-solubilizing bacteria from the sediments of a eutrophic lake. *International journal of environmental research and public health*, 16: 2141.
- Liu, S. (2019). Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. *Frontiers in microbiology*, 10: 2171.
- Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S. and Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96: 217-224.
- Mendoza-Arroyo, G.E., Chan-Bacab, M.J., Aguila-Ramírez, R.N., Ortega-Morales, B.O., Canché Solís, R.E., Chab-Ruiz, A.O. and Camacho-Chab, J.C. (2020). Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. itcb-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*, 10: 383.
- Mursyida, E., Mubarik, N.R. and Tjahjoleksono, A. (2015). Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing bacteria from the area around the limestone mining in Cirebon quarry. *Research Journal of Microbiology*, 10: 270.
- Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E. and Sá, N.M.H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1782-1787.

- Paul, D. and Sinha, S.N. (2013). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and total heterotrophic bacteria from river water and study of phosphatase activity of phosphate solubilizing bacteria. *Advances in Applied Science Research*, 4: 409-412.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M. and Yarzabal, L.A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2905-2914.
- Perez -Rodriguez, M.M., Piccoli, P., Anzuay, M.S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T. and Cohen, A.C. (2020). Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. *Scientific reports*, 10: 15642.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y. and Lebsky, V.K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock weathering desert plants. I. root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6: 629-642.
- Qimei, L.I.N., Xiaorong, Z., Yanxin, S.U.N. and Jun, Y. (2000). Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems. *Soil and Environmental Sciences*, 9: 34-37.
- Rengel, Z. (1999). *Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications*. CRC Press.
- Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17: 319-339.
- Singh, H. and Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47: 30-34.
- Sperber, J.I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 782-787.
- Stocklin, J. (1968). Structural history and tectonics of Iran: a review. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 52:1229-1258.

- Teng, Z., Chen, Z., Zhang, Q., Yao, Y., Song, M. and Li, M. (2019). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 33976-33987.
- Tomer, S., Suyal, D.C., Shukla, A., Rajwar, J., Yadav, A., Shouche, Y. and Goel, R. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from Western Indian Himalayan soils. *3 Biotech*, 7: 1-5.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Şahin, F. (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 28: 99-108.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173: 697-703.
- Xiao, C.Q., Wu, X.Y. and Chi, R.A. (2015). Dephosphorization of high-phosphorus iron ore using different sources of *Aspergillus Niger* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 2. 518–528.
- Xiao, C., Zhou, Y., Hu, J., Guo, S., Zhou, N. and Chi, R. (2020). Biosolubilization of low-grade rock phosphate by native microbial consortia from phosphate mines: effect of sampling sources and culture media. *Geomicrobiology Journal*, 37: 9. 859-866.
- Xiao, C.Q., Chi, R.A., He, H. and Zhang, W.X. (2009). Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. *Journal of Central South University of Technology*, 16: 581-587.
- Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S. and Ghosh, P. (2015). Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their rock phosphate solubilizing abilities. *Geomicrobiology Journal*, 32: 475-481.
- Zhang, T., Hu, F. and Ma, L. (2019). Phosphate-solubilizing bacteria from safflower rhizosphere and their effect on seedling growth. *Open Life Sciences*, 14: 246-254.

Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate mines and investigation on their soil phosphate solubilization potential

Y. Karami¹, A. Samadi^{2*}, A. Fallah Nosrat Abad³, E. Sepehr⁴, M. Barin⁵

Received: 2020.6.12

Accepted: 2021.3.10

Abstract

This study aimed to isolate and characterize phosphate-solubilizing bacteria from two phosphate mines and to investigate their soil phosphate solubility ability. Eighty-five colonies with different morphologies were isolated and purified using the liquid Sperber culture medium enriched with Yazd' Esphordi soil phosphate (YESP) and a form of diluents series in the Sparber solid culture medium enriched with YESP. Four out of 85 isolates (Rpy: from Esfordi mine and Tkd/4, Ggd/4 & Rpd/4 from Jiroud mine) with the highest amount of dissolved phosphorus in the Sperber liquid medium enriched with YESP as superior isolates were selected. With using 16S rRNA gene sequencing the isolates Tkd/4, Rpd/4, Rpy and Ggd/4 were recognized very closely (more than 99%) to *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Bacillus pumilus*, and *Pantoea agglomerans* genera with access numbers MW646604, MW646605, MW646606 and MW646607 respectively. The multifold release of phosphorus by these isolates compared to the control from three phosphate sources showed that these bacteria can dissolve other phosphate sources.

Keywords: *Calcium phytate, Jiroud phosphate mine, Phosphate soil, Tricalcium phosphate, Yazd Esfordi phosphate mine*

1- PhD Student, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran and research Coach of Soil and Water Research Dept, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran

2- Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*(Corresponding author: a.samadi@urmia.ac.ir)

3- Associate Professor in Soil and Water Research Institute, AREEO, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

5- Assistant Professor, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

تعیین برخی خواص پاداکسایشی عصاره ماکروجلبک سبز *Chaetomorpha antennina* دریای عمان در شرایط آزمایشگاهی (In-vitro)

زهره فتحی کاریزک^۱، علی طاهری^{۲*}

چکیده

امروزه باتوجه به پیشرفت تکنولوژی، شناخت کاربردهای دارویی از فرآورده‌های جلبک‌های دریایی یک امر مهم تلقی می‌شود. بدین منظور، فعالیت پاداکسایشی عصاره‌های آلی مختلف از جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* دریای عمان بررسی شد. برای استخراج عصاره از حلال‌های متانول، کلروفرم، هگزان و دی‌کلرومتان استفاده گردید و به منظور بررسی خواص پاداکسایشی از مهار رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، قدرت کاهشی و فعالیت کلاته‌کنندگی یون آهن استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین ظرفیت پاداکسایشی براساس آزمون DPPH، مربوط به عصاره هگزانی و متانولی (۸۵/۷۲±۱/۶۹ و ۸۵/۴۲±۵/۵۹ درصد)، در آزمون کلاته‌کنندگی عصاره متانولی (۳۲/۵۴±۲/۸۹ درصد) و در آزمون قدرت کاهشی یون آهن بیشترین مقدار مربوط به عصاره متانولی (۰/۲۵۴±۰/۰۱) بود. بنابراین تحقیق حاضر نشان از اثرات بسیار خوب پاداکسایشی ترکیبات متانولی و دی‌کلرومتانی استخراجی از جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داد.

واژه‌های کلیدی: احیاکنندگی، پاداکساینده طبیعی، جلبک سبز، رادیکال آزاد، *Chaetomorpha antennina*

۱- دانشجوی دکتری، گروه شایلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران.

۲- دانشیار، گروه شایلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: taherienator@gmail.com

مقدمه

رادیکال‌های آزاد موجود در محیط یا شکل گرفته در حین متابولیسم مانند رادیکال‌های سوپراکسید ($\text{O}_2^\bullet$) و هیدروکسیل ($\text{HO}^\bullet$) و رادیکال‌های پراکسیل ($\text{HOO}^\bullet$)، قادر به اکسیداسیون نامحدود اجزای متنوع سلولی و آسیب به ساختارهای زیستی هستند. این آسیب‌های سلولی و بافتی منجر به بروز بسیاری از بیماری‌ها مانند تصلب شرائین، سرطان، پارکینسون و آلزایمر می‌گردند (Ozen, 2010). یک راه مؤثر برای حذف رادیکال‌های آزاد استفاده از ترکیبات پاداکساینده برای حفظ سلول‌ها از آسیب رادیکال‌های آزاد است (Nickavar et al, 2008).

در طی سال‌های اخیر، بررسی خواصی مانند اثرات پاداکساینده‌گی جلبک‌ها در پژوهش‌های گوناگون مورد توجه قرار گرفته است و هر ساله مطالعات جدیدتری در این راستا انجام و نتایج ارزنده‌ای حاصل می‌شود (Osuna et al., 2016). جلبک دریایی منبع غنی از مواد مغذی هستند. آنها همچنین منبع مهمی از انواع مختلفی از مواد فعال زیستی، از جمله پلی ساکاریدهای سولفات، رنگیزه‌های کاروتنوئیدی و فلروتانین‌ها، با مزایای بالقوه سلامتی هستند (Corsetto et al., 2020). استفاده از ماکرو جلبک‌های دریایی در تغذیه انسان به دلیل جلوگیری از فعالیت‌های اکسیداسیون و کاهش بیماری‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو مانند فشار خون، بیماری‌های قلبی و عروقی، پیری و تحلیل رفتن سیستم عصبی مورد توجه است (Peñalver et al., 2020). در نتیجه در قالب پتانسیل تجاری می‌تواند نقش قابل توجهی در صنعت پزشکی، تولید مواد غذایی و صنعت آرایشی به عنوان ترکیبات پاداکساینده داشته باشد (Ramdani et al, 2017; Gullón et al., 2020).

گونه‌های جلبکی زیادی در کشور ایران و به خصوص سواحل جنوب کشور از جمله چابهار وجود دارد. این جلبک‌ها که به سه دسته سبز، قهوه‌ای و قرمز تقسیم می‌شوند دارای ظرفیت‌های زیستی ارزشمندی هستند و نیاز به برنامه ریزی مدون برای بهره برداری دارد. جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* با رنگ سبز تیره، عمدتاً در قسمت‌های بالایی و تا حدودی میانی محدوده‌ی بین جزر و مدی روی بسترهای صخره‌ای زندگی می‌کنند. این جلبک‌ها در استان‌های هرمزگان (جزایر لارک، قشم و هرمز) سیستان و بلوچستان (کچو، رمین، چابهار و تنگ) در فصل تابستان پراکنش دارند (قرنجیک و روحانی قادیکلایی، ۱۳۸۹).

مطالعات متعددی روی جلبک‌های دریایی انجام شده است. بررسی فعالیت پاداکسایشی دو گونه جلبک سبز *Chaetomorpha sp* و جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa* توسط سفری و همکاران در سال ۱۳۹۴ انجام شد و تاثیر حلال‌های مختلف در استخراج ترکیبات پاداکسایشی به روش غوطه‌وری و توسط حلال‌های استون، اتانول، متانول در ترکیب با آب (۷۰/۳٪) بررسی شد که نشان دادند عصاره‌های استونی قابلیت بیشتری برای استخراج ترکیبات پاداکساینده و پلی فنول در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. در مطالعه Harb و همکاران (۲۰۲۱) ۱۳ جلبک سواحل برزیل بررسی شد و عصاره متانولی جلبک‌های *Osmundaria obtusiloba* و *Dictyopteris jolyana* بیشترین فعالیت حذف رادیکال آزاد و کلاته‌کنندگی یون فلزی را نشان داد.

با توجه به اهمیت جلبک‌های دریایی، در مطالعه حاضر به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی برون سلولی عصاره‌های آلی جلبک *Chaetomorpha antennina* با روش حذف رادیکال آزاد DPPH، فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو و قدرت کاهندگی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، یک مطالعه میدانی-آزمایشگاهی است و عملیات نمونه‌برداری از جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* (Bory) Kützinger 1847 در منطقه بین جزر و مدی خلیج چابهار، سواحل تنگ با مختصات جغرافیایی ۵۹' ۵۴" (طول) و ۲۱' ۲۵" (عرض) در فصل پاییز سال ۹۶ در هنگام حداکثر جزر، به صورت دستی انجام شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، با آب دریا شستشو داده شدند تا اضافات آن‌ها حذف شود. جلبک سریعاً به آزمایشگاه زیست فناوری آبریان دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل و با آب شیرین شستشو گردید. مقداری از جلبک جهت شناسایی و تأیید گونه با رفرنس اطلس جلبک‌های دریای عمان نگهداری شد و بقیه جلبک‌ها در سایه تا زمان رسیدن به وزن ثابت (۵ الی ۷ روز) بدون تغییر رنگ محسوس خشک شدند. در آخر پس از خشک شدن و پودر کردن توسط آسیاب برقی (Eurostar, AR1100, China)، نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Hwang et al, 2010).

عصاره‌گیری و استخراج

عصاره‌گیری با روش خیساندن پودر خشک شده جلبک در حلال‌های مورد نظر انجام شد. بدین منظور جلبک‌ها توزین و به ظرف مورد نظر منتقل شده و به نسبت ۱:۱۰ وزنی/حجمی به آن حلال اضافه شد. استخراج عصاره‌ها با استفاده از حلال‌های متانول، هگزان، دی‌کلرومتان و کلروفرم به صورت مجزا انجام شد. سپس نمونه‌ها، درون شیکر انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای محیط مورد استخراج قرار گرفتند. استخراج دو بار دیگر با خالی کردن حلال و افزودن حلال جدید تکرار شد. سپس هر سه عصاره مخلوط و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شدند. عمل تبخیر حلال در زیر هود انجام شد. سپس عصاره‌ها برای مصارف بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Lim et al, 2002).

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی

حذف رادیکال آزاد DPPH

به میزان ۰/۱ میلی لیتر محلول دی فنیل پیکریل هیدرازیل DPPH تهیه شده با متانول ۹۵ درصد و ۰/۱ میلی لیتر از محلول نمونه تهیه شده با متانول ۵۰ درصد در یک لوله اپندورف ترکیب گردید و پس از تکان دادن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و درون محفظه تاریک نگهداری شد و سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

جهت کنترل، محلول متانول به جای نمونه اضافه شد. برای شاهد مثبت نیز از محلول اسید آسکوربیک به میزان ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد و میزان فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد عصاره جلبکی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Shimada *et al.*, 1999):

$$\text{DPPH}(\%) = \{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}}\} \times 100$$

A_{sample} جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر و A_{control} جذب محلول DPPH و فاقد نمونه است.

فعالیت کلاته کردن یون آهن

فعالیت کلاته کردن مطابق روش ارائه شده توسط Dinis و همکاران (۱۹۹۴) صورت گرفت. طبق این روش غلظت‌های مختلف عصاره (۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۰/۱ میلی لیتر کلرید آهن مخلوط و محلول مورد نظر ۳ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد و بعد ۰/۲ میلی لیتر فروزین به محلول اضافه و به شدت تکان داده شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. جذب در ۵۶۲ نانومتر سنجش شد. یک کنترل بدون نمونه به شیوه مشابه تهیه شد. برای شاهد مثبت میزان ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر EDTA استفاده شد. فعالیت کلاته کردن با فرمول زیر سنجش گردید (Dinis *et al.*, 1994):

$$\text{درصد مهار یون آهن فرو} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

A_0 جذب کنترل و A_1 جذب عصاره‌ها یا استاندارد را نشان می‌دهد. گروه کنترل حاوی FeCl_2 و فروزین و آب مقطر بود.

تعیین قدرت کاهندگی

یک میلی لیتر فسفات بافر ۰/۲ مولار (پی اچ ۶/۶) با یک میلی لیتر محلول عصاره در غلظت‌های مختلف (۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) ترکیب شد و سپس یک میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس یک میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد یک میلی لیتر از محلول نهایی را با یک میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و ۰/۲ میلی لیتر محلول کلرید آهن ۰/۱ درصد به آن اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه جذب در ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. افزایش میزان جذب نشان دهنده افزایش قدرت کاهندگی است (Oyaizu, 1986). برای شاهد مثبت از اسید آسکوربیک به میزان ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد.

تحلیل آماری

در این مطالعه، اثرات هریک از غلظت‌های حلال‌ها و اثرات کلی تیمارها پس از بررسی نرمال بودن تمامی داده‌ها با آزمون شاپیرووویلک، با آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شدند.

مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Tukey انجام شد. محاسبه و ترسیم نمودارها بوسیله بسته نرم افزار Graphpad-Prism (نسخه ۷) انجام گردید.

نتایج

ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آلی جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* با استفاده از سه روش مهار رادیکال آزاد (DPPH)، قدرت کاهشی و فعالیت کلاته کنندگی یون فلزی در غلظت‌های (۰/۰۰۱-۱ میلی گرم بر میلی لیتر) برای تست کلاته کنندگی و قدرت کاهشی و غلظت (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) برای تست DPPH مورد سنجش قرار گرفت و نتایج زیر حاصل گردید.

قدرت حذف کردن رادیکال آزاد DPPH

با توجه به نتایج، در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر از جلبک *C. antennina*، حلال‌های مختلف اثر معناداری را در میزان مهار DPPH از خود نشان دادند ($P < 0.05$). به طوری که متانول و هگزان بیشترین و کلروفرم کمترین مقدار مهار رادیکال آزاد را داشتند. در غلظت‌های ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر از جلبک *C. antennina*، بین نمونه استاندارد، متانول و هگزان اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). ولی میزان مهار DPPH در حلال‌های نامبرده به طور معنی‌داری بالاتر از حلال‌های دی-کلرومتان و کلروفرم بود ($P < 0.05$). در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، حلال هگزان، بیشترین مقدار مهار DPPH را داشته و اختلاف معنی‌داری را با حلال دی‌کلرومتان و کلروفرم داشته است. در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر از جلبک *C. antennina*، اختلاف معنی‌داری بین نمونه استاندارد و حلال‌های متانول، هگزان و دی‌کلرومتان مشاهده نشد ($P > 0.05$). ولی حلال‌های نامبرده بطور معنی‌داری بالاتر از حلال کلروفرم بودند ($P < 0.05$). در این آزمایش، اسیدآسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و میزان مهار DPPH در تمامی غلظت‌ها، نسبت به سایر عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بوده است (جدول ۱).

جدول ۱: اثر حلال‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *C. antennina* در درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

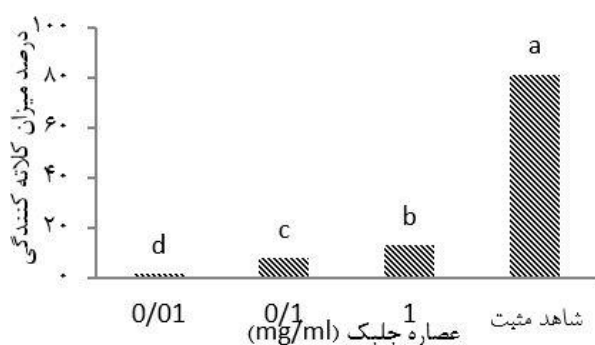
غلظت (Mg/ml)	متانول	هگزان	دی‌کلرومتان	کلروفرم	اسیدآسکوربیک
۰/۱	۸۰±۰/۵۷ ^{Ba}	۷۸/۳±۱/۵۲ ^{Bd}	۶۲±۰/۰۰۰ ^{Cc}	۵۱±۲/۶۴ ^{Dc}	۹۶±۲ ^{Aa}
۰/۳	۸۴/۶۶±۰/۵۳ ^{Aa}	۸۶/۶±۱/۱۵ ^{Ac}	۷۰/۶±۵/۱۹ ^{Bb}	۶۸/۳±۰/۵۷ ^{Bb}	۸۹/۳۴±۷/۵ ^{Ab}
۰/۵	۸۴/۳۳±۲/۸۸ ^{ABa}	۹۳±۱ ^{Ab}	۸۰±۰/۵۷ ^{Bb}	۶۲/۳۰±۰/۵۷ ^{Cb}	۸۹±۶/۹۳ ^{ABb}
۱	۹۳±۲ ^{Aa}	۹۸±۵/۱۹ ^{Aa}	۹۴/۳±۲/۶۴ ^{Aa}	۷۹±۳ ^{Ba}	۹۴±۶/۹۳ ^{Aa}

حروف یکسان بزرگ نشان دهنده عدم تفاوت معناداری در هر ردیف است. حروف یکسان کوچک نشان دهنده عدم معناداری در بین تیمارهای مختلف در هر ستون است ($P < 0.05$).

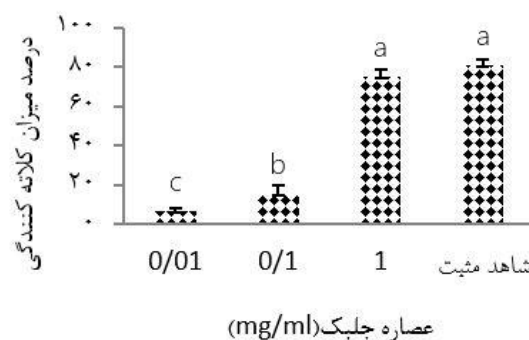
با توجه به جدول ۱، اثر محلول‌های مختلف در غلظت‌های بالاتر از جلبک *C. antennina*، مقادیر بالاتری از فاکتور حذف DPPH را نشان دادند. اختلاف معنی‌داری در غلظت ۱ و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر با یکدیگر و با سایر غلظت‌های تیمارهای مختلف مشاهده شد ($p<0.05$). همچنین، اگرچه با افزایش غلظت در حلال متانول، مقادیر DPPH، نیز افزایش پیدا کرده ولی تفاوت آماری در بین غلظت‌های مختلف این حلال مشاهده نشد ($p>0.05$).

فعالیت کلاته کردن یون آهن

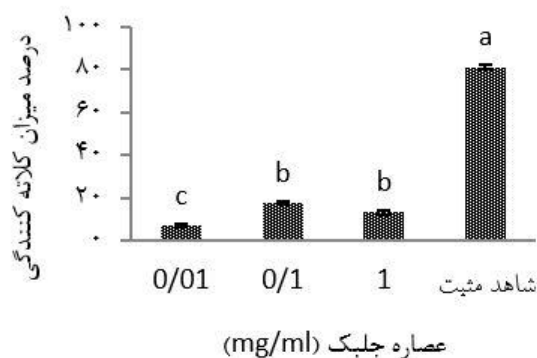
بر اساس داده‌های حاصل از سنجش ظرفیت پاداکسپاندگی با استفاده از تست فعالیت کلاته کنندگی یون آهن در مورد عصاره‌های مختلف جلبک *C. antennina*، بالاترین مقدار کلاته کنندگی مربوط به عصاره متانولی با ۷۵/۳۷٪ (در غلظت ۱mg/ml) و پایین‌ترین مقدار کلاته کنندگی مربوط به عصاره هگزان با ۱۲/۸mg/ml درصد گزارش شد. فعالیت کلاته کنندگی تمامی عصاره‌های جلبک *C. antennina* اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مورد آزمون نشان داد و بجز در عصاره متانول، تمامی عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری را با استاندارد نشان دادند ($p<0.05$). غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تمامی عصاره‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها، فعالیت کلاته کنندگی بالاتری را نشان داد ($p<0.05$). از سوی دیگر، در حلال کلروفرم اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر، مشاهده نشد ($p>0.05$). در این آزمایش، EDTA به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و میزان کلاته کردن فلزات در تمامی غلظت‌ها ۸۱/۲ درصد گزارش شده که نسبت به تمام عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بوده است. نمودارهای (۱ الف) تا (۱ د)، میزان کلاته‌کنندگی یون آهن توسط عصاره‌های حاصل از جلبک *C. antennina* و مقایسه آن با نمونه استاندارد را نشان می‌دهد.



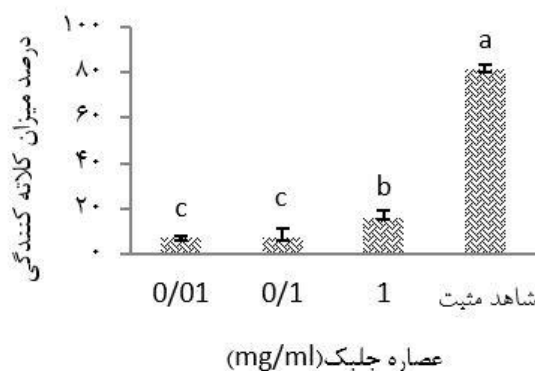
ب



الف



د



ج

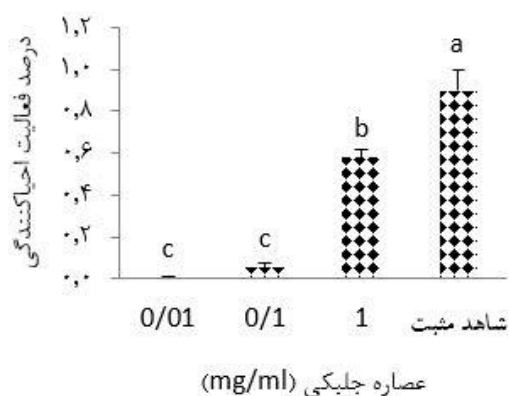
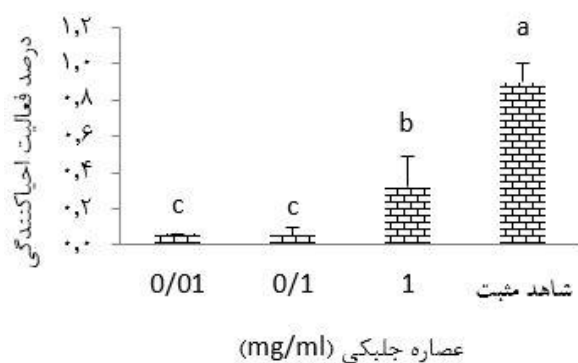
نمودار ۱: درصد کلانه کیندگی یون آهن عصاره‌های جلبک *C. antennina*. متانولی (الف)، هگزانی (ب)، دی کلرومتان (ج)،

کلروفرم (د)

فعالیت احیاکنندگی

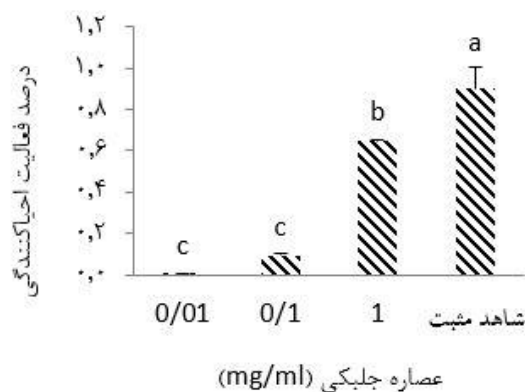
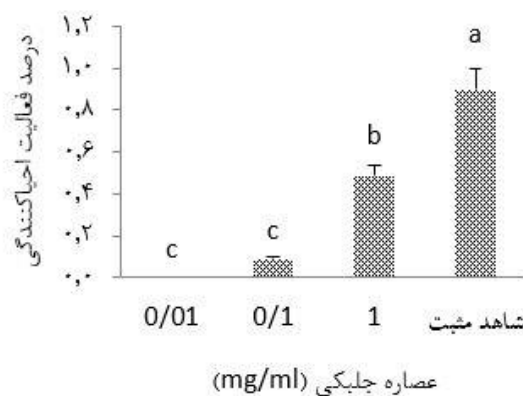
بر اساس داده‌های حاصل از سنجش ظرفیت پاداکسایشی با استفاده از تست فعالیت احیاکنندگی در مورد عصاره‌های مختلف جلبک *C. antennina*، بالاترین مقدار کلانه کیندگی مربوط به عصاره متانولی با ۰/۵۸ (در غلظت ۱ mg/ml) و پایین‌ترین فعالیت احیاکنندگی مربوط به عصاره هگزانی با ۰/۳۲ گزارش شد. فعالیت احیاکنندگی تمامی عصاره‌های جلبک *C. antennina* اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مورد آزمون نشان داد و تمامی عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری را با استاندارد نشان دادند ($p < 0.05$). غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر تمامی عصاره‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها، فعالیت احیاکنندگی بالاتری را نشان داد ($p < 0.05$). از سوی دیگر، در تمامی عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر، مشاهده نشد ($p > 0.05$). بنابراین، با افزایش غلظت عصاره‌ها از ۰/۱ به ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، میزان جذب نمونه‌ها و فعالیت احیاکنندگی آن‌ها نیز

افزایش یافت. در این آزمایش، اسیدآسکوربیک به عنوان نمونه استاندارد در نظر گرفته شد و میزان فعالیت احیاکنندگی در تمامی غلظت‌ها ۰/۹ گزارش شده که نسبت به تمام عصاره‌های مورد مطالعه بیشتر بوده است. نمودارهای (۲ الف) تا (۲ د)، میزان فعالیت احیاکنندگی توسط عصاره‌های حاصل از جلبک *C. antennina*، و مقایسه آن با نمونه استاندارد نشان می‌دهد.



ب

الف



د

ج

نمودار ۲: مقدار فعالیت احیاکنندگی عصاره‌های آلی جلبک *C. antennina*: عصاره متانولی (الف)، هگزانی (ب)، دی کلرومتان (ج) و کلروفرمی (د)

بحث

در تحقیق حاضر خواص آنتی اکسیدانی جلبک سبز *Chaetomorpha antennina* به صورت برون سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی عصاره‌های آلی مورد بررسی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی با درجات متفاوت بودند. در مطالعه حذف رادیکال ازاد DPPH، عصاره های متانولی و هگزانی بهترین فعالیت را نشان دادند. بهترین فعالیت

کلاته کنندگی یون فلزی در عصاره متانولی و بهترین فعالیت احیا کنندگی در عصاره های متانولی و دی کلرومتانی دیده شد. مطالعات نشان داده است که ترکیب شیمیایی عصاره ها و خواص زیست فعال آن وابسته به نوع حلال ها، قطبیت، زمان و درجه حرارت عصاره گیری است (Yuan & Walsh, 2006). رادیکال DPPH، یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیا شدن و تولید مولکول پایدار DPPH از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می دهد (Singh et al, 2008). با توجه به نتایج، در جلبک *C. antennina*، متانول و هگزان بالاترین فعالیت حذف رادیکال DPPH را داشته است. این مسئله با نتایج برخی محققین دیگر مطابقت داشت از جمله، در مطالعه Al-Amoudi (۲۰۰۹)، روی سه نوع جلبک *Ulva lactuca*، *Sargassum crassifolia* و *Digenea simplex*، در مطالعه ی Shanmuga Rajan و Bhat (۲۰۱۵)، Hassan Sultan و همکاران (۲۰۱۶)، Ramdani و همکاران (۲۰۱۷)، روی جلبک *Gracilaria*، Raja و همکاران (۲۰۲۰) روی جلبک *Halimeda opuntia* و Hmani و همکاران (۲۰۲۱) روی جلبک *Hypnea musciformis*، فعالیت پاداکسایشی عصاره های متانولی دارای بیشترین قدرت در مهار رادیکال آزاد DPPH بودند. مطالعه Harb و همکاران (۲۰۲۱)، بهترین فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH در عصاره متانولی و آبی جلبک *Osmundaria obtusiloba* به ترتیب به میزان ۴/۱ و ۴/۰۹ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره دیده شد. حلال های قطبی مانند متانول باعث استخراج کارآمد ترکیبات فعال زیستی مثل ترکیبات فنلی، پلی ساکاریدهای سولفاته، ساپونین، گلیکوزیدها و اسیدهای ارگانیک می شوند و روشی کارآمد برای استخراج ترکیبات فعال زیستی قطبی است که خواص گوناگونی از جمله خواص آنتی اکسیدانی دارند (Araújo et al., 2020). البته گزارش های دیگری نیز از خواص بالای حذف رادیکال آزاد DPPH توسط سایر عصاره های کمتر قطبی وجود دارد. برای مثال در مطالعه Chakraborty و همکاران (۲۰۱۷) عصاره اتیل استاتی *Anthophycus longifolius* با IC_{50} ۱/۲۳ بیشترین فعالیت را نشان داد و وجود مقادیر بالای ترکیبات فنلی در این عصاره را عامل فعالیت آنتی اکسیدانی بالا دانستند.

در مطالعه حاضر، اثر عصاره های مختلف در غلظت های بیشتر جلبک *C. antennina*، مقادیر بالاتری از فاکتور حذف DPPH را نشان دادند که با مطالعه Taheri و همکاران (۲۰۱۷a)، روی جلبک *Cystoseira trinodis*، Agregan و همکاران (۲۰۱۷)، Bhuyar و همکاران (۲۰۲۰)، روی جلبک قرمز *Kappaphycus alvarezii* مطابقت داشت. به طور کل با افزایش غلظت به دلیل وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتر و در نتیجه افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می یابد (Sanchez-Moreno, 2002). در این مطالعه حلال متانول و هگزان بیشترین درصد حذف رادیکال آزاد را دارا بوده و این یافته می تواند در مطالعات تکمیلی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات یکی از مکانسیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که باعث کاهش فعل و انفعالات انتقال فلز در پراکسیداسیون چربی می‌شود. در میان عناصر واسطه، آهن به دلیل واکنش پذیری بالای خود، مهم‌ترین عنصر در اکسیداسیون چربی شناخته می‌شود (Mohsin et al, 2016). در این مطالعه، بالاترین مقدار کلاته‌کنندگی مربوط به عصاره متانولی با ۷۵/۳۷٪ (در غلظت ۱ mg/ml) و کمترین مقدار کلاته‌کنندگی مربوط به عصاره هگزان با ۱۲/۸ mg/ml درصد گزارش شد. یافته‌های تحقیق حاضر با مطالعه Sathya و همکاران (۲۰۱۳)، در سنجش میزان کلاته‌کنندگی مستخرج از جلبک *Cystoseria trinodis* که نشان داد عصاره متانولی این جلبک و تمامی ترکیبات زیر مجموعه آن دارای بیشترین میزان کلاته‌کنندگی بودند، مطابقت داشت. همچنین در مطالعه Harb و همکاران (۲۰۲۱) بیشترین فعالیت کلاته‌کنندگی عصاره متانولی جلبک *Dictyopteris jolyana* به میزان ۱۰/۸۰ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شد. اما در جلبک *Osmundaria obtusiloba* عصاره آبی بیشترین فعالیت کلاته‌کنندگی به میزان ۱۶/۷۹ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره داشت. این محققین عنوان کردند متابولیت های با خاصیت قطبی در عصاره های متانولی و آبی اصلی ترین عوامل پاداکسایندگی این جلبک ها هستند. در تحقیق Chakraborty و همکاران (۲۰۱۷) نتایج متفاوت بود و عصاره اتیل استاتی *Sargassum plagiophyllum* با IC_{50} برابر ۰/۲۲ بیشترین فعالیت کلاته‌کنندگی را نشان داد که از نظر قطبیت حلال ضعیفی است.

کلاته کردن یون فلزی می‌تواند مانع از تشکیل اکسیدان‌ها شود و سطوح اکسیداسیون لیپیدها را کاهش دهد. کلاته‌کنندگی یون آهن به تعداد هیدروکسیل وابسته است که با جایگزینی هیدروکسیل در جایگاه ارتو عمل کلاته‌کنندگی یون آهن صورت می‌پذیرد. عوامل کلاته‌کننده به عنوان پاداکسایندگی‌های ثانویه هستند، زیرا می‌توانند پتانسیل احیا را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی شوند (Gordon, 1990). یون‌های فلزی واسطه دو ظرفیتی، نقش مهمی به عنوان کاتالیزور فرآیندهای اکسیداتیو بازی می‌کنند و همین‌طور منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش تجزیه هیدروژن پراکسید از طریق واکنش فنتون می‌شوند. شناساگر این واکنش فروزین نام دارد که با آهن II موجود در محیط، کمپلکس قرمز رنگی تشکیل می‌دهد. غلظت آهن محیط در حضور عوامل کلاته‌کننده کاهش می‌یابد و رنگ قرمز کمپلکس آهن-فروزین کم می‌شود (Halliwell, 1996). از سوی دیگر، نتایج نشان داد که اثر محلول‌های مختلف در غلظت‌های بیشتر عصاره جلبک *C. antennina*، مقادیر بالاتری از عوامل کلاته‌کنندگی فلزات را نشان دادند. در مطالعه Al Harthi (۲۰۱۵) نیز گزارش شده که نتایج کلاته‌کنندگی و پاداکسایشی عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده است. با توجه به نتایج با افزایش میزان غلظت عصاره جلبک‌ها، فعالیت کلاته‌کنندگی یون فلزی افزایش نشان داد. این نتایج با نتایج بسیاری از محققین از جمله سفری و همکاران (۱۳۹۴) که بر روی تاثیر حلال های مختلف در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی دو گونه جلبک سبز *Chaetomorpha sp* و جلبک قهوه ای

Colpomenia sinuosa و طاهری و همکاران (۱۳۹۷) که به بررسی خواص پاداکسایشی عصاره جلبک *Colpomenia sinuosa* پرداخته اند، مطابقت داشت.

آزمون فعالیت پاداکساینده گی احیاء آهن، روشی است که به طور مستقیم پاداکساینده ها و یا احیاء کننده ها را در نمونه ها اندازه گیری می کند و رابطه خطی با غلظت پاداکساینده گی آن ها دارد (Prior et al, 2005). حضور عوامل احیاء کننده در محلول واکنش سبب کاهش کمپلکس فری سیانید / یون ۳ ظرفیتی آهن و تبدیل آن به فرم فروس می شود. در این روش سنجش فعالیت های پاداکسایشی بر اساس جذب صورت می گیرد افزایش در جذب مخلوط واکنش بیانگر افزایش فعالیت پاداکساینده گی است و بدون واحد اندازه گیری (Ruperez, 2001). بر اساس داده های حاصل از سنجش با استفاده از تست فعالیت احیاء کننده گی در مورد عصاره های مختلف جلبک *C. antennina*، بالاترین مقدار احیاء کننده گی مربوط به عصاره متانولی با جذب ۰/۵۸ (در غلظت ۱ mg/ml) و کمترین فعالیت احیاء کننده گی مربوط به عصاره هگزان با جذب ۰/۳۲ گزارش شد. در تحقیق Taheri و همکاران (۲۰۱۷b)، بر روی جلبک *Halimeda tuna* نیز بالاترین میزان احیاء کننده گی مربوط به عصاره متانولی (غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) بود. نتایج به دست آمده در هماهنگی با تحقیق حاضر بوده که نشان می دهد میزان غلظت و محلول استخراجی بر تعیین قدرت احیاء کننده گی اثر مستقیم دارد. در مطالعه Vlasisavljević و همکاران نیز (۲۰۲۰) عصاره اتانولی جلبک *Ecklonia bicyclis* بیشترین فعالیت کاهشی را نشان داد. در مطالعه Harb و همکاران (۲۰۲۱) عصاره متانولی *D. jolyana* و عصاره آبی *O. obtusiloba* بیشترین فعالیت کاهشی را نشان دادند. لذا در هر گونه جلبک نوع ترکیبات فعال با خاصیت کاهنده گی می تواند در حلال های با درجات متفاوت قطبیت استخراج شود و در مطالعه حاضر عصاره متانولی با بالاترین قطبیت بهترین خاصیت کاهنده گی را نشان داد.

در نتیجه گیری می توان گفت که بیشترین فعالیت پاداکساینده گی جلبک سبز *C. antennina* در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به حلال متانول و دی کلرومتان بود و کمترین میزان آن مربوط به تیمار هگزان ثبت گردید. فعالیت پاداکساینده گی بر پایه شکستن زنجیره رادیکال آزاد به وسیله اهداء اتم هیدروژن است و عصاره های جلبکی با پیش سازهای خاصی از رادیکال پراکسید جلوگیری می کنند. بر اساس یافته ها عصاره جلبک مورد مطالعه می تواند آنتی اکسیدان نوع یک باشد و به طور مستقیم و با کیفیت بسیار خوب فعالیت حذف رادیکال آزاد را داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به جهت حمایت در قالب طرح شماره ۱۱/۹۰۷۴۷ و دانشگاه

دریائوردی و علوم دریایی چابهار به جهت حمایت از انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

- سفری، پ.، رضایی، م.، شوپک لو، ا.ر. و باباخانی لشکان، آ. (۱۳۹۴). بهینه سازی استخراج عصاره آنتی اکسیدانی از جلبک دریایی (*Chaetomorpha* sp) خلیج فارس با کمک مایکروویو و اولتراسوند و با استفاده از روش پاسخ سطح. شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۴۸(۴): ۵۷۵-۵۵۵.
- طاهری، ع. و مرادی، س. (۱۳۹۷). بررسی خواص پاداکسایشی عصاره آلی جلبک دریایی *Colpomenia sinousa*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۸(۱۶۰): ۱۵۵-۱۵۱.
- قرنجیک، ب. م. و روحانی قادیکلانی، ک. (۱۳۸۹). اطلس جلبک های سواحل خلیج فارس و دریای عمان. موسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. ۱۷۸ صفحه.
- Agregan, R., Munekata, E.P., Dumingouez, R., Carbello, J., Franco, D. and Lorenzo, M.J. (2017). Proximate composition, phenolic contents and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcate* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative of canola oil under accelerated storage conditions. Food Research International, 99(3): 986-994.
- Al Harthi, S.S., Mavazhe, A., Al Mahroqi, H. and Khan, S.A. (2015). Quantification of phenolic compounds, evaluation of physicochemical properties and antioxidant activity of four date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Oman. Journal of Taibah University Sciences, 10(3): 346-352.
- Al-Amoudi, O.A., Mutawie, H.H., Patel, A.V. and Blunden, G., (2009). Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae. Saudi Journal of Biological Sciences, 16: 23-29.
- Araújo, P.G., Nardelli, A.E., Fujii, M.T. and Chow, F. (2020). Antioxidant properties of different strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) farmed on the Brazilian coast. Phycologia, 59(3): 272-279.
- Bhuyar, p., Rahim, M.H., Sundararaju, S., Maniam, G.P. and Govindan, N. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. Global Journal of Environmental Science and Management, 6(1): 47-58.
- Chakraborty, K., Maneesh, A. and Makkar, F. (2017). Antioxidant activity of brown seaweeds. Journal of Aquatic Food Product Technology, 26(4): 406-419.

- Corsetto, P.A., Montorfano, G., Zava, S., Colombo, I., Ingadottir, B., Jonsdottir, R., Sveinsdottir, K. and Rizzo, A. (2020). Characterization of Antioxidant Potential of Seaweed Extracts for Enrichment of Convenience Food. *Antioxidants*, 9(249):1-15.
- Costa, J.A.V. and De Morais, M.G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource technology*, 102(1): 2-9.
- Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.A. and Câmara, R.B.G. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedical Pharmacotherapy*, 64(1): 21-28.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315:161-169.
- Gordon M.H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In: Hudson, B.J.F., Ed., *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science; 1-18.
- Gullón, B., Gagaoua, M., Barba, F.J., Gullón, P., Zhang, W. and Lorenzo, J.M. (2020). Seaweeds as promising resource of bioactive compounds: overview of novel extraction strategies and design of tailored meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 100:1–18.
- Halliwell B. (1996). Antioxidants: the basics- what they are and how to evaluate them. *Advance pharmacology*, 38: 3-20.
- Harb, T.B., Pereira, M.S., Cavalcanti, M.I.L.G., Fujii, M.T. and Chow, F. (2021). Antioxidant activity and related chemical composition of extracts from Brazilian beach-cast marine algae: opportunities of turning a waste into a resource. *Journal of Applied Phycology*, 1-9.
- Hassan Sultan, T., Noroozi, M. and Amoozegar, M.A. (2016). A survey on total carotenoids, chlorophyll a and b and also antioxidant activity of derived from four strain of green alga isolated from the Golestan coasts, (Caspian Sea). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 6(24): 31-36.
- Hmani, I., Ktari, L., Ismail, A., M'dallel, C. and El Bour, M. (2021). Assessment of the antioxidant and antibacterial properties of red algae (Rhodophyta) from the north coast of Tunisia. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6(13): 1-9.

- Lim, S.N., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C. and Ang, P.O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3862-3866.
- Mohsin, S., Mahadevan, R., Sumayya, A.S. and Kurup, G.M. (2016). Bifunctional effect of fucoidan from *Padina tetrastrum* against human pathogenic microbes and free radicals. Journal of Medicinal Herb, 2:1-10 .
- Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. (2010). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 7(3): 203-209 .
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C.M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M. and Hurtado-Oliva, M.A. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. Pharmaceutical Biology, 54(10): 2196-2210.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44(6): 307-315.
- Ozen, T. (2010). Antioxidant activity of wild edible plants in the black sea region of Turkey. Grasas Y Aceites, 61(1): 86-94.
- Hwang, P.A., Wu, C.H., Gau, S.U. and Chien, H.Y. (2010). Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from *Sargassum hemiphyllum*. Journal of Marine Science and Technology, 18: 41-46.
- Peñalver, R., Lorenzo, J.M., Ros, G., Amarowicz, R., Pateiro, M. and Nieto, G. (2020). Seaweeds as a functional ingredient for a healthy diet. Marine Drugs, 18:301.
- Prasad, B., Vadakedath, N., Jeong, H.J., General, T., Cho, M.G., Lein, W. (2014). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of haptophytes (*Isochrysis* species). Applied Microbiology Biotechnology, 98: 8629-8639.
- Prior, R.L. Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of Antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural Food Chemistry, 53:4290-302.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Sridhar, S., Alagarsamy, A., Ganesan, V., Elumalai, S. and Carvalho, I.S. (2020) Evaluation of proximate composition, antioxidant properties, and phylogenetic analysis of two edible seaweeds. Smart Science, 8(3): 95-100.

- Ramdani, M., Elasri, Q., Saidi, N., Elkhiaiti, N., aybi, F., Mostareh, M., Zaraali O. and Haloui, B. (2017). Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. Chemical and Biological Technology of Agriculture, 4:28.
- Ruperez, P. (2001). Antioxidant activity of sulphated polysaccharides from the Spanish marine seaweed Nori. In: Proceedings of the COST 916 European Conference on Bioactive Compounds in Plant Foods. Health Effects and Perspectives for the Food Industry, Tenerife, Canary Islands, Spain.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International, 8: 121-37.
- Sathya, R., Kanaga, N., Sankar, P. and Jeeva, S. (2013). Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoscira trinodis* (Forsska" I) C. Agardh Arabian Journal of Chemistry, 1-7.
- Shanmuga Rajan, N. and Bhat, R. (2015). Antioxidant compounds and antioxidant activities in unripe and ripe kundang fruits (*Bouea macrophylla* Griffith). Fruits, 71(1): 41-47.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 40(6): 945-948.
- Singh, A., Nigam, P.S. and Murphy, J.D. (2008). Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. Bioresource technology, 102(1): 10-16.
- Sumathi, S. and Krishnavenim, M. (2012). Preliminary Screening, antioxidant and antimicrobial potential of *Chaetomorpha antennina* and *Caulerpa scalpelliformis* in vitro study. International Journal of environmental sciences, 2(3): 2312-2320.
- Taheri, A., Ghaffari, M., Bagherpour, N.S. and Attaran Fariman, G. (2017a). Evaluation of Antioxidant Activity of Extracts of Marine Algae *Halimeda tuna* Collected from the Chabahar Bay. Qom University Medical Science Journal, 11(5): 107-115.
- Taheri, A., Ghaffari, M., Bagherpour, N.S. and Attaran Fariman, G. (2017b). Study the Antioxiative Properties of the Marine Algae *Cystoseira trinodis* extracts from Chabahar Coastal Water. Journal of Shahid Sadoughi University, 25(8): 658-669.

Utkina, N.K. and Krasokhin, V.B. (2010). Terahydroisoquinoline alkaloid N-ethylnorsalsolinol from the Australian marine sponge *Xestospongia* SP. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(4): 715-716.

Vlaisavljević, S., Rašeta, M., Berežni, S., Passamonti, S. and Tramer, F. (2021): Four selected commercial seaweeds: biologically active compounds, antioxidant and cytotoxic properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-11.

Yuan, Y.V. and Walsh, N.A. (2006). Antioxidative and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chemical Toxicology*, 44: 1144-1150.

Determination of some In-vitro antioxidant properties of *Chaetomorpha antennina* green macro-algae extract of Oman Sea

Z. Fathi Karizak¹, A. Taheri^{2*}

Received:2021.3.23

Accepted:2021.7.19

Abstract

Nowadays, due to the advancement of technology, understanding the medicinal applications of seaweed products is an important issue. For this purpose, the antioxidant activity of different organic extracts from *Chaetomorpha antennina* green algae of the Oman Sea was investigated. Methanol, chloroform, hexane, and dichloromethane used for extraction and diphenyl picrylhydrazyl free radical (DPPH) scavenging, iron ion chelation, and reduction power were used to investigate antioxidant properties. The results showed that the highest antioxidant capacity based on the DPPH test was related to hexane and methanolic extract (85.72 ± 1.69 and $85.42 \pm 5.59\%$), in chelating activity test, methanolic extract ($32.54 \pm 2.89\%$) and reduction power test methanolic extract ($0.254 \pm 0.01\text{Å}$) had the maximum amount. Therefore, the present study showed the very good antioxidant effects of methanolic and dichloromethane compounds extracted from *Chaetomorpha antennina* green algae at a concentration of 1 mg/ml.

Keywords: *Chaetomorpha antennina*, Free Radical, Green algae, Natural antioxidant, Reduction power

1- Ph.D. student, Fisheries Department, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Iran

2- Associate Prof., Fisheries Department, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Iran

*(Corresponding author: taherienator@gmail.com)

الگوهای انتشار گیاهان معرفی شده به ایران

احمدرضا محرابیان^{۱*}، فرزانه خواجه‌نویی نسب^۲، سیاوش نقی‌زاده^۳، لاله ملک محمدی^۴

چکیده

در طی سال‌های گذشته، گونه‌های متعددی به کشور ایران معرفی شده است که اطلاعات مدونی پیرامون آن‌ها وجود ندارد. به واسطه فقدان بانک اطلاعات اکولوژی-جغرافیایی پیرامون گونه‌های بیگانه و معرفی شده به ایران انجام یک مطالعه جهت تدوین و تحلیل اطلاعات آن‌ها جهت برنامه‌ریزی‌های مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه پایگاه اطلاعاتی مربوط به تاکسون‌های گیاهی معرفی شده به ایران با استفاده از داده‌های حاصل از مطالعات میدانی و بررسی منابع موجود تهیه گردید. نقشه‌های انتشار با استفاده از نرم افزار Arc-GIS رسم گردید. همچنین با استفاده از خانه‌گریدهای $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ نقشه‌های غنای گونه‌ای رسم شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ۲۷ گونه معرفی شده شاخص در ایران یافت می‌شود و پروانس جغرافیایی هیرکانی از غنای بالاتری برخوردار است. این مطالعه ضمن معرفی اولویت‌های مدیریتی گونه‌های معرفی شده راهکارهای کلی جهت مدیریت اکولوژیکی آن‌ها را معرفی نموده است تا بتواند به عنوان منبع علمی پایه جهت برنامه‌های مدیریت تنوع زیستی ایران به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: جغرافیای گیاهی، جنوب غرب آسیا، گیاهان بیگانه، گیاهان مهاجم

۱- استادیار، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول: a_mehrabian@sbu.ac.ir)

۲- دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- دانشجوی دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- دانشجوی دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

مقدمه

تاکسون‌های معرفی شده (Introduced)، بیگانه (Alien) و غیربومی (Exotic) گونه‌هایی را دربر می‌گیرند که فراتر از دامنه زیستگاه طبیعی خود انتشار دارند و معمولاً بر اثر فعالیت‌های انسانی یا وقایع تصادفی در زیستگاه‌های جدید گسترش یافته‌اند. جابجایی‌های گیاهان و جانوران جزئی جدایی‌ناپذیر از توسعه تاریخی و اجتماعی تمدن‌های بشری محسوب می‌گردد (Castri, 1989). بسیاری از گونه‌های بیگانه و غیربومی به عنوان گونه‌های کاشته شده (کشاورزی و باغی، زینتی، صنعتی و دارویی) به مناطق مختلف جهان معرفی شده‌اند و تحت کنترل قرار دارند و فاقد اثرات منفی بر زیستگاه‌های معرفی شده هستند (Pimentel *et al.*, 2000). اما در موارد متعدد، این انتقالات سبب معرفی گونه‌هایی می‌شود که می‌تواند تهدید تاکسون‌های طبیعی و اختلال در توازن اکوسیستم را در پی داشته باشد (Brunel, 2011). هنگامی که گونه‌ها یا جمعیت‌های متمایز ژنتیکی در منطقه‌ای فاقد سابقه پراکنش تاریخی آن گونه با شکستن موانع زیست‌جغرافیایی به شدت انتشار یابند، فرایند تهاجم رخ می‌دهد. این در حالی است که بسیاری از گونه‌های بومی نیز با تغییرات اکوسیستمی اعم از تغییرات اقلیمی، چرای بی‌رویه دام، تغییرات کاربری اراضی و ایجاد آشفته‌گی در زیستگاه بر سایر گونه‌های هم‌بوم خود غلبه نموده و به عنوان گونه‌های مهاجم در زیستگاه چیره می‌گردند (Myers & Bazely 2003). البته برخی از گونه‌های غیربومی نیز پس از سال‌ها ویژگی‌های تهاجمی را نمایان می‌سازند که به زمان تأخیر مشهور است (Hughes, 1994). گونه‌ها پس از ورود (معرفی) به زیستگاه‌های جدید سه شیوه متفاوت را به نمایش می‌گذارند: گروه اول توانایی سازگاری با زیستگاه جدید را ندارند و از بین می‌روند. گروه دوم پس از ورود به زیستگاه جدید مستقر می‌شوند اما تأثیرات شاخصی بر زیست‌بوم جدید نمی‌گذارند. گروه سوم پس از استقرار تأثیرات شاخص و چشم‌گیری بر بوم‌سازگان‌های طبیعی اعمال می‌کنند و مهاجم می‌شوند (Clout & Williams, 2009). تهاجم گونه‌های غیربومی یا بیگانه ناشی از تخریب زیستگاه‌ها، پس از تغییرات کلان اقلیمی دومین عامل اصلی از دست رفتن تنوع زیستی جهانی به حساب می‌آید (Walker & Stepfen, 1997). سالیانه در سراسر جهان میلیاردها دلار جهت کنترل علف‌های هرز، آفات و انگل‌هایی که غالباً به تازگی معرفی شده‌اند (Neophyte)، صرف می‌گردد (Pimentel *et al.*, 2000). از چالش‌های مهم این گروه، عدم تفکیک ارزیابی خطر (Risk assessment) و ارزیابی اثر (Impact evaluation) گونه‌های مهاجم است. در ارزیابی ریسک ویژگی‌های گونه در دامنه انتشار طبیعی آن بررسی می‌گردد تا تهدیدات آن را در دامنه انتشار بالقوه (رویشگاه‌های معرفی شده) ارزیابی نماید. این در حالی است که ارزیابی اثرات برای تأثیرات گونه‌های معرفی شده فعلی در زیستگاه جدید (ثانویه) بکار گرفته می‌شود (Durigan *et al.*, 2013). در حال حاضر گونه‌های گیاهی متعددی با دخالت‌های انسانی دامنه زیستگاه خود را گسترش داده‌اند. امروزه تعدادی از گونه‌های معرفی شده، آفات محصولات زراعی و کشاورزی بوده و تهدیدی جدی علیه اقتصاد کشاورزی محسوب می‌شوند (Dunbar & Facelli, 1999). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که گونه‌های مهاجم عمدتاً دنباله‌رو تغییرات مستقیمی چون زیستگاه‌های تغییر یافته هستند (Didham *et al.*, 2005). این پدیده سبب شده که بسیاری از گونه‌های معرفی شده با

گسترش زیاد به گونه مهاجم تبدیل شده و رویشگاه‌های طبیعی را تحت سیطره خود درآوردند که خود این تغییرات فشارهای مضاعفی بر رویشگاه‌ها وارد می‌نماید و با تغییر ترکیب جوامع زیستی اکوسیستم‌های طبیعی، تغییرات گسترده‌ای را بر این زیستگاه‌ها تحمیل می‌نماید (Pimental et al., 2000). دلایل زیر از جمله مهم‌ترین عوامل موفقیت گونه‌های معرفی‌شده در صورت تبدیل آن‌ها به گونه‌های مهاجم هستند: مقاومت به خشک‌سالی و تنش‌های دمایی، مقاومت در برابر آتش‌سوزی، قدرت انتشار زیاد بذر، تولیدمثل رویشی گسترده، ریشه‌های عمیق، تاثیرات آلوپاتیک و رقابت شیمیایی بالا، سازگاری به زیستگاه‌های متنوع، تنوع ژنتیکی بالا، تکامل سریع و مقاومت در برابر روش‌های کنترل شیمیایی (Cox 2004). این سازگاری‌ها در بسیاری از موارد شرایط را برای تهاجم آن‌ها فراهم می‌نماید. برخی از مهم‌ترین تاثیرات گونه‌های معرفی‌شده مهاجم بر طبیعت عبارتند از اقتصادی، اکولوژیکی و بهداشتی که برخی از مصادیق آن‌ها شامل کاهش مناطق چرای دام با ایجاد مراتعی با گونه‌های غیرخوش-خوراک، خاردار و سمی و کاهش محصولات کشاورزی، کاهش تنوع زیستی، آشفستگی جریان‌ات آبی، مسموم کردن دام‌های اهلی و تشکیل بیشه‌زارهای نفوذناپذیر (به‌دلیل حضور گونه‌های خاردار مهاجم) است. این در حالی است که بخش عمده محصولات کشاورزی و گونه‌های اهلی از شیوه معرفی به زیستگاه‌های جدید در مناطق مختلف دنیا کشت گردیده‌اند (Pimentel et al., 2000). ثبت داده‌های گونه‌های بیگانه و تهاجمات زیستی به‌عنوان نقطه شروع طرح‌های مدیریتی است (Wittenberg & Cock, 2001). تهیه فهرست اطلاعات اکولوژیک گونه‌های معرفی‌شده و بیگانه در بسیاری از مناطق جهان انجام شده که شاخص‌ترین آن‌ها عبارتند از ارزیابی اکولوژیکی و ارزیابی تهدیدهای گونه‌های گیاهی مهاجم در: کره (Koh et al., 2000)، تایوان (Wu et al., 2004a)، ایتالیا (Celesti-grapov et al., 2013)، اروپا (Keller et al., 2011)، جنوب غرب آسیا (Rollins & Al-Shehbaz, 1986; Musselman, 1986)، مجارستان (Balogh et al., 2004) و سوئیس (Wittenberg, 2005). این در حالی است که اکثر مطالعات در زمینه گیاهان معرفی‌شده و مهاجم ایران به‌صورت موردی انجام شده است. رحمانیان و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه‌ای به تفسیر مفاهیم گونه‌های مهاجم پرداخته‌اند و کوچکی و همکاران (۱۳۹۳) گونه‌های مهاجم در زیستگاه‌های طبیعی و کشاورزی استان خراسان را بررسی نموده‌اند. امینی و همکاران (۱۳۹۹) نیز به بررسی گونه‌های مهاجم و خطرات تهاجمی آن‌ها بر تنوع زیستی رویش‌های هیرکانی پرداخته‌اند.

کشور ایران با حدود ۷۳۰۰ (Noroozi et al., 2008) تا ۸۲۰۰ (Assadi et al., 2016) گونه گیاهی آوندی به‌عنوان مرکز مهم اندمیسم جنوب غرب آسیا (Klein, 1990; Hedge & Wendelbo, 1978)، و یکی از مراکز تنوع گیاهان آوندی دنیا (Davis Vavilov et al., 1992; & Heywood, 1994; Kier et al., 2005) و همچنین مرکز تنوع خویشاوندان وحشی محصولات زراعی (Sayadi & Mehrabian, 2018a) شناخته می‌شود. بنابراین این منطقه به‌عنوان یک ذخیره‌گاه ژنتیکی بسیار غنی از منظر گیاهان آوندی محسوب می‌گردد که حفاظت از آن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. تغییر اقلیم یکی از مهم‌ترین تهدیدهای تنوع

زیستی کشور ایران محسوب می‌گردد. تغییر در رژیم‌های بارندگی و دما و تبعات منفی آن چون خشک‌سالی، سیلاب و آتش‌سوزی (Ziska *et al.*, 1997) تبعات منفی زیادی را در اکوسیستم‌های طبیعی ایران (FAO, 2010) و جهان (IPCC, 2007) ایجاد نموده است. تغییرات اقلیمی جهانی به عنوان یکی از اصلی‌ترین دلایل گسترش گیاهان مهاجم شناخته می‌شود (Dullinger *et al.*, 2017). تغییر اقلیم طی مکانیزم‌های گوناگون از جمله حذف موانع اقلیمی سبب گسترش گونه‌های مهاجم می‌شود (Hellmann *et al.*, 2010; Bradley *et al.*, 2008). به‌علاوه گونه‌های گیاهی مهاجم غالباً انعطاف‌پذیری فنوتیپی بالایی نسبت به گونه‌های بومی دارند که این عامل سبب شده است که غلظت‌های بالای دی‌اکسیدکربن محیطی را بهتر تحمل کنند (Hellmann *et al.*, 2008). با افزایش دی‌اکسیدکربن محیطی، گونه‌های مهاجم با دو رویکرد مستقیم (افزایش رشد گیاه) و غیرمستقیم (افزایش جذب منابع در دسترس) در برابر گرم شدن آب و هوا و افزایش غلظت CO₂ مقاومت می‌کنند (Wolkovich & Cleland 2011; Liu *et al.* 2017). تمام این عوامل سبب عدم پایداری اکوسیستم‌های طبیعی، تغییر توازن رقابتی و کاهش تنوع گونه‌ای و گسترش گونه‌های مهاجم شده است (محرابیان، ۱۳۹۲). این تغییرات در بسیاری از زیستگاه‌های کشور ایران شرایط را برای گسترش گونه‌های مهاجم مساعد نموده است. در طی سال‌ها، گونه‌های متعددی به کشور ایران معرفی شده است که اطلاعات مدونی پیرامون آن‌ها وجود ندارد. به واسطه فقدان بانک اطلاعات اکولوژیکی-جغرافیایی پیرامون گونه‌های بیگانه و معرفی شده به ایران، انجام یک مطالعه جهت تدوین اطلاعات اکولوژیکی و جغرافیایی آن‌ها جهت برنامه‌ریزی‌های مدیریتی، ضروری به نظر می‌رسد. اهداف این مطالعه عبارتند از: تهیه نقشه پراکنش و تشریح داده‌های انتشار جغرافیایی، بررسی غنای گونه‌های گونه‌های معرفی شده به ایران و بررسی شرایط زیستگاهی و تهدیدهای این گونه‌ها در اکوسیستم‌ها. به علاوه این مطالعه می‌کوشد تا با تحلیل شیوه‌های مدیریتی ارائه شده در دنیا، راهکارهای مدیریت و کنترل این گونه‌ها را با توجه به شرایط بومی کشور ارائه نماید.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این مطالعه در محدوده جغرافیایی کشور ایران به مساحت ۱/۶ میلیون کیلومتر مربع در موقعیت جغرافیایی ۳۲° ۴۲' طول شمالی و ۶۸° ۵۳' عرض شرقی به انجام رسیده است. ایران بخش گسترده‌ای از فلات ایران را دربر می‌گیرد که واحدهای ژئومورفولوژیک عظیمی چون زاگرس، البرز، کپه‌داغ، شمال غربی و جنوب شرقی، بخش مرکزی آن را احاطه نموده است (اعلایی طالقانی، ۱۳۸۴). رشته کوه زاگرس به‌عنوان بخش مهمی از واحد ارتئوگرافیک آلپ-همالیا با جهت‌گیری شمال غربی-جنوب شرقی به عنوان گسترده‌ترین واحد کوهستانی ایران محسوب می‌گردد (Homke, 2007). البرز نیز مانند زاگرس حاصل برخورد دو صفحه تکتونیکی اوراسیا و عربستان بوده و با جهت‌گیری شرقی (از گرگانرود و مرز خراسان)-غربی (تالش) به طول ۹۵۰ کیلومتر و ارتفاع متوسط بیش از ۲۰۰۰ متر در امتداد سواحل دریای خزر کشیده می‌گردد (Ghorbani, 2013). رشته‌کوه‌های

کپه‌داغ در فصل مشترک دو ابرقاره اوراسیا و گندوانا نیز در امتداد شرقی رشته کوه‌های البرز دارای ساختارهای زمین‌شناختی و ژئومورفولوژیک متفاوتی است. این رشته‌کوه‌ها از نظر ژئومورفولوژیک جوان بوده و فازهای نهایی تغییرات آلپ-همالیا در شکل‌گیری رخساره‌شناسی کنونی آن نقش بنیادی داشته‌اند (Afshar Harb, 1979). متاثر از این واحدهای زمین‌شناختی و ژئومورفوژیک متنوع، تنوعات اقلیمی و تنوعات خاک‌شناسی بسیار متنوعی در ایران گزارش شده است. بر این اساس رژیم رطوبتی خشک (arid) در بخش‌های مرکزی، شرقی و جنوبی کشور (۶۳ درصد منابع خاک ایران)، رژیم رطوبتی گزریک (xeric) بخش‌های غرب، شمال‌غرب و شمال‌شرق (۲۵ درصد از منابع خاک ایران) و رژیم رطوبتی اوستیک (ustic) در بخش‌های گرمسیری جنوب در نوار ساحلی خلیج فارس و دریای عمان و بخش‌های کم‌ارتفاع خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان (۱۰ درصد از منبع خاک کشور) را دربر می‌گیرد (De Pauw et al., 2004). این درحالی است که غالب‌ترین طبقات خاک در ایران انتیوسول (Entisols) با ۲۴/۱ درصد و آریدوسول (Aridisols) با ۲۳/۹ درصد می‌باشند و طبقات اینسپتیوسول (Inceptisols)، مولیوسول (Mollisols)، آلفاسول (Alfasols)، ورتیسول (Vertisols) و سایر طبقات نسبت‌های پایین‌تری را به خود اختصاص داده‌اند (Dewan & Famouri, 1961; Heap et al., 1997).

به دلیل وجود سدهای گسترده کوهستانی ذکرشده، بخش‌های مرکزی ایران معادل یک سوم بارش جهانی (متوسط بارندگی سالیانه در حدود ۲۵۰ میلی‌متر) را دریافت می‌کنند (Shakur et al., 2010). به علاوه ایران در زون‌های جنوبی کوه‌های البرز، زاگرس و سایر رشته‌کوه‌های شمال غرب، داخلی و جنوب شرق ایران تحت تاثیر اقلیم زیستی مدیترانه‌ای، در دامنه‌های شمالی البرز و منطقه ارسباران متاثر از اقلیم زیستی معتدله و در نوار ساحلی خلیج فارس و دریای عمان و مناطق کم‌ارتفاع جنوب کشور تحت تاثیر اقلیم زیستی گرمسیری قرار می‌گیرد (Rivas-Martinez, 2004). از سویی دیگر در بخش‌های کم‌ارتفاع سواحل خلیج فارس و دریای عمان در منطقه جغرافیایی سودانو-زامبیزین، در دامنه‌های شمالی البرز و ارسباران در حیطه منطقه اروپا-سیبری و در سایر مناطق کوهستانی و بخش‌های مرکزی ایران که غالب مناطق جغرافیایی ایران را در بر می‌گیرد در قلمرو منطقه ایرانو-تورانی واقع شده است (Takhtajan, 1986).

تهیه پایگاه اطلاعاتی گونه‌های معرفی شده به ایران

پایگاه اطلاعاتی مربوط به تاکسون‌های گیاهی معرفی شده به ایران با استفاده از نرم افزار Access 2007 ساخته شد. این پایگاه اطلاعاتی شامل: نام تیره، نام علمی گونه، ارتفاع محل، محل جمع‌آوری و طول و عرض جغرافیایی است. داده‌های مربوط به تاکسون‌های مذکور به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱- داده‌های حاصل از مطالعات میدانی تیم نگارنده در استان‌های گیلان، گلستان، تهران، قم، مازندران، هرمزگان، بوشهر، خوزستان، اصفهان، مرکزی و سیستان و بلوچستان ۲- داده‌های موجود در منابع مختلف مانند: فلور ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۹۸-۱۳۶۳)، فلور ایرانیکا (Rechinger, 1963-2018) درخت‌ها و

درختچه‌های ایران (مظفریان، ۱۳۸۲) و منابع منتشر شده پیرامون گونه‌های گیاهی غیربومی ایران (Mozaffarian, 1994; Mozaffarian, 2003; Fadaie *et al.*, 2006; Eslami & Naqinezhad, 2011; Pahlevani & Sajedi, 2011; Tokasi *et al.*, 2017; Mamizadeh & Naqinezhad, 2018; Bidarlou *et al.*, 2019; Sajedi 2019; Eskandari & Abdi Fouladkolaei 2020).

۳- داده‌های مربوط به نمونه‌های هرباریوم‌های شهیدبهبشتی (HSBU) و وین (W).

تعیین مختصات جغرافیایی گونه‌ها

برای تهیه نقشه انتشار گونه‌ها و همچنین نقشه غنای گونه‌ای، مختصات جغرافیایی حضور گونه‌ها باید مشخص گردد. بدین منظور با استفاده از نرم افزار Google earth مختصات جغرافیایی (طول و عرض جغرافیایی) مربوط به محل جمع‌آوری هر نمونه مشخص گردید و وارد پایگاه اطلاعاتی شد. همچنین مختصات جغرافیایی نمونه‌های حاصل از مطالعات میدانی تیم نگارنده قبلاً با استفاده از دستگاه GPS ثبت شده بود.

تعیین نقشه انتشار و غنای گونه‌ای

در این مرحله مختصات جغرافیایی هر گونه با استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی Arc-GIS .ver 10.3 به نقشه انتشار در ایران تبدیل شد. همچنین با استفاده از خانه‌گرفته‌های (Grid cells) $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ در محیط نرم افزار Diva-GIS ver. 7.3 و با توجه به اطلاعاتی مانند تعداد گونه‌ها در هر خانه گرید، نقشه غنای گونه‌ای بر پایه گرید رسم گردید. همچنین از آنجایی که قرار گرفتن یک گونه در مرز مشترک خانه‌گرفته‌ها مشکلاتی در تخصیص آن نقطه به یکی از گریدها ایجاد می‌کند، لذا با استفاده از نرم‌افزار DIVA-GIS از روش مجاورت دایره‌ای (Circular Neighbourhood) با شعاع ۵۰ کیلومتر استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی منابع موجود و مطالعات میدانی نشان می‌دهد که تا به امروز ۲۷ گونه گیاهی بیگانه وارد پوشش گیاهی کشور ایران شده است. اطلاعات مربوط به این گونه‌ها در جدول شماره یک آمده است. تیره پیچک (Convolvulaceae) و تیره سیب زمینی (Solanaceae) با چهار گونه بزرگترین تیره گونه‌های معرفی شده در ایران هستند. به علاوه جنس تاجریزی با چهار گونه دارای بیشترین تعداد گونه‌های معرفی شده به ایران است (جدول ۱).

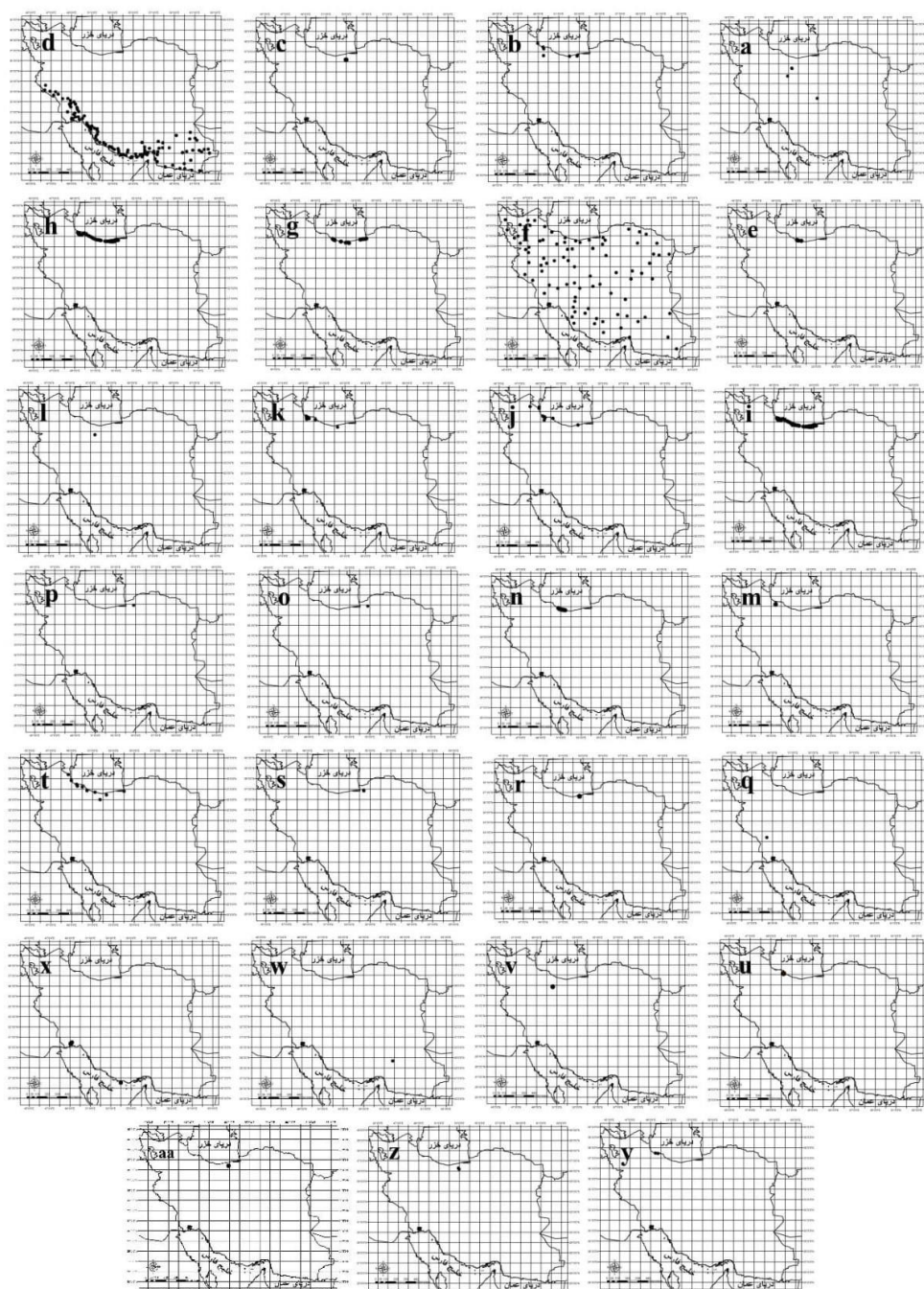
جدول ۱: لیست گونه‌های معرفی شده به ایران

نام علمی گونه	نام تیره	منطقه انتشار در ایران	وضعیت تهاجمی
<i>Solanum eleagnifolium</i> Cavanilles	Solanaceae	ایران مرکزی	مهاجم
<i>Solanum viarum</i> Dynal.	Solanaceae	هیرکانی	-
<i>Solanum sisimbryfolium</i> Lam.	Solanaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Solanum pseudocapsicum</i> L.	Solanaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.	Fabaceae	سودانو- زامبیزین	مهاجم
<i>Pueraria montana</i> (Lour.) Merr.	Fabaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Alianthus altissima</i> (Mill.) Swingle	Simaroubaceae	تمام مناطق ایران	مهاجم
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Araujia sericifera</i> Brot.	Apocynaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Lonicera caprifolium</i> L.	Caprifoliaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Azolla filiculoides</i> Lam.	Salviniaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	Pontederiaceae	هیرکانی	مهاجم
<i>Anoda cristata</i> (L.) Schltld.	Malvaceae	ایران مرکزی	-
<i>Pistia stratiotes</i> L.	Araceae	هیرکانی	-
<i>Ipomoea indica</i> (Burm.) Merr	Convolvulaceae	هیرکانی	-
<i>Ipomoea hederacea</i> (L.) Jacq.	Convolvulaceae	هیرکانی	-
<i>Ipomoea triloba</i> L.	Convolvulaceae	هیرکانی	-
<i>Merremia dissecta</i> (Jacq.) Hallier f.	Convolvulaceae	سودانو- زامبیزین	-
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Brassicaceae	هیرکانی	-
<i>Proboscidea fragrans</i> (Lindl.) Decne.	Martyniaceae	هیرکانی	-
<i>Phytolacca americana</i> L.	Phytolacaceae	هیرکانی	-
<i>Commelina communis</i> L.	Commelinaceae	هیرکانی	-
<i>Amsinckia menziesii</i> (Lehm.) Nelson & J.F. Macbr.	Boraginaceae	ایران مرکزی	-
<i>Trianthema portulacastrum</i> L.	Aizoaceae	سودانو- زامبیزین	-
<i>Sesuvium verrucosum</i> Raf.	Aizoaceae	سودانو- زامبیزین	-
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	Asteraceae	هیرکانی	-
<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	Basellaceae	هیرکانی	-

بررسی ها نشان می‌دهد که ۱۶ گونه از گونه‌های مورد مطالعه دارای عرصه انتشار محدودی در ایران هستند و خوشبختانه

هنوز حالت تهاجمی پیدا نکرده‌اند (جدول ۱ و شکل ۱). گونه سرخاب کولی با نام علمی *Phytolacca americana* L. مدت زمان

زیادی است که وارد جنگل های هیرکانی شده است اما خوشبختانه این گیاه نیز تاکنون حالت تهاجمی پیدا نکرده است.



شکل ۱: نقشه انتشار گیاهان معرفی شده به ایران: (a) *Solanum eleagnifolium* Cavanilles (b) *Solanum* (c) *sisimbrifolium* Lam. (d) *Solanum pseudocapsicum* L. (e) *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (f) *Alianthus altissima* (Mill.) Swingle (g) *Araujia sericifera* Brot. (h) *Sida rhombifolia* L. (i) *Proboscidea* (j) *Lonicera caprifolium* L. (k) *Azolla filiculoides* Lam. (l) *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. (m) *Ipomoea indica* (Burm.) Merr. (n) *Pistia stratiotes* L. (o) *Ipomoea hederacea* (L.) Jacq. (p) *Ipomoea triloba* L. (q) *Merremia dissecta* (Jacq.) Hallier f. (r) *Lepidium virginicum* L. (s) *Amsinckia menziesii* (t) *Phytolacca americana* L. (u) *Commelina communis* L. (v) *Sesuvium verrucosum* Raf. (w) *Lehm.* Nelson & J.F. Macbr. (x) *Trianthema portulacastrum* L. (y) *Solanum viarum* Dynal. (z) *Ambrosia psilostachya* DC. (aa) *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis

در بین گونه‌های مورد مطالعه، ۱۱ گونه به صورت گیاه مهاجم در ایران درآمده‌اند. در ادامه به شرح تفصیلی این گونه‌های مهاجم پرداخته می‌شود.

الف- گیاهان معرفی شده به زیستگاه‌های خشکی ایران

Solanum eleagnifolium Cavanilles

این گونه متعلق به زیرجنس *Solanum subgenus Leptostemonum* (Dunal) Bitter است که مشهور به تاجریزی برگ نقره‌ای (silver-leaf nightshade)، سیب گزنه (nettle apple) یا سیب تلخ (bitter apple) است. *Solanum eleagnifolium* گونه‌ای با منشاء گرمسیری و رطوبت‌پسند است (Boyd et al., 1984) که بومی شمال شرق مکزیک، جنوب غرب ایالات متحده و آرژانتین است (Robinson et al., 1978) (شکل ۲-ا). این گونه یکی از خطرناک‌ترین گونه‌های مهاجم است که در بسیاری از نقاط آمریکا، اروپا، آسیا و به‌ویژه شمال آفریقا انتشار یافته است. انتشار آن عمدتاً توسط انسان از طریق انتقال بذرهای یونجه، پنبه، غذای خوک و ابزارهای کشاورزی به مناطق مختلف دنیا صورت گرفته است (Tanji et al., 1984; Heap et al., 1977; Bouhache, 2010). زیرجنس *Leptostemonum* مشتمل بر ۴۵۰-۳۵۰ گونه با انتشار وسیع در سراسر دنیا است که کانون تنوع آن آمریکای جنوبی و مرکزی، استرالیا و آسیا است. این گروه تک‌نیا بواسطه اپیدرم خارداری که سطح برگ‌ها و ساقه‌های آن‌ها را پوشش داده، شناخته می‌گردد (Levin et al., 2006).

گونه *Solanum incanum* L. به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی این زیرجنس در بخش‌های جنوبی کشور ایران (تحت پوشش منطقه سودانو-زامبیزین) (خاتم ساز، ۱۳۷۷) در خاورمیانه، پاکستان، عربستان سعودی و هند انتشار دارد (Zohary, 1973). *Solanum surattense* Burm. f. به‌عنوان گونه دیگر این زیرجنس خاردار در بخش‌های گرمسیری نوار ساحلی خلیج فارس و دریای عمان و در قلمرو منطقه جغرافیای گیاهی سودانو-زامبیزین انتشار دارد. لازم به ذکر است نزدیک‌ترین خویشاوندان این گونه (*S. hindsianum* Benth., *S. mortonii* Hunz., *S. houstonii* Dunal, *S. homalospermum* Chiarini) که با هم در یک کلاد تبارشناختی قرار می‌گیرند به عنوان علف هرز شناخته می‌شوند (Knapp et al., 2000). گرده‌افشانی در این گروه توسط زنبور انجام می‌شود (Buchmann et al., 1977). گونه تاجریزی برگ نقره‌ای نخستین بار توسط Mozaffarian (۱۹۹۴) در چاه افضل یزد گزارش شده است. سپس عرب سلمانی و همکاران (۱۳۹۳) آن را در مزارع پنبه استان تهران گزارش نمودند.

محرابیان در سال ۱۳۹۶ در طی مطالعات ارزیابی گیاهان رودخانه کن (شرکت مهندسی مشاور مهتاب قدس، ۱۳۹۷) این گونه را در بخش‌های جنوبی رودخانه کن در منطقه کهریزک، خروجی پساب تصفیه خانه فاضلاب جنوب تهران و نیز مسیل های ابتدای جاده قم-تهران گزارش نموده است. مبتنی بر شرایط اکولوژیکی زیستگاه‌ها، رویش بذر این گونه از اوایل بهار تا اواخر تابستان رخ می‌دهد. این گیاه در زیستگاه‌های انسان‌زاد مانند مزارع کشاورزی، حاشیه جاده‌ها، کانال‌های آبیاری، باغچه‌ها، ریل

راه آهن، مراتع مدیریت شده، حاشیه کانال فاضلاب ها و سایر رویشگاه های تخریب شده رشد می کند (Brunel, 2011). این گیاه چندساله به واسطه قوه نامیه و تعداد بسیار زیاد بذرها (۷۲۰۰-۱۵۰۰ بذر در هر گیاه) (Molnar & McKenzie, 1976; Heap & Carter, 1999)، قدرت انتشار بالای بذر به وسیله آب و باد (Boyd & Murray, 1982; Brunel, 2011)، تولیدمثل رویشی گسترده و سریع (Uludag et al., 2016)، ریزوم های عمیق (Brunel, 2011)، سازگاری گسترده به شرایط خاکی گسترده (Carter, 1999)، مقاومت به خشک سالی و نوسانات دمایی (Heap et al., 1997; Garrett et al., 2006) و مقاومت در برابر آتش (Wink & Wrigth, 2006) از قدرت پایداری و گسترش وسیعی برخوردار است. به علاوه اثرات آلوپاتیکی آن به ویژه بر محصول مزارع پنبه و خیار گزارش شده است (Reinhardt, 2006; Mkula et al., 2006). از سویی دیگر گسترش آن به شدت در کاهش محصول در مزارع پنبه، غلات (مانند گندم و سورگوم) در بسیاری از مناطق جهان تاثیر گذاشته است (Molnar & McKenzie, 1976; Heap & Carter, 1999; EPPO, 2007). این در حالی است که ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه به عنوان عامل دفع کننده طیف وسیعی از حشرات آفت در محصولات کشاورزی کاربرد دارد (Hamouda et al., 2015). با وجود عدم ترجیح آن جهت مصرف به عنوان علوفه، آکالوئیدهای سولانین و سولاسونین در مواردی در دام های اهلی چون گاو، اسب و به میزان کمتر گوسفند سبب مسمومیت و مرگ شده است (Buck et al., 1960; Garland et al., 1998). به علاوه این گونه در انسان سبب حساسیت های پوستی می گردد (Uludag et al., 2016). از طرفی گسترش آن در بسیاری از مناطق دنیا سبب کاهش تنوع گیاهی شده است (Tscheulin et al., 2009; Ganatasas et al., 2012). این گیاه دارای دشمنان طبیعی متعددی از سوسک ها، نماتودها، نیم بالان و دوبالان است (Sforza & Jones, 2007) اما لاروهای نوعی بید (*Frumenta nephalomicta* Lep. Gelechiidae)، نوعی سوسک (*Lepitinotarsa* L. defecta)، نیم بال (*col. Chrysomelidae*) و نوعی نیم بال (*Gargaphia arizonia* (Hem. Tingidae)) و نوعی نماتود (*Orrina phylobia*) (Nematoda) به عنوان موثرترین عوامل کنترل زیستی این گیاه شناخته شده اند (Robinson et al., 1979; Wapshere, 1988; Olckers et al., 1999; Olckers et al., 1995).

الگوی انتشار در ایران: حاشیه کانال های آبرسانی، فاضلاب ها، آبراهه های خشک، مسیل ها در پروانس جغرافیایی ایران مرکزی (شکل ۱- a)

زمان گلدهی: خرداد- مرداد

***Solanum sisimbryfolium* Lam.**

این گونه به تاجریزی برگ نقره ای چسبنده مشهور بوده و متعلق به زیرجنس *Leptostemonum* است که بومی جنوب و مرکز قاره آمریکا بوده اما به شمال آمریکا، اروپا، آفریقا، استرالیا و آسیا نیز معرفی شده است (Karaer & Kutbay, 2007; Shaha & Data, 2013) (شکل ۲- b). این گونه در حاشیه جاده ها، زمین های کشاورزی، رویشگاه های تخریب شده و چرا شده،

سواحل شنی و مناطق دپوی زباله رویش دارد (Hill & Hullley, 1995). تولید مثل این گیاه از طریق بذر و نیز رشد ریزوم انجام می‌شود (D'arcy, 1974). گرده‌افشانی این گیاه توسط دامنه وسیعی از زنبورهای خانواده Apidae انجام می‌شود (Saha & Datta, 2017). به‌علاوه گلدهی آن در مناطق مختلف در اغلب فصول سال انجام می‌شود (Saha & Datta, 2013). این گونه نخستین بار توسط اسلامی و نقی‌نژاد (۲۰۱۰) در کیاکلا جویبار و طالش گیلان گزارش شد. این گونه توسط نگارنده نخست در بخش‌های مختلف استان گیلان به ویژه لوشان، رشت و انزلی نیز مشاهده شده است (گزارش‌های منتشر نشده). به‌علاوه کاوسی در ارزیابی مدیریتی منطقه حیات وحش لوندویل در گیلان در سال ۱۳۸۲ این گونه را گزارش و جمع‌آوری نموده است (گزارش‌های منتشر نشده). این گونه در طی ۱۵ سال اخیر به صورت منفرد یا توده‌ای در سطوح وسیعی از توسکستان، انارستان، لرگا و نیز رویشگاه‌های ازگیل در استان گیلان را اشغال نموده است (محراییان، گزارش‌های منتشر نشده). انتشار بذر آن از طریق پرندگان و موش و انسان از طریق انتقال علوفه گزارش شده است (Bryson, 2011). مطالعات مدل‌سازی اکولوژیک نشان می‌دهد که این گونه از توانمندی بالایی جهت اشغال زیستگاه‌های وسیعی در سراسر کره زمین برخوردار است (USDA, 2013). این گیاه بواسطه ترکیبات دارویی به عنوان ضداسهال، دفع سموم و تسکین‌دهنده درد کاربرد دارد (Ferro et al., 2005; Serker et al., 2013). این گونه با رشد در مزارع سیب‌زمینی از گسترش نماتود آفت سیب‌زمینی جلوگیری می‌نماید (Timmermans et al., 2001; Danduran & Kudsen, 2006). میوه‌های این گونه توسط بومیان آرژانتین و پرندگان مصرف می‌گردد. بواسطه ترکیبات استروئیدی در درمان بیماری جنسی و نیز به‌عنوان یک داروی ضدبارداری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hill & Hulley, 1995). روش کنترل مکانیکی شامل قطع بن ریشه و نیز ساقه‌های هوایی جهت جلوگیری از تولید بذر است (Byrne et al., 2002). کنترل زیستی آن توسط نوعی سوسک آفت برگ‌خوار (*Gratiana spadiccea*) و آفت گل‌خوار (*Anthonomus sisymbrii*) گزارش شده است (Olckers et al., 2002). نتایج ارزیابی ریسک انجام شده نشان می‌دهد که این گونه از توانمندی بالایی جهت نفوذ به زیستگاه‌های جدید برخوردار است اما در صورت نفوذ به زمین‌های کشاورزی و مزارع گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و بادمجان به‌دلیل قدرت مبارزه با نماتودهای تیره سیب‌زمینی سودمندی و مضرات آن در مزارع و اکوسیستم‌های کشاورزی می‌باید توسط مالکان و کشاورزان با رعایت ملاحظات و دقت مورد تحلیل قرار گیرد (USDA, 2013).

الگوی انتشار در ایران: مراتع تخریب شده حاشیه جنگل در پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- b)

زمان گلدهی: اردیبهشت- تیر

***Solanum pseudocapsicum* L.**

درختچه‌ای ایستاده و منشعب دارای ترکیبات سمی از خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) که به گیلان زمستانی (Winter cherry) یا گیلان اورشلیم (Jerusalem cherry) مشهور است و اغلب به دلیل داشتن میوه‌های زیبا به‌عنوان گیاه

تزیینی کشت می‌شود (Bassett & Munro, 1985). این گیاه بومی مکزیک، آمریکای مرکزی، کارائیب و آمریکای جنوبی است و در جنوب آفریقا، آمریکای شمالی، هاوایی، نیوزیلند و استرالیا نیز گسترش یافته و به گونه‌ای بومی شده مبدل شده است (شکل ۲- c). این گیاه در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری در حاشیه جنگل‌ها و آبراهه‌ها رشد می‌کند اما گاهی در محیط‌های نیمه خشک و گرمسیری نیز انتشار دارد. این گیاه در استرالیا و نیوزیلند به عنوان علف هرز مزارع کشاورزی گزارش شده است. پراکندگی گیاه عمدتاً از طریق بذر انجام می‌شود. از این گیاه برای درمان دردهای حاد شکمی (Boericke, 1927)، درمان جوش و سوزاک (Batten & Bokelmann, 1966) و محافظت از کبد و درمان تومور (Shrishailappa et al., 2003) استفاده شده است. میوه‌های آن حاوی ترکیبات آلکالوئیدی و سمی هستند که برای انسان و حیوانات کشنده است (Parisi & Farancia, 2000). حضور نماتود انگلی *Meloidogyne entrolobii* که باعث کاهش محصولات زراعی مانند سیب‌مینی می‌گردد در ریشه این گیاه مطالعه شده است. این گیاه باعث افزایش جمعیت نماتود می‌شود، بنابراین حضور *S. pseudocapsicum* در کنار مزارع از گسترش این نماتود جلوگیری می‌کند (Groth et al., 2017). کنترل آن از طریق ریشه‌کنی و حذف بوته‌های گیاه تا قبل از گلدهی برای مقیاس‌های کوچک قابل اجرا بوده (امینی و همکاران، ۱۳۹۹) ولی کنترل زیستی آن نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

الگوی انتشار در ایران: مناطق جنگلی در پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- c)

زمان گلدهی: اردیبهشت- تیر

Prosopis juliflora (Sw.) DC.

کهور آمریکایی یا کهور پاکستانی به عنوان یک گونه درختی همیشه سبز به طور طبیعی در مناطق گرمسیری آمریکای مرکزی و جنوبی رویش دارد (Alban et al., 2002) (شکل ۲- d). این گونه سریع‌الرشد در سال ۲۰۰۴ در فهرست ۱۰۰ گونه مهاجم توسط اتحادیه جهانی حفاظت معرفی شده است (Mwangi & Swallow, 2005). به علاوه به عنوان مهاجم‌ترین گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک جهان نیز گزارش شده است. تاکنون اثرات منفی این گونه بر غنا، یکنواختی و تراکم فلورستیک به اثبات رسیده است (El-Keblawy & Al-Rawai, 2007). از طرفی اثرات آلوده‌پاتیکی آن بر تنوع و ترکیب فلورستیکي بالارزش این مناطق، تاثیرات منفی متعددی را تحمیل نموده است (مصلح آزانی و همکاران، ۱۳۹۱). تاج پوشش گسترده در کنار تاثیرات آلوده‌پاتیکی آن سبب کاهش معنادار سطح پوشش گیاهی اشکوب زیرین آن می‌گردد. این گیاه در خاک‌های فقیر با مواد آلی کم، خاک‌های حاصلخیز، خاک‌های خشک و خاک‌های هیدرومورف با pH بالاتر از ۱۰ رشد می‌کند. این گونه حتی در اثر بریده شدن، در خاک‌های شنی قابلیت تجدید حیات دارد (Mwangi & Swallow, 2005). کهور آمریکایی می‌تواند سبب تجمع نمک‌های محلول و فنل کلی خاک گردد (Kaur et al., 2012). به علاوه با افزایش لاشبرگ‌ها و مواد آلی سبب افزایش رطوبت اشباع خاک در بخش‌های زیر تاج پوشش آن می‌گردد (نجفی شبانکاره و همکاران، ۱۳۶۸). این گونه در دهه ۱۹۷۰ میلادی، در ابتدا برای

احیاء مناطق بیابانی، بازسازی خاک‌های فرسایش یافته، تامین هیزم و نیز خوراک دام به شرق آفریقا معرفی شد (Coppock et al., 2014; Shackleton et al., 2005). هر چند این گونه به سرعت به سراسر جهان به‌ویژه سواحل گرمسیری آسیا، استرالیا و اروپا گسترش یافت (Pasiiecznik, 1999). با برداشت نیام‌ها می‌توان قدرت تولیدمثلی آن را کاهش داد. به‌علاوه استفاده آن به عنوان زغال، سبب تعدیل جمعیت‌های آن شده است. اما این شیوه به‌دلیل هزینه‌های زیاد گسترش چندان‌ی را در جهان نداشته است (Wakie et al., 2016). در کنیا از آرد تهیه شده از نیام‌ها به‌عنوان یک ماده غذایی حاوی ترکیبات ضدباکتری جهت افزایش تولیدات دامی استفاده می‌شود (Syomiti et al., 2015). در پرو از نیام‌ها برای خوراک دام استفاده می‌شود. در آرژانتین، مکزیک و برزیل نیز از آن به‌عنوان علوفه استفاده می‌گردد (de Barros et al., 1988; Felker & Moss, 1996). براساس گزارشات موجود این گونه در بسیاری از مناطق جهان تنوع فلور بومی را کاهش داده اما علی‌رغم این باعث کاهش pH، افزایش پتاسیم، فسفر و ازت خاک شده است (Menzes et al., 2002). به‌علاوه قابلیت تثبیت ازت و افزایش حاصل‌خیزی خاک توسط این گونه به نسبت سایر گونه‌های چوبی بسیار بالاتر است (El-Keblawy & Al-Rawai, 2007). این در حالی است که در اثر مدیریت بوم‌شناختی به‌عنوان یکی از موثرترین گونه‌ها در احیاء مناطق بیابانی و جلوگیری از فرسایش خاک در کشورهای سواحل خلیج فارس مانند ایران و امارات متحده عربی شناخته شده است (Western, 1989). این گونه دارای ترکیبات آللوپاتیک موثری است که سبب تأثیرات منفی در رشد گیاهان و فعالیت باکتری‌های خاک می‌گردد (Kaur et al., 2012). دانه‌های گرد آن آلرژی‌زا بوده و سبب مشکلات تنفسی شده و خارهای سطح گیاه سبب جراحات و زخم‌های شدید می‌گردد. به‌علاوه تراکم بالای این درخت در یک منطقه و سمیت شیرابه‌های مترشحه توسط گیاه، سبب مستعد شدن منطقه به گسترش مالاریا می‌گردد (Iftikhar et al., 2020). ریشه‌های اصلی این گیاه تا ۳۵ متر قابلیت نفوذ در خاک را داشته و سبب کاهش سطح ایستابی آب‌های زیرزمینی می‌گردد. این گونه در ایران در اوایل دهه ۵۰ (هجری شمسی) توسط دریانوردان به سواحل خلیج فارس معرفی شده است. در نخلستان‌ها و زمین‌های کشاورزی هرمزگان به عنوان یک گونه مهاجم شناخته می‌شود که سبب آسیب‌های شیمیایی (بواسطه ترکیبات شیمیایی) و فیزیکی (بواسطه پوشش سخت نیام‌ها) به جانوران تغذیه‌کننده از نیام‌های آن می‌گردد. مطالعات انجام‌شده توسط نگارنده نخست در استان هرمزگان نشان می‌دهد این گونه در این استان حالت تهاجمی پیدا کرده است و گسترش بی‌رویه آن در زمین‌های کشاورزی، مناطق مسکونی، جاده‌های درون و برون‌شهری و تاسیسات و شبکه‌های آبرسانی و برق‌رسانی به وفور مشاهده می‌شود. اما علیرغم مهاجم بودن، این گونه از مزایای زیادی برخوردار است که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تثبیت ازت خاک، پرچین و دیواره‌های سبز، بادشکن، جلوگیری از فرسایش خاک و افزایش حاصل‌خیزی آن و ایجاد سوخت، صمغ و کمپوست (نجفی تیره شبانکاره، ۱۳۶۸؛ ضعیفی، ۱۳۷۵؛ سلطانی پور، ۱۳۷۲؛ میرشکار، ۱۳۷۵؛ طهماسبی، ۱۳۷۹). مطالعات مصلح‌آزانی و همکاران (۱۳۹۱) نشان می‌دهد که گونه کهور آمریکایی مقاومت بسیار بالایی در برابر تنش خشکی دارد و نسبت

به گونه‌های بومی از سازگاری بسیار بالایی برای گسترش و انتشار برخوردار است بنابراین سبب حذف گونه‌های بومی و کاهش تنوع زیستی در جنوب کشور می‌گردد. مطالعات انجام شده در ایران (شبانکاره و همکاران، ۱۳۶۸) و بسیاری از مناطق دنیا نشان‌دهنده کاهش سطح پوشش گیاهی در زیر تاج پوشش این گیاه است (Pasiiecznik et al., 2004). تولید بذر فراوان، تثبیت سریع جمعیت، دوره طولانی خواب بذر، قوه نامیه بالای بذرهای دفن‌شده، سازگاری بالا در پراکنش و اندام‌های رویشی تکثیر شونده، این گیاه را به گونه‌ای با اثرات تهاجمی بالا تبدیل نموده است. به واسطه این ویژگی‌ها در اتیوپی برخی آن را تنبیه خداوند و برخی آن را بهشت بیابان نامیده‌اند (hailu et al., 2004). البته اثرات منفی آن در مناطقی که مهاجم شده و با پوشش متراکم ظاهر می‌گردد از منافع آن بیشتر است (Rieks et al., 2006).

الگوی انتشار در ایران: منطقه جغرافیایی سودانو-زامبیزین (شکل ۱-د)

زمان گلدهی: بهمن - اسفند

Pueraria montana (Lour.) Merr.

کودزو گیاهی از خانواده باقلا (Fabaceae) بومی جنوب شرق آسیا، چین و ژاپن است که برای اولین بار در سال ۱۳۹۰ در باغ گیاه‌شناسی نوشهر گزارش شده است (امینی و همکاران ۱۳۹۹) (شکل ۲-ع). این گیاه دارای ریشه‌های غده‌ای بزرگ با نشاسته و محتوای بالای آب است. که می‌تواند به‌عنوان یک اندام ذخیره‌کننده آب و کربن عمل نموده و بیش از ۵۰ درصد زی‌توده گیاه را تشکیل دهد (Lamont & Young, 2002). این گونه در نیویورک، فلوریدا، تگزاس و اوکلاهما ایالات متحده نیز گسترش یافته است. این گیاه می‌تواند با شرایط نور شدید و سایه سازگار گردد اما بهترین عملکرد زیستی را در مناطق حاشیه جنگل با نور زیاد نمایان می‌سازد (Abramovitz, 1983). جهت کنترل فرسایش شدید در دامنه‌های شیب‌دار استفاده شده است (McKee & Stephens, 1943). گسترش سریع برگ‌ها، ریشه زدن مکرر ساقه‌ها در تماس با خاک، کارآمدی بالای فتوسنتز، ظرفیت بالای هیدرولیکی در ریشه‌ها و ریزوم‌ها و توانایی تثبیت ازت اتمسفری آن را به گونه‌ای بسیار مقاوم تبدیل نموده است (Witkamp et al., 1966). تولیدمثل این گیاه به‌صورت رویشی و زایشی بوده (Dubadghao, 1949) و کنترل آن بسیار دشوار است. به جهت آن‌که انتقال کربن به ریشه غده‌ای برای استقرار گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است، ایجاد برش و قطع ساقه سبب ضعف رشد گیاه در سال آینده می‌شود که ادامه آن در بازه زمانی سه تا چهار ساله می‌تواند سبب نابودی و ریشه‌کشی گیاه گردد (Miller & Edwards, 1983). این در حالی است که از علف‌کش‌ها نیز برای کنترل این گیاه استفاده شده اما به‌شدت هزینه‌بر و زمان‌بر است (Quimby et al., 2003). این گونه در باغ گیاه‌شناسی نوشهر با قطع شاخه‌های خزنده، استفاده از علف کش‌ها، شخم عمیق و جمع آوری دقیق مقطوعات ریشه تحت کنترل درآمده است (امینی و همکاران، ۱۳۹۹).

الگوی انتشار در ایران: پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- e)

زمان گلدهی: خرداد- مرداد

Alanthus altissima (Mill.) Swingle

این گونه مشهور به درخت بهشتی است که به‌عنوان یکی از مهاجم‌ترین گونه‌های گیاهی در بسیاری از کشورهای جهان به ویژه اروپا و آمریکای شمالی معرفی شده است (USDA, 2014) (شکل ۲- f). این گونه بومی جنوب شرق آسیا است که در قرن ۱۸ به اروپا و شمال آمریکا معرفی شده است. این گونه با رشد گسترده در شهرها سبب آسیب به زیر ساخت‌های شهری و آثار باستانی می‌گردد. به‌علاوه با ایجاد اثرات آلرژی‌زایی سبب مشکلات تنفسی و حساسیت‌های پوستی در انسان می‌شود (Luz- Lezcano Caceres & Gerold, 2009). درخت بهشتی با تغییرات منفی در محیط زیست سبب تغییر پوشش گیاهی و ناپایداری اکوسیستم می‌گردد (Constan-Nava et al., 2010). رشد بسیار سریع، تولیدمثل رویشی گسترده به‌ویژه با ریشه‌جوش و پاجوش، تولید بذرها بسیار زیاد و قابلیت انتشار گسترده بذرها مبارزه با این گیاه را دشوار نموده است (Badalamenti & LaMantia, 2013). این گونه در طب سنتی چین دارای کاربردهای گسترده‌ای در درمان آسم، اسپاسم، صرع، مالاریا و دفع انگل‌ها است (Kowarik & Saumel, 2007; Tamura et al., 2003). همچنین از این گیاه ترکیبات علف‌کش و حشره‌کش سازگار با محیط- زیست استخراج شده است (Kozuharova et al., 2014). به‌علاوه جهت احیای زیستگاه‌های تخریب شده، تولید الوار و نیز تولید نکتار زنبورعسل و نیز از برگ‌های آن برای تغذیه کرم ابریشم و نیز تولید رنگ زرد استفاده می‌گردد (Sladonja et al., 2015). این گونه سبب آسیب به جاده‌ها، ریل‌های راه‌آهن و کانال‌های آب می‌شود (Kowarik & Saumel, 2007). این گونه با نفوذ به رویشگاه‌های طبیعی سبب کاهش تنوع و غنای گونه‌ای در زیر تاج‌پوشش آن می‌گردد. علی‌رغم این، درخت بهشتی در مناطق تخریب‌شده، جنگل‌های پاک‌تراشی‌شده و رویشگاه‌های انسان‌ساخت از گسترش بیشتری برخوردار است (Radtke et al., 2013). این گونه قابلیت انتشار به زیستگاه‌های متراکم جنگلی را ندارد اما در جنگل‌های کم‌تراکم و یا باز از قابلیت تهاجم و گسترش برخوردار است (Knapp & Canham, 2000). این گونه دارای اثرات آلوپاتیک منفی متعددی در خاک است. درخت بهشتی با تغییر در زنجیره‌های غذایی خاک بر میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات و شکم‌پایان خاک‌زی تأثیرات منفی می‌گذارد و در نهایت باعث تغییرات پوشش گیاهی می‌گردد (Motard et al., 2015). همچنین این گونه سبب تغییرات منفی در ویژگی‌های فیزیکی، افزایش pH و کاهش نسبت کربن به نیتروژن می‌گردد (Sladonja et al., 2015). به‌دلیل تولید مثل رویشی گسترده گیاه، قطع گیاه روش مناسبی برای کنترل آن نیست. روش‌های توام کنترل شیمیایی، کنترل زیستی (در داخل و خارج شهرها)، چرا توسط دام و سوزاندن (در خارج شهرها) از جمله روش‌های کنترل گسترش این گونه است (Kowarik & Saumel, 2007). البته قطع درخت و تیمار با علف‌کش‌ها (به ویژه گلیکوفسفات) موثرترین شیوه کنترل آن شناخته شده است (Constan-Nava et al., 2010; Badalamenti & LaMantia, 2013).

الگوی انتشار در ایران: تمام مناطق ایران (شکل ۱- f)

زمان گلدهی: اردیبهشت- خرداد

Sida rhombifolia L.

گونه‌ای درختچه‌ای به‌ندرت درختی از خانواده پنیرک (Malvaceae) (Baracho, 1998) که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، به‌ویژه آمریکای جنوبی رشد می‌کند (Holm et al., 1997; Heywood, 1993) (شکل ۲- g). این گیاه برای نخستین بار در ایران توسط امینی و همکاران (Amini et al., 2003) از مناطق کم‌ارتفاع جنوب نوشهر گزارش شده است. تولیدمثل این گیاه فقط از طریق بذر گزارش شده است (Cardoso, 1990). ایجاد یک سیستم ریشه‌ای مقاوم و گسترده، قابلیت بازرویشی در اثر قطع تنه و شاخه‌ها سبب گسترش و تبدیل آن به یک گونه مهاجم نیز شده است (Holm et al., 1997; Lorenzi, 1991). این گیاه به عنوان علف هرز در مزارع ۳۴ محصول مهم کشاورزی از جمله نیشکر، ذرت، موز، لوبیا، قهوه، پنبه، سویا و برنج گزارش شده است (Smith et al., 1992; Holm et al., 1997). میوه‌ها، ریشه‌ها، برگ‌ها و ساقه گیاه سرشار از ساپونین، تانن، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، ترکیبات استروئیک، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، لیگنان‌ها، گلیکوزیدها، فنولیک‌ها، استروئیدها و فلاونوئیدها است (Rajalakshmy & Pydi, 2011) و در ساخت داروهای هندی، چینی، آفریقایی و آمریکایی استفاده می‌شود. ترکیبات ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد درد، ضد زخم، کاهش فشار خون، آنتی اکسیدان و ضد دیابتی از سایر کاربردهای دارویی این گیاه است (Galal, et al., 2015). به‌علاوه الیاف سلولزی آن در صنایع سلولزی کاربرد دارد (Huiskens et al., 2020). روش‌های برداشت فیزیکی و وجین و نیز سمپاشی، جهت کنترل آن در مزارع پیشنهاد شده است (Holm et al., 1997). در استرالیا و گینه‌نو کنترل زیستی آن توسط سوسک برگ‌خوار *Calligrapha pantherina*، با موفقیت همراه بوده است (Kuniata & Rapp, 2001).

الگوی انتشار در ایران: حاشیه جاده‌ها، اراضی رها شده و مزارع در مناطق کم ارتفاع پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- g)

زمان گلدهی: مرداد- مهر

Araujia sericifera Brot.

گیاهی چندساله، سریع‌الرشد و بالارونده از تیره Asclepiadaceae که بومی آمریکای جنوبی (برزیل و آرژانتین) بوده و در قرن ۱۹ به‌عنوان گیاه زینتی وارد کشورهای اروپایی، آمریکا و برخی مناطق دیگر شده و امروزه به‌عنوان یک علف هرز زیان‌آور در باغ‌ها و مزارع شناخته می‌شود (شکل ۲- h). در ایران اولین بار توسط ساجدی و امینی‌راد (۱۳۹۳) از باغ مرکبات ساری در استان مازندران به‌عنوان علف هرز مهاجم گزارش شده است و در حال حاضر در استان‌های مازندران و گیلان، در حاشیه جاده‌های اصلی، سواحل دریا، روی درختان در اراضی بایر و همچنین باغات مرکبات گسترش یافته است (امینی و همکاران

۱۳۹۹). این گیاه در سال ۲۰۰۸ وارد فهرست هشدار و از سال ۲۰۱۲ تحت نظر سازمان حفظ نباتات اروپا (EPPO) قرار گرفته است و بعنوان علف هرز مهاجم در حال گسترش در نظر گرفته می‌شود. محدوده پراکنش این گونه در جهان شامل اروپا (فرانسه، ایتالیا، اسپانیا، یونان و پرتغال)، آفریقای جنوبی، آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی (آرژانتین، برزیل، پاراگوئه و اروگوئه)، استرالیا و نیوزیلند می‌گردد (Popay et al., 2004) و در کشورهای آمریکا، نیوزیلند و استرالیا، ایتالیا و اسپانیا به عنوان علف هرز مهم و تهدید کننده ارزیابی شده است (Winks & Fowler, 2000). آلودگی شدید به این علف هرز موجب جلوگیری از تکثیر و ازدیاد نسل گونه‌های بومی می‌شود (ساجدی و امینی‌راد، ۱۳۹۳). گرده‌افشانی این گونه توسط زنبورهای مختلف انجام می‌شود (Romeo, 1933; Coleman, 1935) و میزان تولید بذر آن بسیار بالا است. بذر آن از طرق مختلف مانند باد، آب و قرار گرفتن روی لباس انسان انتشار می‌یابد و تا ۵ سال قابلیت باروری خود را حفظ می‌کند (Spellman & Gunn, 1976). رویشگاه این گیاه عمدتاً در حاشیه دریاچه‌ها و رودخانه‌ها، بستر نهرهای خشک شده، جنگل‌ها و رویشگاه‌های طبیعی درختان به ویژه مرکبات، اراضی زراعی، باغ‌ها (تاکستان‌ها، مرکبات، انواع باغ‌های میوه، تمشک، زیتون)، فضای سبز شهری، حاشیه جاده‌ها و ریل قطار، سایر سطوح مسکونی و اراضی بایر در خاک‌های مرطوب شنی و لومی با pH اسیدی، خنثی و قلیایی است (EPPO, 2012). این گونه خواص دارویی متعددی داشته و برگ، ریشه و میوه آن بصورت جوشانده جهت افزایش شیر و همچنین شیرابه سمی آن که باعث سوزش پوست می‌گردد بعنوان یک ماده ضد درد برای تسکین درد دندان بکار می‌رود (Martínez-Crovetto, 1981). در آمریکای جنوبی و آفریقای جنوبی از شیرابه آن جهت درمان زگیل استفاده می‌شود. کنترل این گیاه برای مقیاس‌های کوچک به روش حذف فیزیکی کامل دانه‌رست‌ها و گیاهان کوچک به همراه ریشه، قطع ساقه گیاهان بالغ در سطح زمین و از بین بردن بخش‌های مختلف به خصوص میوه و همچنین پایش مستمر مکان‌های پاک‌سازی شده جهت جلوگیری از رشد مجدد آن است. کنترل زیستی آن توسط شته‌های *Aphis nerri* و *Toxoptera aurantii* که در مواردی بر روی این گیاه دیده شده‌اند و همچنین قارچ‌های پاتوژن گیاهی مثل *Phytophthora palmivora* قابل بررسی بوده و نیز ویروس *Araujia mosaic virus* و نوعی قارچ زنگی بنام *Aecidium asclepiadinum* که باعث بروز بیماری در جنس *Araujia* می‌گردند پتانسیل کنترل این گیاه را دارند. (Winks & Fowler, 2000).

الگوی انتشار در ایران: اراضی رها شده و جلگه‌ای، حاشیه جاده ها، سواحل دریا و باغات مرکبات در پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- h)

زمان گلدهی: خرداد- شهریور

***Lonicera caprifolium* L.**

پیچ امین الدوله بومی جنوب شرق اروپا بوده و بیش از یک قرن پیش از اروپا وارد ایران شده و در باغ امین الدوله که نخستین پارک تهران بوده است استقرار یافته است (Majlesi Koupaie et al., ۲۰۱۳). این گیاه درختچه‌ای برگ‌ریز، پیچنده و بالارونده با ساقه های توخالی است که در آلبانی، رومانی، ترکیه و قفقاز نیز کاشته شده است (Mozaffarian, 2005) (شکل ۲- i). نخستین بار توسط قهرمان و اغوستین (۱۳۵۷) در منطقه بین کرج و چالوس گزارش شده است. این گیاه در خاکهای سبک (شنی)، متوسط (لومی)، سنگین (گلی) و نیز در خاک های اسیدی، خنثی، قلیایی و ترجیحا مرطوب رشد می‌کند. این گیاه در مناطق شمال شرقی آمریکای شمالی به گونه‌ای بومی‌شده مبدل شده است. در مناطق کمی گرم و آفتابی رشد می‌کند و ریشه‌های آن خاک‌های خنک را ترجیح می‌دهد. به‌علاوه برای رشد مناسب به نور کافی نیاز دارد. میوه‌ها در برخی مناطق مصرف خوراکی دارد و به مقدار کم خورده می‌شود (Kunkle, 1984). و از دم کرده گل‌های بسیار معطر به‌عنوان دمنوش استفاده می‌شود. برگ‌ها و گل‌ها ضد اسپاسم، نرم‌کننده و خلط‌آور و مدر بوده و در درمان کولیت نقش دارد (Chiej, 1984). کنترل این گیاه در مقیاس‌های کوچک از طریق حذف فیزیکی، قطع امتداد رویشی گیاه و از بین بردن ریشه‌ها است. به‌علاوه، جنس *Lonicera* میزبان چندین گونه قارچی نظیر *Kabatia lonicerae*, *Cercospora lonicerae* و *Rhabdospora lonicerae* و *Rhytisma lonicericola* بوده که رشد گیاه را در شرایط مختلف تحت تاثیر قرار داده و باعث بروز بیماری در گیاه می‌شوند، بنابراین پتانسیل کنترل زیستی این گیاه را داشته و نیاز به مطالعات و بررسی بیشتر دارند (Standish, 2002).

الگوی انتشار در ایران: مناطق جنگلی و جلگه‌ای در پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- i)

زمان گلدهی: اردیبهشت- مرداد

ب- گیاهان معرفی شده به زیستگاه‌های آبی ایران

***Azolla filiculoides* Lam.**

آزولا سرخس آبی متعلق به تیره *Salviniaceae* است. این گونه آبی سریعالرشد در دریاچه‌ها، مخازن آب، تالاب‌ها، کانال‌های آبرسانی آب‌های راکد یا آب‌های با جریان ملایم رشد می‌کند (McConnachie et al., 2003) و بومی مناطق معتدله گرم، گرمسیری قاره آمریکا، آسیا و استرالیا است (شکل ۲- j). این گونه به‌صورت همزیست با جلبک تثبیت‌کننده ازت آنابنا (*Anabaena azollae*) رشد می‌کند. آزولا به بسیاری از کشورهای آفریقایی، اروپایی، آسیایی و آمریکایی معرفی شده و به شکل

یک گونه مهاجم درآمده است. این گونه غالباً از طریق پرندگان آبی مانند مرغابی یا از طریق انسان (خواسته یا ناخواسته) مانند توازن کشتی ها، وسایل ورزش‌های آبی و رها شدن توسط نگهداری کنندگان اکواریوم‌ها به مناطق مختلف جهان انتقال یافته است (Akumolafe & Rahmad, 2018). این گونه با تغییر در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب، سبب تغییر در ترکیب و تنوع گیاهان آبی غوطه‌ور و جلبک‌ها می‌گردد (Janes *et al.*, 1996). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد محدودیت سفر سبب کاهش رشد این گونه می‌گردد (Kitoh *et al.*, 1993). این گونه در دمای بهینه ۲۰-۱۵ درجه سانتیگراد و شدت تابش کم رشد می‌نماید (Tung & Watanabe, 1983). اما بهترین شرایط برای تثبیت ازت در آن دمای ۲۵ درجه سانتیگراد است (Wong *et al.*, 1978). این در حالی است که این گونه دماهای ۱۰- تا ۱۵- درجه سانتیگراد را نیز تحمل می‌کند و در شرایط انجماد کامل آب تا یک هفته زنده می‌ماند. دمای بالاتر از ۱۰ درجه سانتیگراد برای رویش اسپور ضروری است. مطالعات انجام‌شده نشان‌دهنده سرعت بالای تولیدمثل این گیاه است به شکلی که زی‌توده ۸ کیلوگرمی آزولا می‌تواند ۸۵۰۰۰ مگاسپور و ۳۸۰۰۰۰ میکروسپوروکارپ تولید نماید (Janes, 1998). روش‌های کنترل مکانیکی، علف‌کش‌ها و کنترل زیستی توسط قارچ‌ها و نوعی از سخت‌بال‌پوشان (*stenopelmus rufinasus*) انجام شده است (McConnachie *et al.*, 2003, 2004). این گونه در سال ۱۳۶۶ از کشور فیلیپین جهت تثبیت ازت در مزارع برنج وارد کشور ایران شده (Banihashemi, 2014) و در حال حاضر در تالاب انزلی به‌عنوان یک گونه مهاجم سبب تأثیرات نامطلوب در کیفیت آب و ایجاد مشکلات اکولوژیکی برای اکوسیستم تالاب شده است (فیلی زاد، ۱۳۸۱). در بسیاری از کشورهای جنوب شرق آسیا با افزایش تثبیت نیتروژن سبب افزایش بازده تولید محصول برنج شده است (Moore, 1969; Mandal *et al.*, 1999; Choudhury & Kennedy, 2004; De Macale & Vlek, 2004; Nayak *et al.*, 2004; Kimura, 2005). از زی‌توده این گیاه به عنوان کود زیستی جهت پرورش گیاهان زینتی (جهانی و همکاران، ۱۳۹۷)، کود زیستی جهت افزایش محصول گندم (Ripley *et al.*, 2003) افزایش عملکرد مزارع برنج و کاهش رشد علف‌های هرز مزارع برنج (نیک نفس و همکاران، ۱۳۸۸)، منبع پروتئین گیاهی جهت تغذیه ماهی‌های زینتی (حافظیه و همکاران، ۱۳۹۹) استفاده می‌شود. علف‌کش‌های خانواده پی پریدیلیوم نظیر پاراکوات برای کنترل آن بکار گرفته شده است. توقف ورود فاضلاب و پساب‌های غنی‌شده با حضور آن رابطه مثبت دارد (فیلی زاد، ۱۳۸۱). به‌علاوه علف‌کش اکسادیازل جهت کنترل آزولا و افزایش عملکرد مزارع برنج استفاده شده است (جلیلی و گنج آبادی، ۱۳۹۶). کاربرد اسیدهای چرب موجود در آن جهت استفاده در دیزل‌های زیستی اثبات شده است (Salehzadeh *et al.*, 2014). مطالعات مدل‌سازی آشیان اکولوژیک نشان می‌دهد که قلمرو انتشار این گونه در طی سال‌های ۲۰۵۰-۲۰۸۰ میلادی در طی سناریوهای خوشبینانه و بدبینانه کاهش می‌یابد (Rodriguez-Merino, 2019). این گونه به‌عنوان یک ارگانیزم موثر در فرایند گیاه‌پالایی در حذف فلزات سنگین به‌ویژه سرب، کروم، کادمیوم شناخته شده است (Gardea *et al.*, 2005; Stepniewska *et al.*, 2005). به‌علاوه سبب حذف معنادار فسفر و نیتروژن از آب‌های آلوده می‌گردد (Shiny *et al.*, 2004; Gardea *et al.*, 2005; Stepniewska *et al.*, 2005; Golzary *et al.*, 2018). به‌دلیل سرعت رشد بالا و دو

برابر شدن زی توده آن در طی ۷-۱۰ روز، استفاده از روش‌های کنترل مکانیکی و برداشت بسیار دشوار بوده و از کارایی مناسبی برخوردار نیستند. استفاده از دشمنان زیستی آن چون برخی از سخت‌بال‌پوشان برگ‌خوار (Hill, 1998; McConnachie *et al.*, 2003, 2004) و قارچ‌های آفت (Barreto *et al.*, 2000) در کنترل زیستی آن بسیار موثر بوده است.

الگوی انتشار در ایران: کانال‌های آب، شالیزارها، تالاب‌ها و آب‌بندان‌های پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- j)

زمان گلدهی: خرداد- تیر

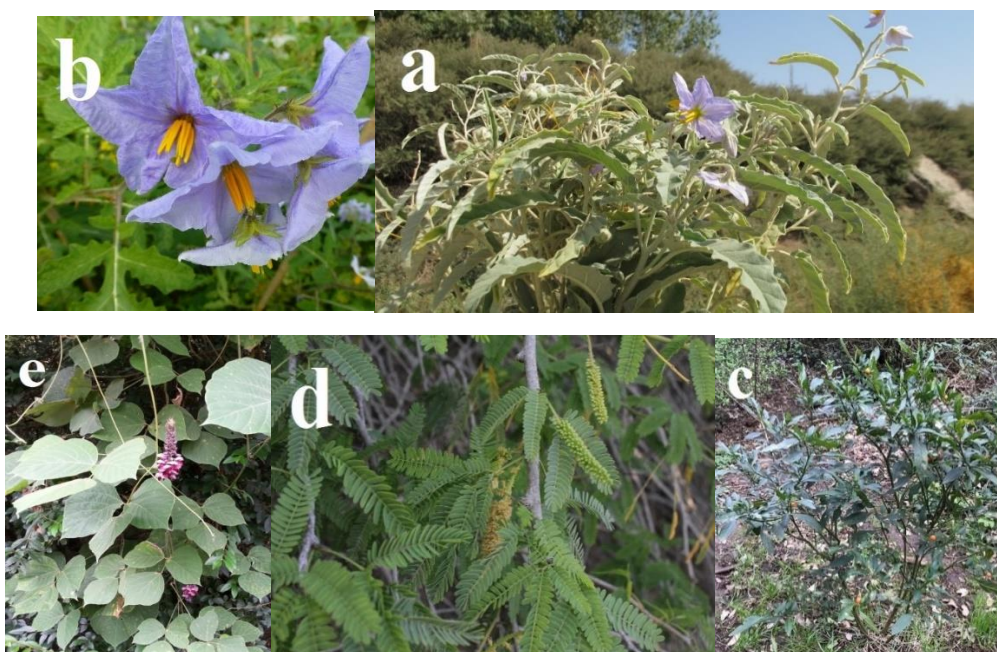
***Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.**

سنبل آبی گونه‌ای با منشاء آمازون به‌عنوان یکی از ۱۰۰ گیاه مهاجم دنیا توسط اتحادیه جهانی حفاظت معرفی شده است (Lowe *et al.*, 2000). این گونه دارای ساختار ریشه‌ای پیچیده، نرخ تولیدمثلی بالا و قابلیت تولید زی‌توده‌های متراکمی مشتمل بر دو میلیون گیاه در هکتار است (Villamagna & Murphy, 2010) (شکل ۲- k). زیستایی بذره‌های آن بین ۲۰-۵ سال و انتقال آن توسط پرندگان تا صدها کیلومتر و توسط پستانداران نیز گزارش شده است. جریان باد به‌عنوان عامل بعدی در انتشار بذرها شناخته شده است (Frezina, 2013). قدرت جذب و بارگیری بالای ترکیبات غذایی آب به ویژه فسفر و نیتروژن سبب رشد سریع و زیاد آن می‌گردد که سبب کاهش جذب نور توسط آبزیان، کاهش فیتوپلانکتون‌ها و زئوپلانکتون‌ها، کاهش اکسیژن آب، کاهش تنوع آبزیان، کاهش تنوع و غنای گونه‌ای و کاهش تنوع ژنتیکی و اکوسیستمی می‌گردد (Dereje *et al.*, 2017). به‌علاوه مرگ سنبل آبی و تجمع زی‌توده آن در شرایط فقدان اکسیژن سبب گسترش واکنش‌های بی‌هوازی، تولید گازهای کشنده و کاهش کیفیت آب می‌گردد (Dereje *et al.*, 2017). همچنین میزان تبخیر و تعرق به‌دلیل سطح بزرگ برگ‌های این گیاه در اکوسیستم‌های اشغال شده توسط آن به‌مراتب از اکوسیستم‌های آبی باز و بدون سنبل آبی بالاتر است (Gopal, 1987). این گونه به‌عنوان گونه مهاجم، در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و معتدله پنج قاره دنیا گسترش یافته است (Villamagna & Murphy, 2010). این گونه برای اولین بار توسط Mozaffarian و Yaghoubi (2015) در تالاب عینک رشت گزارش شده است. گسترش این گیاه منجر به پیامدهای اکولوژیکی و اقتصادی گسترده‌ای در سطح جهان شده است (Kull *et al.*, 2014). این گونه با کاهش نور و اکسیژن در اکوسیستم‌های آبی، سبب کاهش کیفیت آب، افزایش شدت تبخیر و در نهایت اثرات مخرب بر فون و فلور می‌گردد. در بسیاری از زیستگاه‌های آبی سبب کاهش رشد گونه‌های آبی چون *Ceratophyllum demersum* L., *Myriophyllum spicatum* L. شده است (Zhou *et al.*, 2017). به‌علاوه سبب ایجاد مانع در فعالیت‌های صید آبزیان، اختلال در هیدرولوژی و تأثیرات منفی در جوامع محلی می‌گردد (Calvert, 2002). گیاه سنبل آبی سبب ایجاد پناهگاه‌های خرد جهت آفات و ناقلین بیماری چون حلزون، پشه‌هایی چون آنوفل برای مالاریا، شیروزستما، آنسفالیت، فیلاریازیس و وبا (Plummer, 2005; Mangas-Ramirez & Elias-Gutierrz, 2004) و نیز گسترش حضور مارهای سمی گردیده است. بنابراین باتوجه به مطالب ذکر

شده در بالا، این گونه به عنوان عامل تهدید سلامت انسان نیز شناخته شده است (FAO, 2002). به علاوه مسدود کردن کانال‌ها، جلوگیری از تردد قایق‌های ماهی‌گیری و آسیب به صنعت ماهی‌گیری و مشکلات اقتصادی به جوامع محلی از سایر مشکلات اجتماعی-اقتصادی گسترش این گونه است (Degaga, 2018). گونه‌های مختلفی از نماتودها و شیوه‌های مختلف کنترل مکانیکی برای کنترل آن بکار گرفته شده است (Charudattan et al., 1996; Jianqing et al., 2001). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که شوری در کنترل رشد این گونه موثر است اما ایجاد شوری در اکوسیستم‌های آبی چالش‌های دیگری ایجاد خواهد نمود (Mathiventhan et al., 2018). گونه‌های *Neochetina eichhorina*, *N. bruchi* و نیز گونه‌هایی از بید (*Sameodes abligutalis*)، *Niphograptus albiguttalis*, *Xubida infusella* و نیز نوعی نیم‌بال (*Megamelus scutellaris*) در کنترل زیستی این گیاه موثر شناخته شده‌اند (Williams et al., 2007; Coetzee et al., 2009; Venter et al., 2012). به علاوه با برداشت این گونه و تهیه کمپوست از زی‌توده آن جهت حاصلخیزی خاک (Viveka & Grace, 2009; John, 2016) و نیز از ترکیبات موجود در آن به عنوان مکمل‌های غذایی در آبی‌پروری استفاده شده است (Kumar-Ravi et al., 2019).

الگوی انتشار در ایران: تالاب عینک و تالاب انزلی در پروانس جغرافیایی هیرکانی (شکل ۱- k)

زمان گلدهی: خرداد- تیر

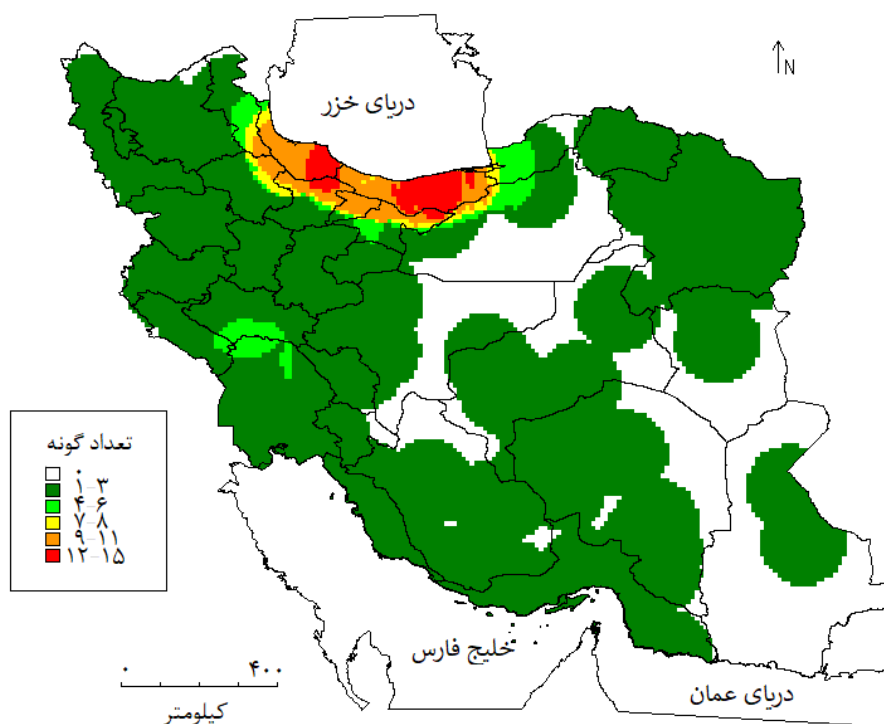




شکل ۲: تصاویر گیاهان معرفی شده مهاجم در ایران: (a) *Solanum eleagnifolium* Cavanilles (b) *Solanum sisimbryifolium* (c) *Lam. Solanum pseudocapsicum* L. (d) *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (e) *Alianthus* (f) *Pueraria montana* (Lour.) Merr. (g) *altissima* (Mill.) Swingle (h) *Sida rhombifolia* L. (i) *Araujia sericifera* Brot. (j) *Lonicera caprifolium* L. (k) *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. (l) *filiculoides* Lam.

غنای گونه‌ای گیاهان معرفی شده به ایران

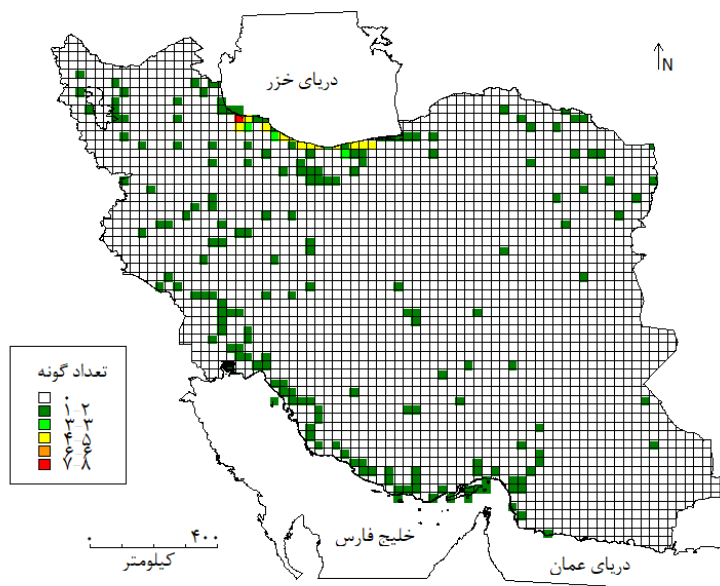
نقشه غنای گونه‌ای طیفی نشان می‌دهد که نقطه داغ غنای گونه‌ای (hotspots of species richness) گیاهان معرفی شده در استان مازندران و گیلان و نیز بخش‌های کوچکی از شمال استان تهران و قزوین قرار دارد (رنگ قرمز) و بخش عمده فلور این منطقه تحت تاثیر گیاهان معرفی شده به‌ویژه گونه‌های مهاجم قرار گرفته است و پس از آن نقاط داغ دیگری در بخش‌هایی از استان‌های اردبیل، زنجان و البرز رخ داده است (رنگ نارنجی). بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که نقاط داغ غنای گونه‌ای گیاهان معرفی شده در پروانس جغرافیایی هیرکانی (استان‌های مازندران و گیلان) رخ می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۳: غنای گونه‌ای گیاهان معرفی شده به ایران (نقشه طیفی)

نقشه غنای گونه‌ای براساس روش گریدسل نشان می‌دهد که یک خانه‌گرید در استان گیلان بیشترین تعداد گونه

گیاهان مهاجم را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۴: غنای گونه‌ای گیاهان معرفی شده به ایران (نقشه گریدسل)

بحث

عدم تعادل اکوسیستمی و گسترش زیستگاه‌های تخریب‌شده از عوامل تسهیل‌کننده گسترش گونه‌های بیگانه و ایجاد پدیده تهاجم است (محرابیان، ۱۳۹۲). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گونه‌های معرفی‌شده در پروانس جغرافیایی هیرکانی از غنای بالاتری برخوردارند (شکل ۳ و ۴). به‌طوری‌که از ۲۶ گونه معرفی‌شده، ۱۸ گونه (۶۹ درصد) تنها در پروانس جغرافیایی هیرکانی انتشار دارند. این ناحیه از نظر چرای بی‌رویه دام، تغییرات کاربری اراضی، پاک‌تراشی جنگل، سیلاب و آتش‌سوزی، در طبقه کانون‌های بحرانی کشور از نظر تنوع‌زیستی طبقه‌بندی می‌گردد (Akhami et al., 2010). بر اساس تحلیل‌های منطبق با فهرست سرخ اکوسیستم‌های جهانی طبیعت (Rodriguez et al., 2014) بسیاری از این مناطق در طبقات در معرض تهدید تا آسیب‌پذیر طبقه‌بندی می‌گردند. این در حالی است که بسیاری از رویشگاه‌های آبی این مناطق در حیطه تالاب‌های بین‌المللی، ذخیره‌گاه‌های زیست‌کره و مناطق چهارگانه تحت حفاظت (بالی و بهمن‌پور، ۱۳۹۲) قرار گرفته و از پرتنوع‌ترین مناطق گیاهان آبی کشور (Mehrabian & Khajoei Nasab, 2021) محسوب می‌گردند که حضور گونه‌های غیربومی مانند آژولا و سنبل آبی در این اکوسیستم‌ها از چالش‌های مدیریت حفاظتی گونه‌های گیاهی در ایران است. به‌علاوه، سیطره انتشار گونه کهور پاکستانی به‌واسطه قدرت سازش‌پذیری و توان رقابتی بالا در میان گونه‌های غیربومی کشور از همه گسترده‌تر بوده و تقریباً در تمامی بخش‌های منطقه جغرافیایی سودانو-زامبیزین در ایران به‌ویژه پارک‌های ملی و مناطق حفاظت‌شده گسترش یافته است، بنابراین از بیشترین توان تهاجمی در کشور برخوردار است. در کنار کهور پاکستانی درخت بهشتی نیز با گستره انتشار بسیار وسیع در کشور و آسیب به زیرساخت‌های شهری و نیز نامساعد نمودن شرایط اکولوژیکی زیستگاه برای فلور بومی از گونه‌هایی است که در اولویت طرح‌های کنترل اکولوژیکی قرار دارد. گونه *Sesuvium portulacastrum* نیز در رویشگاه‌های ساحلی جنوب کشور به‌عنوان گونه زینتی معرفی شده که به‌واسطه توان انتشار بالا و قابلیت تهاجم، تهدید مهمی برای این رویشگاه‌ها محسوب می‌گردد (آخانی، ۱۳۹۵). این در حالی است که گونه *Phytolaca Americana* (سرخاب کولی) که در جنگل‌های شمال کشور انتشار دارد به‌عنوان گونه‌ای با ویژگی‌های غیرمهاجم شناخته می‌گردد. کاربردهای دارویی (Joenog et al., 2004; Karami et al., 2009) و استفاده از این گیاه در رنگرزی (فقیهان جویباری و حسینی، ۱۳۹۴) از ویژگی‌های مثبت این گیاه معرفی شده است.

کنترل و جلوگیری از گسترش گونه‌های غیربومی مهاجم به رویشگاه‌های جدید از مهم‌ترین شیوه‌های مدیریتی در برابر این تاکسون‌های خطرناک محسوب می‌گردد (Stohlgren et al., 2003). اجرای برنامه‌های قرنطینه یکی از شیوه‌های مدیریتی مهم جهت کنترل ورود گونه‌های مهاجم و بیگانه در کشور محسوب می‌شود. سازمان حفظ نباتات با استقرار بیش از ۹۰ پست قرنطینه‌ای در گمرکات، بنادر و فرودگاه‌ها ورود آفات و بیماری‌هایی را که با محموله‌ها و محصولات گیاهی وارد کشور می‌شود کنترل می‌نماید (www.ppo.ir). در اسناد مهم کشور بر حفاظت از تنوع زیستی نیز تاکید شده است. بر اساس سیاست‌های کلی

محیط‌زیست بر پیش‌گیری مؤثر از نفوذ هر گونه آلودگی‌های غیرمجاز، پایش مستمر منابع طبیعی و حفاظت از منابع ژنتیکی تاکید شده است (سیاست‌های کلی نظام جمهوری اسلامی ایران ۱۳۹۳). به‌علاوه اصل پنجاه قانون اساسی ایجاد هرگونه آلودگی در محیط‌زیست طبیعی را ممنوع اعلام نموده است (منصور، ۱۳۹۹). ارزیابی ناقلین گونه‌های بیگانه مانند باد، آب، بذرها، کشاورزی، جانوران، انسان، ابزارآلات کشاورزی و وسایل نقلیه نیز از مهم‌ترین ملاحظات پیش‌بینانه در این زمینه محسوب می‌گردند (Drake, 2009). متأسفانه عدم کنترل بذور کشاورزی، یکی از عوامل ورود گونه‌های بیگانه و گسترش بسیاری از این گونه‌ها به عنوان گونه مهاجم در کشور محسوب می‌گردد که می‌باید تحت کنترل شدیدتری قرار گیرد (قادری فر و همکاران، ۱۳۹۶). آموزش کشاورزان، مردم بومی و سایر ذی‌نفعان نقش مهمی در مدیریت گونه‌های بیگانه با قدرت تهاجمی را دارد. به‌واسطه تأثیرات منفی این گونه‌ها و تهدید امنیت غذایی، تهدید اکوسیستم‌های کشاورزی و تبعات اجتماعی-اقتصادی متعدد، کنترل، نظارت و پایش گونه‌های بیگانه با قدرت تهاجمی نیازمند هماهنگی کلیه دستگاه‌های مدیریت منابع طبیعی مانند سازمان محیط‌زیست، وزارت جهاد کشاورزی و نیز سایر بخش‌های مدیریتی مرتبط در سطح ملی و نیز استانی است.

تاکنون سه استراتژی اصلی جهت حذف گونه‌های مهاجم شناخته شده است: روش فیزیکی که گونه‌ها با روش‌های مکانیکی حذف می‌شود، روش شیمیایی که از طریق علف‌کش‌ها گونه‌ها را حذف می‌کنند و روش زیستی که صیادان یا آفات را برای کنترل گونه‌های مهاجم به کار می‌گیرند (Geesing *et al.*, 2004). شیوه‌های فیزیکی (چرای دام، سوزاندن، هرس و ریشه‌کن کردن) نیازمند صرف زمان، هزینه و نیروی انسانی گسترده است که در بسیاری از موارد از پایداری لازم برخوردار نبوده و برگشت‌پذیر است. شیوه مبارزه شیمیایی نیز به دلیل مشکلات محیط‌زیستی و مسمومیت در تنوع‌زیستی با ملاحظات همراه است. شیوه کنترل زیستی نیز به دلیل استفاده از ارگانیسم‌های زیستی، احتمال گسترش گونه‌ای مهاجم دیگر و پیامدهای زیستی آن را در پی دارد. یکی از مهم‌ترین اقدامات در زمینه مدیریت گونه‌های مهاجم تعیین اولویت‌های مدیریتی است. ارزیابی اثرات اکولوژیکی، بهداشتی و اقتصادی گونه معرفی‌شده و قابلیت تهاجم آن، میزان حساسیت و ارزش حفاظتی زیستگاهی (مناطق تنوع، مناطق اندمیسیم، اجتماعات گیاهی نادر، زیستگاه‌های حساس و شکننده) که گونه‌های بیگانه به آن معرفی شده، ارزیابی ریسک گونه‌های معرفی‌شده در سایر مناطق و نیازهای مدیریتی (دسترسی به سایت و ملزومات مدیریتی متناسب) (Randall *et al.*, 2001; Timmins & Owens, 2001) از مهم‌ترین داده‌ها جهت تعیین اولویت‌های مدیریتی این گونه‌ها است. پیش‌بینی قابلیت و نرخ گسترش، پیش‌بینی زمان گسترش و زیستگاه‌های مستعد و آسیب‌پذیر از سایر ملاحظات مدیریتی در این زمینه است. انجام مطالعات مدل‌سازی آشیان اکولوژیک یکی از ابزارهای مهم جهت ارزیابی قابلیت انتشار و میزان گستره انتشار گونه‌های مهاجم جهت مدیریت حفاظتی زیستگاه‌ها است (Aikio *et al.*, 2010; Suarez-mota *et al.*, 2016). انجام مطالعات مدل‌سازی آشیان اکولوژیک برای گونه‌هایی چون سنبل آبی (Damian & Donna, 2005)، کهور پاکستانی (Asfaw, 2012) و آژولا

(Rodríguez-Merino et al., 2019) داده‌های با ارزشی را جهت کنترل اکولوژیکی گونه‌های معرفی شده و مهاجم فراهم نموده است که الگوگیری از آن‌ها در مدیریت اکولوژیکی گونه‌های مهاجم در مناطق مختلف می‌تواند کارآمد باشد. ارزیابی ریسک گونه‌های غیربومی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اقدامات پیش‌گیرانه جهت مدیریت گونه‌های غیربومی است که شامل شناسایی، ارزیابی، گزینش و انجام اقدامات مدیریتی برای کاهش ریسک گونه‌های معرفی شده است. ارزیابی ریسک گونه‌های غیربومی شامل دوسطح است. نخست ارزیابی گونه‌های غیربومی با احتمال تهاجم و نیز شناسایی عوامل انتقال دهنده آن‌ها و دوم شیوه‌های مدیریتی پیش‌گیرانه جهت کنترل آن‌ها (NRC, 1996; Andersen et al., 2004). بنابراین این مطالعه ضمن معرفی اولویت‌های مدیریتی گونه‌های معرفی شده مهاجم راهکارهای کلی جهت مدیریت اکولوژیکی آن‌ها را معرفی نموده است تا بتواند به‌عنوان یک منبع پایه جهت برنامه‌های مدیریت تنوع زیستی کشور بکار گرفته شود.

پی‌نوشت‌ها

گونه بومی (Native species): گونه‌های وحشی که بدون دخالت انسان در یک یا تعدادی از زیستگاه‌های معین انتشار داشته و زادآوری طبیعی دارند.

گونه بومی محدودشده (Endemic): گونه‌های وحشی که به‌دلیل انزوای جغرافیایی، شرایط کلان و خرد طبیعی مانند خاک، اقلیم و زمین شناسی به زیستگاه‌های معینی محدود شده‌اند که شامل اندمیک‌های دیرین (گونه‌هایی که در گذشته انتشار وسیع داشته و امروز محدود شده‌اند) و گونه‌های اندمیک جدید (که جدیداً در اثر فرایندهای تکاملی ایجاد شده‌اند و هنوز فرصت انتشار نیافته‌اند) هستند.

گونه‌های بومی‌شده (Naturalized): گونه‌های معرفی‌شده‌ای که از زیستگاه‌هایی خارج از دامنه انتشار خود به زیستگاه‌های جدید معرفی شده‌اند و با ایجاد یک جمعیت مستقل (غالباً از فرایندهای طبیعی و یا با اقدامات انسانی) حداقل به مدت ۱۰ سال زادآوری (رویشی یا زایشی) داشته باشند.

گونه‌های غیربومی (Alien, Exotic, non native or Introduced species): گونه‌هایی را دربر می‌گیرند که فراتر از دامنه زیستگاه طبیعی خود انتشار دارند و معمولاً بر اثر فعالیت‌های انسانی یا وقایع تصادفی به زیستگاه‌های جدید گسترش یافته‌اند.

گونه‌های مهاجم (Invasive species): گروهی از گونه‌های غیربومی که به‌دلیل تغییرات شرایط اکولوژیکی یا پتانسیل ژنتیکی ویژه خود در زیستگاه طبیعی جمعیت‌های بارور گسترده‌ای تولید می‌کنند و غالباً سبب اختلالات و عدم تعادل

اکوسیستمی ویژه مانند کاهش جمعیت یا حذف گونه‌های بومی، اختلال در چرخ‌های هیدرولوژیکی و تغییر رژیم‌های آتش‌سوزی در زیستگاه‌ها می‌گردند.

گونه هرز (Weed): گیاهان هرز مجموعه‌ای از گونه‌های بومی و غیربومی اند که غالباً در زیستگاه‌های مطلوب انسانی رشد نموده و سبب ایجاد اختلال، تزاخم و زیان به منافع انسانی می‌گردند. بسیاری از اعضای این گروه به عنوان علف‌های هرز مزارع کشاورزی سبب مشکلات اقتصادی متعددی می‌گردند.

منابع

- اسدی، م. (۱۳۹۸-۱۳۶۳). فلور ایران (شماره ۱ تا ۱۴۴)، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
- اعلایی طالقانی، م. (۱۳۸۴). ژئومورفولوژی ایران. انتشارات قومس، ۳۶۰ ص.
- امینی اشکوری، ط.، جلیلی، ع. و زارع، ح. (۱۳۹۹). بررسی گونه‌های مهاجم و خطرات تهاجمی و زیستی آنها بر تنوع زیستی رویش‌های هیرکانی و معرفی گونه *Ipomoea indica* به عنوان گونه مهاجم برای اولین بار از ایران. نشریه طبیعت ایران، دوره ۵(۳): ۳۵-۴۸.
- آخانی، ح. (۱۳۹۵). گیاهان و پوشش گیاهی شمال غربی خلیج فارس: سواحل و جزایر خور موسی، ماهشهر و مناطق مجاور، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۱۲ ص.
- جلیلی، ا. و گنج آبادی، ف. (۱۳۹۶). مطالعه اثر برهمکنش علفکش و اسید هیومیک در کنترل آزولا به منظور افزایش عملکرد برنج (*Oryza Sativa*). مجله دانش علفهای هرز، ۱۳: ۱۴۵-۱۳۵.
- جهانی، ح.، تدین، م.س. و معاف پوریان، غ. (۱۳۹۷). تاثیر کودهای زیستی جلبک دریا و آزولا بر گیاه زینتی اطلسی. مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی، ۱۰: ۱-۹.
- حافظیه، م.، صیدگر، م.، قائی، ع.، محمدی، م. و آبکنار، ع.م. (۱۳۹۹). استفاده از پودر آزولا (*Azolla filiculoides*) تالاب انزلی به عنوان منبع پروتئین گیاهی در تغذیه ماهی زینتی سیچلاید ایرانی (*Iranocichla hormuzensis*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۱۲: ۳۳۹-۳۳۱.
- خاتم ساز، م. (۱۳۷۷). فلور ایران تیره سیب زمینی جلد (۲۴)، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

رحمانیان، س.، اجتهادی، ح.، فرزاد، م. و معماریانی، ف. (۱۳۹۸). لزوم تجدید نظر در کاربرد واژه "مهاجم" توسط محققان اکولوژی ایران. نشریه علمی پژوهشی مرتع، سال سیزدهم، شماره چهارم، ۶۹۰-۶۳۷.

ساجدی، س. و امینی راد، م. (۱۳۹۳). نخستین گزارش علف هرز مهاجم *Araujia* از ایران. رستنیها ۱۵: ۷۴-۷۱.

سلطانی پور، م.ا. (۱۳۷۲). بررسی ویژگی های بوم شناختی کهور آمریکایی در استان هرمزگان. مرکز تحقیقات منابع طبیعی هرمزگان.

شرکت مهندسين مشاور مهاب قدس. (۱۳۹۷). گزارش ارزیابی اکولوژیکی رودخانه کن. شرکت مهندسين مشاور مهاب قدس.

ضعیفی، م. (۱۳۷۵). بررسی محدودیت های گونه کهور آمریکایی در استان هرمزگان. مرکز تحقیقات منابع طبیعی هرمزگان.

طهماسبی، م.ر. (۱۳۷۹). ارزیابی بوم شناختی کهور پاکستانی و بررسی قابلیت های آن برای تهیه کمپوست در استان هرمزگان. اقتصاد کشاورزی: ۸: ۱۹-۱.

عرب سلمانی، م.، فراهانی، ا. و سعیدی، ح.ر. (۱۳۹۳). معرفی و شناسایی علف هرز تاج ریزی برگ نقره ای در مزارع پنبه. پژوهش های پنبه ایران. ۲: ۵۴-۳۵.

فقیهان جویباری، م. و بارانی، ح. (۱۳۹۴). بررسی تاثیر دندانه ها و کسب شید قرمز با گیاه سرخاب کولی، دانشگاه بیرجند.

فیلی زاده، ی. (۱۳۸۱). بررسی اکولوژیکی رشد بیش از اندازه آذولا در تالاب انزلی و چگونگی کنترل آن. مجله منابع طبیعی ایران. ۵۵: ۸۱-۶۵.

قادری فر، ف.، گرزین، م. و عالیمقام، م. (۱۳۹۶). بررسی روند تحقیقات بذر در ایران: از گذشته تا حال. نشریه تولید گیاهان زراعی، ۵۰: ۳۳-۱۰.

کوچکی، ع.، قربانی، ر.، اسدی، ق.، ملتی، ف. و فلاح پور، ف. (۱۳۹۳). شناسایی و ارزیابی گونه های مهاجم در بوم سازگان های زراعی و طبیعی استان های خراسان با توجه به تغییرات اقلیمی جهانی. مجله بوم شناسی کشاورزی ۴(۲): ۸۱-۹۳.

محرابیان، ا.ر. (۱۳۹۲). مبانی حفاظت از گیاهان: چالش ها و روش ها، انتشارات دانشگاه شهید بهشتی.

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی- دوره ۳۵، شماره ۳، پیاپی ۶۹، پاییز ۱۴۰۰/۱۴۳

مصلح آرانی، ا.، سلیمانی، ز. و سودایی زاده، ح. (۱۳۹۱). بررسی تاثیر تنش خشکی در سه گونه کهور در مراحل جوانه زنی، دانه رست و بلوغ. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۲۰: ۱۳۶-۱۲۳.

مظفریان، و. (۱۳۸۲). رده بندی گیاهی: مرفولوژی تاکزونومی (جلد ۱)، انتشارات فرهنگ معاصر. ۵۱۲ ص.

منصور، ج. (۱۳۹۹). قانون اساسی جمهوری اسلام ایران، انتشارات دوران، ۱۲۷ ص.

میرشکار، ا. (۱۳۷۵). بررسی خصوصیات اکولوژیک کهور پاکستانی در استان سیستان و بلوچستان. مرکز تحقیقات منابع طبیعی سیستان و بلوچستان.

نجفی تیره شبانکاره، ک. (۱۳۶۸). جمع بندی اجمالی کاشت گونه کهور آمریکایی در سواحل جنوب کشور با تاکید بر محدودیت‌های آن. مرکز تحقیقات منابع طبیعی هرمزگان.

نیک نفس، پ.، فیلی زاده، ی. و ناجی، ا.م. (۱۳۸۸). بررسی اکولوژیکی گیاه آژولا و کلش جو بر جوانه زنی و رشد گیاهچه علف‌های هرز شالیزارهای شمال ایران سومین همایش علوم علف‌های هرز ایران، بابلسر، ایران.

Abramovitz, J.N. (1983). *Pueraria lobata* Willd. (Ohwi) Kudzu: Limitations to Sexual Reproduction. Master's Thesis, University of Maryland, College Park, MD.

Afshar Harb, A. (1979). The stratigraphy, tectonics and petroleum geology of the Kopet Dag region, Northern Iran.

Aikio, S., Duncan, R.P. and Hulme, P.E. (2010). Herbarium records identify the role of long distance spread in the spatial distribution of alien plants in New Zealand. *Journal of Biogeography*. 37:1740–1751.

Akhani, H., Djamali, M., Ghorbanalizadeh, A. and Ramezani, E. (2010). Biodiversity of Hyrcanian Relict Forests, N. Iran: An Overview of the Flora, Vegetation, Paleoecology and Conservation. *Pakistan Journal of Botany*, 42: 231–258.

Akomolafe, G.F. and Rahmad, Z.B. (2018). A Review on Global Ferns Invasion: Mechanisms, Management and Control. *Journal of Research in Forestry, Wildlife & Environment*, 10: 42–54.

Alban, L., Matorel, M., Romero, J., Grados, N., Cruz, G. and Felker, P. (2002). Cloning of elite multipurpose trees of the *Prosopis juliflora/pallida* complex in Piura, Peru. *Agrofor. Syst*, 54: 173–182.

Amini, T., Zare, H., and Pakravan, M. (2003). *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae), a new Record for the flora of Iran. *Iranian Journal of Botany*, 10 (1): 55–57.

- Andersen, M.C., Adams, H., Hope, B. and Powell, M. (2004). Risk Assessment for Invasive Species. *Risk Analysis*, 24: 1–7.
- Badalamenti, E. and LaMantia, T. (2013). Stem-injection of herbicide for control of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle: a practical source of power for drilling holes in stems. *IFOREST*, 6:123–126.
- Balogh, L., Dancza, I., Király, G. (2004). Actual list of neophytes in Hungary and their classification according to their success. In: Mihály B, Botta-Dukát Z, editors. *Biological invasions in Hungary: Invasive plants*. Budapest: Természet BÚVÁR Alapítvány Kiadó. pp. 61–92.
- Banihashemi, Z. (2014). Rhizoctonia Blight of *Azolla filiculoides* in rice paddy fields in Northern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 50:189–190.
- Baracho, G.S. (1998). Taxonomy of the genus *Sida* L. section *cordifolia* (DC.) Fryxell (Malvaceae) in Brazil. Dissertation (Master in Botany), Recife-PE.
- Barreto, R., Charudattan, R., Pomella, A. and Hanada, R. (2000). Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Protection*, 19: 697–703.
- Bassett I.J. and Munro D.B. (1985). The biology of Canadian weeds: *Solanum ptycanthum* Dun, *S. nigrum* L. and *S. sarrachoides* Sendt. *Canadian Journal of Plant Science*, 65: 401–414.
- Batten, A. and Bokelmann, H. (1966). *Wild flowers of the Eastern Cape Province*. Cape and Transvaal Printers Limited Cape town p.129.
- Bidarlou, M., Jalili, A. and Zamamani, R. (2019). First record of *Pistia stratiotes* (water lettuce) from Gilan province (North of Iran). *Rostaniha*, 20(2):182–187.
- Boericke, W. (1927). *Pocket Manual of Homeopathic Materia Medica* IX Ed., Boericke and Runyon, N.Y. 598 pp.
- Bouhache, M. (2010). *Solanum elaeagnifolium* Cav.: a threat to agriculture and environment in mediterranean region. *Moroccan Journal of Plant Protection* 1: 1–11.
- Boyd, J.W. and Murray, D.S. (1982). Growth and development of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*). *Weed Science*, 30:238–243.
- Boyd, J.W., Murray, D.S. and Tyrl, R.J. (1984). Silverleaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, Origin, Distribution, and Relation to Man. *Economic Botany*, 38: 210–217.
- Brunel, S. (2011). Pest risk analysis for *Solanum elaeagnifolium* and international management measures proposed. *EPPO Bull*, 41:232–42.

- Buchmann, S.L., Jones, C.E. and Colin, L.J. (1977). Vibratile pollination of *Solanum douglasii* and *S. xanti* (Solanaceae) in southern California. *Wasmann Journal of Biology*, 35: 1–25. Sandra Knapp¹, Eva Sagona¹, 2.
- Byrne, M.J., Currin, S. and Hill, M.P. (2002). The influence of climate on the establishment and success of the biocontrol agent *Gratiana spadicea*, released on *Solanum sisymbriifolium* in South Africa. *Biological Control*, 24: 128–134.
- Cardoso, V.J.M. (1990). Germination studies on dispersal units of *Sida rhombifolia* L. *Revista brasileira de Botanica*, 13(2): 83–88.
- Celesti-Grapow, L., Alessandrini, A., Arrigoni, P.V., Banfi, E., Bernardo Bovio, M., Brundu, G., Cagiotti, M.R., Camarda, I., Carli, E., Conti, F. and Fascetti, S. (2009). Inventory of the non-native flora of Italy, *Plant Biosystems*, 143: 386–430.
- Charudattan, R., Labrada, R. Center, T.D. and Kelly-Begazo, C. (eds.) (1996). *Strategies for Water Hyacinth Control*. FAO, Rome, Italy.
- Chiej, R. (1984). *Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald, ISBN 0–356–10541–5 Covers plants growing in Europe. Also gives other interesting information on the plants. Good photographs.
- Clout, M.N. and Williams, P.A. (2009). *Invasive Species Management: A Handbook of Principles and Techniques (Techniques in Ecology & Conservation)* 1st Edition, Oxford University Press Pp 320.
- Coleman, E. (1935). Pollination in Australia of *Araujia sericifera* Brothero. *The Victorian Naturalist* 52: 3–7.
- Constán-Nava, S., Bonet, A., Pastor, E. and José Lledo, M. (2010). Long-term control of the invasive tree *Ailanthus altissima*: insights from Mediterranean protected forests. *Forest Ecology and Management*, 260:1058–1064.
- Coppock, D.L., Aboud, A.A. and Kisoyan, P.K. (2005). Agro-pastoralists' Wrath for the Prosopis Tree: the Case of the Il Chamus of Baringo District, Kenya. Research Brief 05–02–PARIMA. Global Livestock Collaborative Research Support Program. University of California Davis, 3 pp.
- Cox, G.W. (2004). *Allien Species nad Evolution: The Evolutionary Ecology of Exotic Plants, Animals, Microbes, and Interacting Native Species*. Island Press Pp 400.
- D'arcy, W.G. (1974). *Solanum* and Its Close Relatives in Florida. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61 (3): 819–867.
- De Barros, N.A.M.T, Bai, C.A.G. and Fonseca, F.C.E. (1988). Use of *Prosopis juliflora* (Sw) DC and cassava (*Manihot utilissima* Pohl) for confined sheep feeding during the dry season. In: Mario A. Habit and Julio C. Saavedra (eds): *The current state of knowledge on Prosopis juliflora*. 1988. II International Conference on

- Prosopis. 25th-29th August (1986), Recife, Brazil. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Plant Production and Protection Division.
- De Pauw, E., Ghaffari, A. and Ghasemi, V. (2004). Agroclimatic Zones Map of Iran. Explanatory notes. Technical Report, ICARDA, Syria and DARI, Iran, p 45. (Link https://dl.dropboxusercontent.com/u/33140444/Publications/ACZ_Map_Iran_explanatory%20notes.pdf)
- Degaga, A.H. (2018). Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Biology and its Impacts on Ecosystem, Biodiversity, Economy and Human Well-being. Journal of Life Science and Biomedicine, 8: 94–100.
- Dereje, T., Erkie, A., Wondie, Z. and Brehan, M. (2017). Identification of impacts, some biology of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its management options in Lake Tana, Ethiopia. Net Journal of Agricultural Science, 5: 8–15.
- Dewan, M.L. and Famouri, J. (1961). The soils of Iran. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Didham, RK, Tylianakis, JM and Hutchison, MA. (2005). Are invasive species the drivers of ecological change? Trends Ecology and Evolution, 20:470–474.
- Drake, E.J. (2009). Management of Invasive Weeds. Springer Sciences.
- Dubadghao, P.M. (1949). Seed setting in the Kudzu vine, *Pueraria thunbergiana*. Curr. Science, 18: 379–380.
- Dunbar, K.R. and Facelli, J.M. (1999) The impact of a novel invasive species, *Orbea variegata* (African carrion flower), on the chenopod shrublands of South Australia. Journal of Arid Environments, 41: 37–48.
- Durigan, G., Ivanuskas, N.M., Zakia, M.J. and de Abreu, R.C.R. (2013). Control of Invasive Plants: Ecological and Socioeconomic Criteria for the Decision Making Process Natureza & Conservação. 11:23–30.
- El-Keblawy, A. and Al-Rawai, A.W. (2007). Impacts of the invasive exotic *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. on the native flora and soils of the UAE. Plant Ecology, 190:23–35.
- EPPO. (2007). *Solanum elaeagnifolium*. Bulletin OEPP/EPPO, 37: 236–245.
- EPPO. (2012). *Araujia sericifera* (Apocynaceae), Cruel plant. EPPO RS 2008/068. https://www.eppo.int/INVASIVE_PLANTS/observation_list/Araujia_sericifera.htm.
- Eskandari, M. and Abdi Fouladkolaei, N. (2020). *Solanum viarum*, a new invasive plant for Iran. Rostaniha, 21(2): 299–302
- Eslami, B. and Naqinezhad A. (2011). A new shrubby *Solanum* (Solanaceae) species for the flora of Iran. Iranian Journal of Botany, 12:1–3.
- ESRI. (2000). ArcView Gis Ver. 3.2a. Environmental Systems Research Institute Inc., California.

- Fadaie, F., Attar, F. and Ghahreman, A. (2006). A new record of *Aizoaceae* (*Sesuvium verrucosum* Raf.) for the Flora of Iran. *Iranian Journal of Botany*, 12 (1): 87–89.
- FAO .(2002). Management of problematic aquatic weeds in Africa FAO efforts and achievements during the period 1991–2001, Rome, Italy.
- Felker, P. and James, M. (editors). (1996). *Prosopis*: semi-arid fuel wood and forage: tree building consensus for the disenfranchised. A workshop. 13th–15th march, 1996. US National Academy of Science.
- Ferro, E.A., Alvarenga, N.L., Ibarrola D.A., Hellion – Ibarrola, M.C. and Ravelo, A.G. (2005). A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots. *Fitoter.* 76: 577 – 579.
- Frezina, N.C.A. (2013). Assessment and utilization of water hyacinth in the water bodies of Tamil Nadu. *IJSRP*, 2: 58–77.
- Galal, A., Raman, V. and Khan, I.A. (2015). *Sida cordifolia*, a Traditional Herb in Modern Perspective—A Review. *Current Traditional Medicine*, 1:5–17.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., De La Rosa, G. and Parsons, J.G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews*, 249: 1797–1810.
- Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N. and Travers, S.E. (2006). Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 44:489–509.
- Ghorbani, M. (2013). *Economic geology of Iran* (Vol. 581). Berlin: Springer.
- Golzary, A., Tavakoli, O., Rezaei, Y. and Karbassi, A.R. (2018). Wastewater Treatment by *Azolla filiculoides* (A Study on Color, Odor, COD, Nitrate, and Phosphate Removal).
- Gopal, P. (1987). *Aquatic Plant studies 1: Water hyacinth*. Netherlands Elsevier Science Publishers B. V.
- Groth, M.Z., Belle, C., Cocco K.L.T., Kaspary T.E., Casarotto G., Cutti L. and Schmitt J. (2017). First report of *Meloidogyne enterolobii* infecting the weed Jerusalem cherry (*Solanum pseudocapsicum*) in Brazil. *Plant Disease*, 101: 510.
- Hailu, S., Teketay, D. and Assefa, F. (2004). Some biological characteristics that foster the invasion of *Prosopis juliflora* (SW.) DC. At Middle Awash Rift valley area, north-eastern Ethiopia, NorthCentral. *Weed Science Proceedings*, 59:118.
- Hamouda, A.B., Zarrad, K., Laarif, A. and Chaieb, I. (2015). Insecticidal effect of *Solanum elaeagnifolium* extracts under laboratory conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 3: 187–190.

- Heap, J., Honan, I. and Smith, E. (1997). Silverleaf Nightshade: A Technical Handbook for Animal and Plant Control Boards in South Australia. Primary Industries South Australia, Animal and Plant. Control Commission, Naracoorte (AU). Soil and Water Research Institute, SWRI (2000) Soil resources and use potentiality map of Iran (1:1000, 000). Tehran, Iran.
- Heap, J.W. and Carter, R.J. (1999). The biology of Australian weeds. 35. *Solanum elaeagnifolium* Cav. Plant Protection Quarterly, 14: 2–12.
- Hedge, I.C. (1986). Labiatae of SouthWest Asia: diversity, distribution and endemism. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences, 89, pp 2335.
- Heywood, V.H. (1993). Flowering Plants on the World, Ed. B. T.Batsford Ltda., London.
- Hill, M.P. (1998). Life history and laboratory host range of *Stenopelmus rufinus*, a natural enemy for *Azolla filiculoides* in South-Africa. BioControl, 43: 215–224.
- Hill, M.P. and Hulley, P.E. (1995). Biology and Host Range of *Gratiana spadicea* (Klug, 1829) (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae), a Potential Biological Control Agent for the Weed *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae) in South Africa. Biological Control, 5: 345–352.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J. and Herberger, J. (1997) World weeds. New York, John Wiley & Sons.
- Homke, S. (2007). Timing of shortening and uplift of the pusht-e kuh arc in the zagros fold-and-thrust belt (Iran). A combined magnetostratigraphy and apatite thermochronology analysis (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Huisken Mejouyo, P.W. (2020). Physical and Tensile Properties of Handmade *Sida rhombifolia* Paper, Hindawi International Journal of Biomaterials, Article ID 3967641, <https://doi.org/10.1155/2020/3967641>.
- Hughes, C.E. (1994). Risks of species introductions in tropical forestry. Commonwealth Forestry Review, 73: 243-252.
- IPCC. (2007). The physical sciencebasis. contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, NY.
- Janes, R. (1998). Growth and survival of *Azolla filiculoides* in Britain. 2. Sexual reproduction. New Phytologist, 138: 377–384.
- Janes, R.A., Eaton, J.W. and Hardwick, K. (1996). The effects of floating mats of *Azolla filiculoides* Lam. and *Lemna minuta* Kunth on the growth of submerged macrophytes. Hydrobiologia, 340۲۶–۲۳ .

- Jianqing, D., Ren, W., Weidong, F. and Guoliang, Z. (2001). Water hyacinth in China: Its distribution, problems and control status. In: Biological and Integrated Control of Water Hyacinth, *Eichhornia crassipes*. M. H. Julien, M. P. Hill, T. D.Center and D. Jianqing (eds.), pp 29–32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- John, M. (2016). Production of Organic Compost from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) in the Lake Victoria Basin: A Lake Victoria Research Initiative(VicRes). Journal of Agriculture and Allied Sciences. 5: 50–59.
- Karaer, F. and Kutbay, H.G. (2007). *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae), a new record for Turkey. Turkish Journal of Botany, 31: 481–483.
- Karami, M., Saeidnia, S., Shahabi majd.N., Ebrahimzadeh, M.A., Omrani, N. and Salarian, A. (2009). Anti-nociceptive Activity of Aqueous-methanolic Extract of *Phytolacca americana* Growing in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8: 223–226.
- Keller, R.P., Geist, J., Jeschke, J.M. and Kühn, I. (2011). Invasive species in Europe: Ecology, status, and policy. Environmental Sciences Europe, 23: 23.
- Kier, G., Mutke, J., Dinerstein, E., Ricketts, T. H., Küper, W., Kreft, H. and Barthlott, W. (2005). Global patterns of plant diversity and floristic knowledge. Journal of Biogeography, 32: 1107–1116.
- Kitoh, S., Shiomi, N. and Uheda, E. (1993). The growth and nitrogen fixation of *Azolla filiculoides* Lam. in polluted water. Aquatic botany, 46: 129–139.
- Klein, J.C. (1990). Endemisme a l'etage alpin de l'Alborz (Iran). In Contributiones selectae ad floram et vegetationem orientis: proceedings of the Third Plant Life of southwest Asia Symposium, held pp. 3–8.
- Knapp, L.B. and Canham, C.D. (2000). Invasion of an old-growth forest in New York by *Ailanthus altissima*: sapling growth and recruitment in canopy gaps. Journal of the Torrey. Botanical Society, 127:307–315.
- Koh, K.S., Na, J.G., Suh, M.H., Kil, J.H., Ku, Y.B., Yoon, J.H. and Oh, H.K. (2000). The effects of alien plants on ecosystem and their management. The Plant Taxonomic Society of Korea, Korea.
- Kowarik, I. and Saumel, I. (2007). Biological flora of Central Europe: *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. Perspec Plant Ecology Evolution Systematic, 8:207–237.
- Kull, C.A., Tassin, J. and Carrière, S.M. (2014). Approaching invasive species in Madagascar. Madagascar Conservation & Development, 9: 60–70.
- Kumar Ravi, O.P., Kumar, S., kumari, S., Kolhe, S.S. and. Singh, A.K. (2019). A Brief Review on *Eichlornia* Extract as Liquid Fertilizers for Aquaculture Pond. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8: 1044–1051.

- Kuniata, L. and G. Rapp. (2001). Biocontrol of *Sida rhombifolia* in Papua New Guinea. <http://www.nt.gov.au/dpif/pubcat/agnotes/542.htm>. 4 pp.
- Lamont, E.E. and Young, S.M. (2002). Noteworthy plants reported from the Torrey Range—2001. J. Torrey Botanical Society, 129: 363–371.
- Lorenzi, H. (1991). Plantas daninhas do Brasil. Sao Paulo, Ed. Plantarum.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. and De Poorter. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A Selection from the Global Invasive Species database. Invasive Species Specialist Group, Auckland, New Zealand.
- Luz-Lezcano Caceres, H. and Gerold, G. (2009). The Cost of Invasion Control Measures Subtropical *Ailanthus altissima* (Mill) Swingle in Hesse. In: Tielkes E (ed) Tropentag, Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development, Book of abstracts. University of Hamburg.
- Majlesi Koupaie, A., Ansari, M., Bemanian, M. and Fakhar Tehrani, F. (2013). Features of earliest park in Tehran, Amin-o-Dolleh park. In: The Scientific Journal of Nrc. For Art, Architecture & Urbanism 10: 99–112.
- Mamizadeh, L. and Naqinezhad, A.R. (2018). *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), a new record for the flora of Iran. Nova Biologica Reperta, 5 (3): 324–328.
- Mangas-Ramirez, E. and Elias-Gutierrez, M. (2004). Effect of mechanical removal of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on the water quality and biological communities in a Mexican reservoir. Journal of Aquatic Health and Management, 7: 161–168.
- Mathiventhan, T., Jayasingam, T. and Umaramani, M. (2018). Salinity would be an option to control *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms [Water Hyacinth]: Sri Lanka perspective. Tropical Plant Research, 5: 331–335.
- McConnachie, A.J., de Wit, M.P., Hill, M.P. and Byrne, M.J. (2003). 'Economic evaluation of the successful biological control of *Azolla filiculoides* in South Africa'. Biological Control, 28: 25–32.
- McConnachie, A.J., Hill, M.P. and Byrne, M.J. (2004). Field assessment of a frond-feeding weevil, a successful biological control agent of red waterfern, *Azolla filiculoides*, in southern Africa. Biological control, 29: 326–331.
- McKee, R. and Stephens, J. L. (1943). Kudzu as a farm crop. USDA. 1923.
- Mehrabian, A.R., Amini Rad, M. and Pahlevani, A.H. (2015). The Map of Distribution patterns of Iranian Endemic Monocotyledons. Shahid Beheshti University.

- Mehrabian, A. and Khajoei Nasab, F. (2021) Distribution Patterns, Diversity Centers, and Priorities for Conservation of Aquatic Plants in Iran. In: Jawad L.A. (eds) Southern Iraq's Marshes. Coastal Research Library, vol 36. Springer, Cham.
- Miller, J. and Edwards, B. (1983). Kudzu, *Pueraria lobata* where did it come from and how can we stop it? Southern Journal Appl. Forestry, 7: 165–169.
- Mkula, N.P. (2006). Allelopathic interference of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) with the early growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). At internet: <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-08232007181656/unrestricted/dissertation.pdf> [accessed on 07 August 2014].
- Molnar, V.M. and McKenzie, D.N. (1976). Progress Report on Silver leaf Nightshade Research. Pamphlet no. 61. Keith Turnbull Research Institute, Victoria (AU).
- Motard, E., Dusz, S., Geslin, B., Akpa-Vinceslas, M., Hignard, C., Babiar, B., Clair-Maczulajtys, D. and Michel-Salzat, A. (2015). How invasion by *Ailanthus altissima* transforms soil and litter communities in a temperate forest ecosystem. Biological Invasion, 1–17.
- Mozaffarian, V. (1994). Studies on the flora of Iran, new species and new records. Iranian Journal of Botany, 6: 235–243.
- Mozaffarian, V. (2005). Trees and shrubs of Iran. Farhang Moaser Pp: 453-479, Tehran.
- Mozaffarian, V., and Yaghoubi, B. (2015). New record of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) from north of Iran. Rostaniha, 16: 208–211.
- Muller, S. editor. (2004). Plantes invasives en France. Patrimoines naturels 62. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle. p. 168.
- Musselman, L.J. (1986). Parasitic plants and their impacts on SW Asia. Proceeding of Royal Society of Edinburgh, 89B: 283–288.
- Mwangi, E. and Swallow, B. (2005). Invasion of *Prosopis juliflora* and local livelihoods: Case study from the lake Baringo area of Kenya. ICRAF Working Paper – no. 3. Nairobi: World Agroforestry Centre Invasive Mesquite (*Prosopis juliflora*), an Allergy and Health Challenge. Plant, 9: 1–13.
- Myers, J. H. and Bazely, D.R. (2003). Ecology and control introduced plants. Cambridge University Press.
- Olckers, T., Hoffmann, J.H., Moran, V.C., Impson, F.A.C. and Hill, M.P. (1999). The initiation of biological control programmes against *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles and *S. sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae) in South Africa. African Entomology Memoir, 1: 55–63.

- Olckers, T., Medal, J.C. and Gandolfo, D.E. (2002). Insect Herbivores Associated with Species of *Solanum* (Solanaceae) in Northeastern Argentina and Southeastern Paraguay, with Reference to Biological Control of Weeds in South Africa and the United States of America. *Florida Entomologist*, 85: 254–260.
- Olckers, T., Zimmermann, H.G. and Hoffmann, J.H. (1995). Interpreting ambiguous results of host specificity tests in biological control of weeds: assessment of two *Leptinotarsa* species (Chrysomelidae) for the control of *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae) in South Africa. *Biology Control*, 5: 336–344.
- Pahlevani, A.H. and Sajedi, S. (2011). Alerting occurrence of several noxious weeds and invasive plants in arable lands in Iran. *Rostaniha*, 12: 129–134.
- Parisi, P. and Francia, A. (2000). A female with central anticholinergic syndrome responsive to neostigmine. *Paediatric Neurology*, 23: 185.
- Pasiecznik, N., Felker, P., Harris, P.J.C., Harsh, L.N., Cruz, G., Tewari, J.C., Cadoret, K. and Maldonado, L.J. (2001). The *Prosopis juliflora*-*Prosopis pallida* complex: A monograph. HDRA, Coventy, UK.
- Pasiecznik, N.M., Harris, P.J.C. and Smith, S. (2004). Identifying Tropical *Prosopis* species: A Field Guide. HDRA, Coventy, UK, 30p.
- Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R., and Morrison, D. (2000) Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience*, 50: 53–66.
- Popay, I., Champion, P. and James, T. (2004). *Araujia sericifera* - moth plant, Royal New Zealand Institute of Horticulture. An Illustrated Guide to Common Weeds of New Zealand.
- Quimby, J.R., DeLoach, C.J., Wineriter, S.A., Goolsby, J.A., Sobhian, R., Boyette, C. D. and Abbas, H. K. (2003). Biological control of weeds: research by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service: selected case studies. *Pest Management Science*, 59: 671–680.
- Radtke, A., Ambrass, S., Zerbe, S., Tonon, G., Fontana, V. and Ammer C. (2013). Traditional coppice forest management drives the invasion of *Ailanthus altissima* and *Robinia pseudoacacia* into deciduous forests. *For Ecol Manage*, 291:308–317.
- Rajalakshmy, R and Pydi, S.K. (2011) Cardio protective medicinal plants. *Intl J Pharm Inv* 1: 24–41.
- Randall, J.M., Benton, N. and Morse, L.E. (2001). Categorizing invasive weeds: the challenge of rating the weeds already in California. In: Groves RH, Panetta FD, Virtue JG (eds) *Weed risk assessment*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Rechinger, K.H. (1963-2018). *Flora Iranica*, vol 1–157, Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Austria.

- Reinhardt, C.F. (2006). Influence of soil on the allelopathic effects of silverleaf nightshade extract solutions on cotton. University of Pretoria.
- Rieks, D., Graham, J., and Flack, L. (2006). Population Ecology of Hybrid Mesquite (*Prosopis* Species) in Western Australia: How does it differ from Native Range Invasions and What are the Implications for Impacts and Management. *Biological Invasions*, 8: 727–741.
- Ripley, B.S., Kigulim, L.N. and Barker, NP. (2003). *Azolla filiculoides* as a biofertiliser of wheat under dry-land soil conditions. *South African Journal of Botany*, 69: 295–300.
- Rivas-Martínez, S. (2004). Global bioclimatics. *Clasificación Bioclimática de la Tierra*.
- Robinson, A.F., Orr, C.C. and Heintz, C.E. (1978). Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent of silverleaf nightshade. *Journal of Nematology*, 10: 361–366.
- Robinson, A.F., Orr, C.C. and Abernethy JR. (1979). Behavioural response of *Nothanguina phyllobia* to selected plant species. *Journal of Nematology*, 11: 73–77.
- Rodríguez-Merino, A., Fernández-Zamudio, R., García-Murillo, P. and Muñoz, J. (2019). Climatic Niche Shift during *Azolla filiculoides* Invasion and Its Potential Distribution under Future Scenarios. *Plants*, 8: 424.
- Rollins, A.C. and Al-Shehbaz, I. A. (1986). Weeds of SW Asia n North America with special refrenve to Cruciferae. *Proceeding of Royal Society of Edinburgh*, 89B: 289–299.
- Romeo A. (1933). Contributo alla biologia fiorale dell ‘*Araujia sericifera*’ Brot. La pianta catturatrice d’insect. *Annali del Regio Istituto Superiore Agrario di Portici*, 6: 79–97.
- Saha, M. and Datta, B.K. (2017). Reproductive biology of *Solanum sisymbriifolium* Lamk. (Solanaceae) in Tripura, North-east India. *The International Journal of Plant Reproductive Biology*, 9: 59–62.
- Saha, M. and Datta, B.K. (2013). New distributional record of *Solanum sisymbriifolium* Lamarck (Solanaceae) from Tripura, India. *Pleione*, 579–582.
- Sajedi, S. (2019). First report of the *Commelina communis* from Iran. *Rostaniha* 20(2): 192–194 (2019) – Short Report.
- Salehzadeh, A., Naeemi, A.S. and Arasteh, A. (2014). Biodiesel Production from *Azolla filiculoides* (Water Fern). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13: 957–960.
- Serker, A., Bhuyan, S.H., Matin, M., Hossain, F. Md., Khatun, F. and Jamaluddin, T. Md. (2013). Analgesic, neuropharmacological, anti-diarrheal, and cytotoxic activities of the extract of *Solanum sisymbriifolium* Lam. Leaves. *Avicenna Jorنال of Phyto*, 3: 302 – 312.

- Sforza, R. and Jones, W.A. (2007). Potential for classical biocontrol of silver leaf night shade in the Mediterranean Basin Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 37:156–162
- Shackleton, R.T., Le Maitre, D.C., Pasiecznik, N.M. and Richardson, D.M. (2014). *Prosopis*: a global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. AoB PLANTS 6, plu027.
- Shakur, A., Roshan, Gh., Najafe, R. and Kanei, A. (2010). Evaluating climatic potential for palm cultivation in Iran with emphasize on degree-day index, African. Journal of Agricultural Research 13: 99–118.
- Shiny, K.J., Remani, K.N., Jalaja, T.K. and Sasidharan, V.K. (2004). Removal of chromium by two aquatic pteridophytes. Indian Journal of Environmental Health, 46: 249–251.
- Shrishailappa B, Reddy S.A.M., Kumar E.P., Vijayan P., Suresh, B. (2003). Anti-tumour properties of total Alkaloid Fraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves. Phyto ther, 17(9): 1001–1004.
- Sladonja, B., Sus, M. and Guillermic, J. (2015). Review on Invasive Tree of Heaven (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle) Conflicting Values: Assessment of Its Ecosystem Services and Potential Biological Threat. Environmetal Management, 23:1–26.
- Smith, C.A., Shaw, D.R. and Newsom, L.J. (1992). Arrowleaf sida (*Sida rhombifolia*) and prickly sida (*Sida spinosa*): germination and emergence. Weed Res, 32: 103–109.
- Spellman, D.L. and Gunn, C.R. (1976). *Orrenia odorata* and *Araujia sericofera* (Asclepiadaceae): Weeds in Citrus Groves. *Castanea* 41(2): 139–148. Southern Appalachian Botanical Society.
- Standish, R. J. (2002). Prospects for Biological Control of Japanese honeysuckle *Lonicera japonica* Thunb. (Caprifoliaceae). Landcare Research Contract Report: LC0102/104.
- Stepniewska, Z., Bennicelli, R.P., Balakhnina, T.I., Szajnocha, K., Banach, A. and Wolinska, A. (2005). Potential of *Azolla caroliniana* for the removal of Pb and Cd from wastewaters. International Agrophysics, 19: 251–255.
- Suarez-Mota, M., Ortiz, E., Vilasenor, L. and Espinosa-Garcia, F.J. (2016). Ecological niche modeling of invasive plant species according to invasion status and management needs: the case of *Chromolaena odorata* (Asteraceae) in South Africa. Polish Journal of Ecology, 64:369–383.
- Syomiti, M., Hoag, H., Getachew, G., Beatrice, M. and Wamae, D. (2015). Medicated *Prosopis* spp -based feed blocks- for anthelmintic efficacy and performance of weaner lambs. Livest. Res. Rural Dev, vol. 27, 50
- Takhtajan, A., Crovello, T.J. and Cronquist, A. (1986). Floristic regions of the world (Vol. 544). Berkeley: University of California press.

- Tamura, S., Fukamiya, N., Okano, M., Kayama, J., Koike, K., Tokuda, H., Aoi, W., Takayasu, J., Kuchide, M. and Nishino, H. (2003). Three new quassinoids, ailantinol E, F, G, from *A. altissima*. Chem Pharm Bull, 51:385–389.
- Tanji, A., Boulet, C. and Hammoumi, M. (1984). Contribution to the study of the biology of *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Solanaceae), a weed of crops in the irrigated perimeter of the Tadla (Morocco). Weed Research, 24: 401–409.
- Timmins, S.M. and Owens, S.J. (2001). Scary species, superlative sites: assessing weed risk in New Zealand's protected natural areas. In: Groves RH, Panetta FD, Virtue JG (eds) Weed risk assessment. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Tokasi, S., Yaghoubi, B., Oveisi, M., Rahimian Mashadi, H. and Muller-Scharer, H. (2017). First report of *Ambrosia psilostachya* from Iran: An invasive plant species establishing in coastal area of Gilan province (N Iran). Rostaniha, 18: 222–226.
- Tscheulin, T., Petanidou, T., Potts, S.G. and Settele, J. (2009). The impact of *Solanum elaeagnifolium*, an invasive plant in the Mediterranean, on the flower visitation and seed set of the native co-flowering species *Glaucium flavum*. Plant Ecology, 205: 77–85.
- Tung, H.F. and Watanabe, I. (1983). Differential response of *Azolla-Anabaena* associations to high temperatures and minus phosphorus treatments. New Phytologist, 93: 423–431.
- Uludag, A., Gbehounou, G. and Kashefi, J. (2016). Review of the current situation for *Solanum elaeagnifolium* in the Mediterranean Basin. EPPO Bulletin, 46: 139-147.
- USDA, NRCS. (2014). *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. [http:// plants.usda.gov/core/profile?symbol=aial](http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=aial). Accessed 25 June 2014.
- USDA. (2013). Weed Risk Assessment for *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae) – Sticky nightshade. Plant Epidemiology and Risk Analysis Laboratory Center for Plant Health Science and Technology.
- Vavilov, N. I., Vavilov M. I. and Dorofeev V.F. (1992). Origin and geography of cultivated plants. Cambridge University Press Pp 536.
- Venter, N., Hill, M., Hutchinson, S. and Ripley, B. (2012). Weevil borne microbes contribute as much to the reduction of photosynthesis in water hyacinth as does herbivory. Biological Control, 64: 138–142.
- Villamagna, A.M. and Murphy, B.R. (2010). Ecological and socioeconomic impacts of invasive water hyacinth (*Eichlornia crassipes*): a review. Freshwater biology, 55: 282–298.
- Viveka, S. and Grace, B.L. (2009). Conversion of Water Hyacinth (*Eichlornia crassipes*) into Nutrient-Rich Fertilizer by Pit Methods Dynamic soil. Dynamic Plant, 12:1–4.

- Walker, B. and Steffen, W. (1997). An Overview of the Implications of Global Change for Natural and Managed Terrestrial Ecosystems. *Conservation Ecology*, 1: 2.
- Wakie, T.T., Hoag, D., Evangelista, P.H., Luizza, M. and Laituri, M. (2016). Is control through utilization a cost effective *Prosopis juliflora* management strategy? *Journal of Environmental Management*, 168: 1–13.
- Wapshere, A.J. (1988). Prospects for the biological control of silver-leaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39: 187–197.
- Western, R.A. (1989). The Flora of the United Arab Emirates: an introduction. UAE University Publications, Al-Ain, UAE.
- Williams, A., Hecky, R. and Duthie, H. (2007). Water hyacinth decline across Lake Victoria-Was it caused by climatic perturbation or biological control? A reply. *Aquatic Botany*, 87:94–96.
- Winks, C.J. and Fowler, S.V. (2000). Prospects for Biological Control of Moth Plant, *Araujia sericifera* (Asclepiadaceae). Landcare Research Contract Report: LC9900/100. Auckland, New Zealand.
- Witkamp, M., Frank, M. L., and Shoopman, J. L. (1966). Accumulation and biota in a pioneer ecosystem of Kudzu vine at Copperhill, Tennessee. *Journal of Appl. Ecology*, 3: 383–391.
- Wittenberg, R. and Cock, M.J.W. (eds.) (2001). *Invasive Alien Species: A Toolkit of Best Prevention and Management Practices*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, xvii – 228.
- Wittenberg, R., editor. (2005). An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland. Bern CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape. p. 416.
- Wong Fong Sang, H.W., Vu, Van Vu, Kijne, J.W., Vu, T.T. and Planque, K. (1987). Use of *Azolla* as a test organism in a growth chamber of simple design. *Plant and Soil*, 99: 219–230.
- Wu SH, Hsieh CF, Chaw SM, and Rejma'nek, M (2004b) Plant invasions in Taiwan: insights from the flora of casual and naturalized alien species. *Diversity and Distribution*, 10:349–362.
- Wu, S.H., Hsieh, C.F. and Rejma'nek, M. (2004a). Catalogue of the naturalized flora of Taiwan. *Taiwania*, 49:16–31.
- Zhou, J., Pan, X., Xu, H., Wang, Q. and Lijuan, C. (2017). Invasive *Eichhornia crassipes* Affects the Capacity of Submerged Macrophytes to Utilize Nutrients sustainability. 9: 2–10.
- Ziska, L.H. and Bunce, J.A. (1997). Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C4 crops and weeds. *Photosynth. Res*, 54:199–208.

Distribution patterns of introduced plants to Iran

A. Mehrabian^{1*}, F. Khajoei Nasab², S. Naghizadeh³, L. Malek Mohammadi⁴

Received:2020.11.25

Accepted:2021.6.14

Abstract

During the past decades, several plant species have been introduced to Iran with there is no compiled data about them. Due to the lack of an ecological-geographical database on introduced plant species to Iran, a study to compile and analyze their information for management planning seems necessary. In this study, a database related to mentioned plant taxa introduced to Iran was prepared using data from field studies and review of available resources. Dissemination maps using Arc-GIS was drawn. Also using $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ Grid cells species richness maps was drawn. The results of this study showing that 27 introduced species of the index are found in Iran and the Hyrcanian geographical province has a higher richness. Therefore, this study, while introducing the management priorities of the introduced species, has introduced general strategies for their ecological management so that it can be used as a basic scientific resource for biodiversity management programs in Iran.

Keywords: *Alien species, Invasive plants, Phytogeography, SW Asia*

1-Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

*(Corresponding author: a_mehrabian@sbu.ac.ir)

2-PhD, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3-PhD Student, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

4-PhD Student, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

بررسی خواص ضد باکتریایی موکوس در گلخورک ماهی

(*Periophthalmus waltoni* koumans, 1941)

اعظم مکی پور^۱، اشرف جزایری^{۲*}، اسماعیل داراب پور^۳

چکیده

امروزه ظهور و گسترش باکتریهای بیماریزای مقاوم به دارو به یک نگرانی جهانی بزرگ تبدیل شده است. بنابراین، یک نیاز فوری برای کشف داروهای ضد میکروبی جدید وجود دارد. موکوس گلخورک ماهی می تواند یک منبع جدید و بکر برای ترکیبات ضدباکتریایی باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس ماهی (*periophthalmus waltoni* Koumans, 1941)، علیه برخی باکتریهای شاخص بیماریزا شامل *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* بود. همچنین تاثیر فاکتورهای جنسیت و فصل نیز بر توانایی اثر ضد میکروبی موکوس بررسی شد. بعد از تهیه عصاره آبی موکوس، اثر ضدباکتریایی آن به روش انتشار دیسک بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) موکوس علیه دو باکتری که حساسیت بیشتری نشان دادند تعیین شد. نتایج نشان داد که تمامی باکتریها نسبت به عصاره موکوس حساس بودند. باکتری *Bacillus subtilis* و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین باکتری نسبت به عصاره موکوس مورد آزمایش بودند جنسیت ماهی تفاوت معناداری در خاصیت ضد میکروبی موکوس ایجاد نکرد ولی ماهی ماده به صورت جزئی فعالیت ضدباکتریایی بالاتری از خود نشان داد ($P>0/001$). همچنین مشخص شد موکوس بدست آمده از ماهی در فصل بهار خاصیت ضد باکتریایی بالاتری نسبت به موکوس بدست آمده از ماهی در فصل پاییز دارد ($P<0/001$).

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، ماهی، موکوس، *Periophthalmus waltoni*

۱- کارشناس ارشد، زیست جانوری- بیوسیستماتیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اهواز، خوزستان، ایران.

۲- استادیار، زیست‌شناسی دریا، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اهواز، خوزستان، ایران.

* (نویسنده مسئول: A.jazayeri@scu.ac.ir)

۳- استادیار، میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اهواز، خوزستان، ایران.

مقدمه

ماهیان باله شعاعی، بیشتر ماهیان شناخته شده و استخوانی امروزی از جمله گل‌خوردک‌ها را شامل می‌شوند (دانشفر، ۱۳۸۸؛ Hickman et al., 2001). گل‌خوردک‌ها متعلق به زیر راسته‌ی Gobioidi، خانواده‌ی گاوماهیان (Gobiidae) و زیرخانواده‌ی oxudercinae هستند. چهار جنس گل‌خوردک‌ماهیان عبارتند از: *Boleophthalmus*، *Periophthalmus*، *Periophthalmodon* و *Scartelaos* و از این میان، بالاترین غنای گونه‌ای مربوط به جنس *Periophthalmus* است (Aguillar, 2000; Murrdy, 1989). از جنس *Periophthalmus* تنها گونه‌ی *Periophthalmus waltoni* در ایران پراکنش داشته و پراکنش آن از خلیج فارس تا غرب هند است (LarvaBase.org). *Periophthalmus waltoni* گونه‌ای گیاه‌خوار است که از ویژگی‌های ریختی آن، بدن خاکستری متمایل به قهوه‌ای با لکه‌های تیره که روی نیمی از باله‌های پشتی در بین شعاع لکه‌هایی وجود دارد و در سطح بالای بدن نیز دارای یک خط طولی متمایل به سفید است. محل زندگی این گونه در حاشیه‌ی رودها و رودخانه‌ها با آب نسبتاً گرم و بسترهای گلی با حفرات خالی است (تصویر ۱) (محمدپور و همکاران، ۱۳۸۹).



تصویر ۱: نمای جانبی گونه *Periophthalmus waltoni*

بروز و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجب ایجاد چالش‌های منحصربه‌فرد هم در علم و هم در پزشکی شده است. در نتیجه به تازگی مطالعات مختلفی با هدف شناسایی عوامل ضد میکروبی جدید برای غلبه بر این مشکلات انجام شده است. جالب است که از میان مواد طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی، موکوس ماهی، منبع خوبی از ترکیبات فعال زیستی برای اهداف بالینی مختلف است (Fuochi et al., 2017). ساختار پوست ماهیان برای انجام وظایف مختلف سازگاری یافته است و از همه مهمتر اینکه پوست به‌عنوان اولین سد دفاعی بدن ماهی در مقابل عوامل تهدید کننده محیط خارجی، نقش مهمی در سلامت و بهداشت ماهیان ایفا می‌کند (McKim & Lien, 2001). لایه‌ی موکوسی بر روی سطح بدن ماهی، عملکردهایی مانند مقاومت به بیماری، تنفس، تنظیم اسمزی و یونی، حرکت، ارتباط، تغذیه و ساخت آشیانه انجام می‌دهد (Subramanian et al., 2008). در واقع، محیط آبی دارای پاتوژن‌های مختلف است و لایه‌ی موکوسی سد فیزیکی را ایجاد می‌کند که اولین خط دفاعی است و نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهی ایفا می‌کند (Fuochi et al., 2017). لیریو و همکاران بیان کرده‌اند که موکوس سطحی یا ماده‌ی لزج

ماهی حاوی موادی مانند کرینوتوکسین ها (Crynotoxin)، کالمودولین (Calmodulin)، فرمون ها، انواعی از مواد ضد بیماری زا مانند اسیدهای چرب، ایمونوگلوبولین ها، اجزای کمپلمان، لکتین ها، لیزوزیم ها، آنزیم های تجزیه کننده ی پروتئین و سایر پپتیدها و پروتئین های ضد میکروبی است (Lirio et al., 2018).

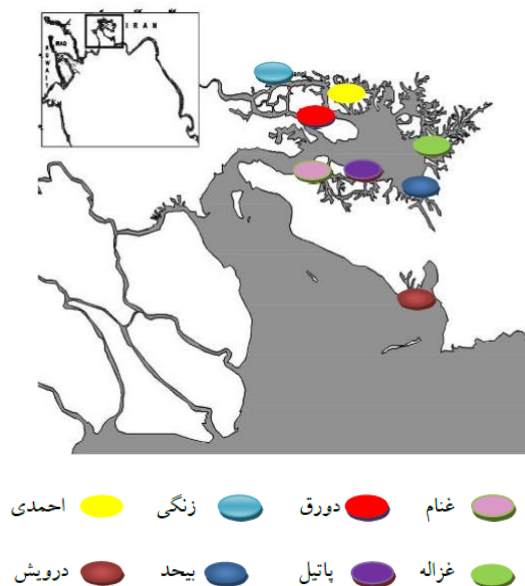
اطلاعات در دسترس در مورد عملکرد ضد میکروبی موکوس اپیدرم، به تعداد محدودی گونه ی ماهی محدود است. ویژگی ضد میکروبی موکوس اپیدرمی در برابر پاتوژن ها در ابتدا در قزل آلا ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اثبات شد. از طرفی مشخص شد که حذف موکوس اپیدرمی در گونه هایی مانند شیرین ماهی (*Plecoglossus altivelis*) و سپر ماهی (*Scophthalmus maximus*) بعد از چالش با *Listonella anguillarum*، موجب افزایش مرگ و میر شد (Subramanian et al., 2008). در این راستا، Austin و همکاران (Austin et al., 1995) نیز نشان دادند که عصاره موکوسی به دست آمده از سطح قزل آلا ی رنگین کمان (*Salmo gairdneri*) فعالیت ضد باکتریایی نشان داده است. بر اساس مطالعات Kumari و همکاران ترکیب و میزان ترشح موکوس از گونه ای به گونه ای دیگر متغیر بوده و مشاهده شده است که این میزان در پاسخ به تماس میکروبی یا به نوسانات محیطی مانند اسمولاریته و pH بالا تغییر می کند (Kumari et al., 2019; Subramanian et al., 2008). از طرفی تحقیقات نشان داده است که موکوس دهان و پوست در خانواده ی گاوماهیان دارای خاصیت ضد باکتریایی است به طوریکه برخی از باکتری ها از جمله *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Klebsiella oxytoca* و *Lactobacillus bulgaricus* به آن حساسیت نشان می دهند (Ravi et al., 2010).

با بررسی منابع موجود تاکنون مطالعه ای در مورد اثر ضدباکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni* انجام نشده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* علیه برخی پاتوژن های شاخص شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* است. همچنین تاثیر دو فاکتور جنسیت ماهی و فصل نیز در میزان اثر ضدباکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری در منطقه جزرومدی در خور غنام واقع در شمال غرب خلیج فارس، محدوده ای با مختصات جغرافیایی (عرض جغرافیایی ۲۲° ۳۰' ۲۶" و طول جغرافیایی ۴۹° ۳۰' ۲۹"۸) به صورت فصلی انجام شد (تصویر ۲). نمونه برداری در طی فصول مختلف با دست و گاهی نیز با تور ساچوک انجام شد. پس از شناسایی گونه ها با کلیدهای شناسایی موجود (Murdy, 1989; Coad, 2010; Larson & Takita, 2004)، تعداد ۷۰ نمونه ماهی گلخورک *Periophthalmus waltoni* شناسایی و جهت تعیین جنسیت و انجام بررسی های ضدباکتریایی، به صورت زنده و با کمک آکواریوم پرتابل به آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه شهید

چمران اهواز منتقل شدند. تعیین جنسیت با کمک پاپیلای تناسلی انجام شد. به این صورت که این پاپیلا برای افراد ماده به شکل بیضی و برای افراد نر به شکل مثلث است (کیوانی، ۱۳۸۴)



تصویر ۲: موقعیت خورهای منطقه‌ی ماهشهر خوزستان

مطالعه‌ی خواص ضد میکروبی موکوس پوست

جمع‌آوری موکوس پوست: موکوس پوست ماهیان براساس روش (Subramanian et al., 2008) جمع‌آوری شد. با این هدف، در ابتدا به‌منظور اعمال استرس گرسنگی، تغذیه‌ی ماهیان ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری موکوس متوقف و سپس ماهی‌ها با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند. برای به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، ماهی‌ها درون آب سرد و تمیز وارد شدند و بلافاصله با کمک دستکش استریل به‌صورت انفرادی درون کیسه‌های زیپ‌پلاست حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار داده شدند. پس از سه دقیقه ماهیان از کیسه خارج و به ظرفی با اکسیژن‌دهی مناسب منتقل شدند و سپس محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس به لوله‌های فاکون منتقل شد.

تهیه‌ی عصاره موکوسی با رقت‌های مختلف: به‌منظور تهیه‌ی عصاره، محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس جمع‌آوری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در شرایط ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به‌دست آمده جمع‌آوری شده و تحت شرایط استریل در دمای اتاق خشک گردید. پودر حاصل را با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کرده و پس از حل کردن در آب مقطر استریل (به‌عنوان حلال)، عصاره تام تهیه شد. در نهایت محلول بدست آمده با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد و جهت بررسی اثر ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی قدرت ضد باکتریایی موکوس به روش انتشار در دیسک: به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی موکوس

از روش انتشار دیسک و اندازه گیری حداقل ناحیه ی مهارى (Zone of Inhibition= ZOI) استفاده شد (Baner et al., 1991; Mangena & Muyima, 1999). ابتدا باکتری های مورد آزمایش (سویه های بیماری زای شاخص استاندارد که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد شامل: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*)، در محیط مولر هینتون براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵، مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. حدود ۰/۵ میلی لیتر از این مایع تلقیح اولیه، توسط سوآپ پنبه ای استریل به پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار افزوده شد. در ادامه دیسک های بلانک استریل که به عصاره رقیق شده (با غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) آغشته شده بودند با فاصله بر روی محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد (ZOI) بر حسب میلی متر با خط کش اندازه گیری شد. این آزمایش برای هر سویه از باکتری های استاندارد سه بار تکرار شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) موکوس: حداقل غلظت مهارى به

روش ماکرودیلوشن براث (Macro-broth dilution) و حداقل غلظت کشندگی عصاره علیه دو باکتری بیماری زا که طبق نتایج مرحله ی قبل، نسبت به سایر باکتری های مورد آزمایش حساس تر بودند، تعیین شد (Sindambiwe et al., 1999; Vanden et al., 1991). به منظور بررسی MIC، سوسپانسیون باکتریایی استاندارد معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند به لوله های حاوی یک میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و غلظت های مختلف عصاره موکوس (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد. لوله ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمادهی شدند. اولین لوله ای که در سری ذکر شده فاقد رشد قابل دیدن بود به عنوان حداقل غلظت مهارى در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، یک لوپ استاندارد از لوله هایی که فاقد رشد قابل مشاهده باکتری بودند روی پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. حداقل غلظتی که از تشکیل کلونی روی محیط آگار جلوگیری کرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۱ و آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و چندمتغیره MANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

به طور کلی موکوس پوست ماهیان مختلف، طیف ضد میکروبی گسترده ای علیه میکروارگانیسم های پاتوژن نشان می دهد. (Lee et al., 2020) که این طیف به شرایط گونه ای و زیستگاهی و تغذیه ای ماهی بستگی دارد و همین امر می تواند مقدار

ترشح موکوس و اجزای آن را در گونه‌ها یا بین گونه‌ها تحت تاثیر قرار داده و همچنین در فراهم کردن انواع پاسخ‌ها و اجزای ایمنی کمک‌کننده باشد (Kumari et al., 2019).

بررسی اولیه‌ی اثر ضد میکروبی موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni*

روش انتشار دیسک، رایج‌ترین روش استفاده‌شده برای تست حساسیت ضد میکروبی در مطالعات موکوس پوست ماهی است (Lee et al., 2020). اثر ضد میکروبی عصاره موکوس به‌دست‌آمده از ماهی *Periophthalmus waltoni* در چهار غلظت (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) علیه چهار باکتری (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) طی دو فصل پاییز و بهار مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن‌ها در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج اثر ضد باکتری قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی متر) عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* در فصل پاییز علیه سویه‌های استاندارد چهارنوع باکتری

غلظت عصاره باکتری	25	50	100	200
<i>Bacillus subtilis</i> (۶۶۳۳)	11±0/48 ^e	12±0/52 ^{cd}	14±0/31 ^b	16±0/17 ^a
<i>Escherichia coli</i> (۲۵۹۲۲)	10±0/21 ^f	11±0/21 ^c	14±0/21 ^b	16±0/33 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (۶۵۳۸)	9±0/22 ^{fg}	11±0/17 ^e	12±0/17 ^c	14±0/31 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (۹۰۲۷)	0±0/00 ^g	0±0/00 ^{fg}	9±0/33 ^f	11±0/31 ^{de}

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P<0/05) است.

جدول ۲: نتایج اثر ضد باکتری قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* در فصل بهار علیه سویه‌های استاندارد چهارنوع باکتری

غلظت عصاره باکتری	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
<i>Bacillus subtilis</i>	13±0/57 ^e	14±0/31 ^{cd}	16±0/34 ^b	18±0/22 ^a
<i>Escherichia coli</i>	11±0/37 ^f	14±0/31 ^c	16±0/40 ^b	18±0/21 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	11±0/31 ^{fg}	12±0/31 ^e	14±0/26 ^c	16±0/42 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8±0/31 ^g	9±0/21 ^{fg}	10±0/22 ^f	12±0/22 ^{de}

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P<0/05) است.

بر اساس نتایج به دست آمده در هر دو فصل پاییز و بهار تمام باکتری‌های مورد آزمایش، نسبت به غلظت‌های بررسی شده عصاره، حساسیت نشان دادند و هاله عدم رشد در بین باکتری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0/001$) بود. در این میان باکتری *Bacillus subtilis* با میانگین هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر، حساس‌ترین و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با میانگین هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره مورد آزمایش بود. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره مطالعه شده نشان دادند.

در مقایسه با مطالعه حاضر، Wei و همکاران (Wei et al., 2010) گزارش دادند که عصاره خام موکوس *Channa striatus*، ZOI معادل ۸ میلی‌متر را علیه *Aeromonas hydrophila* نشان داد درحالی‌که هیچ تأثیر ضد باکتریایی نسبت به *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* نشان نداد. باین‌حال، در مطالعه Balasubramanian و همکاران (Balasubramanian et al., 2012) تأثیر ضد باکتریایی عصاره موکوس *Ctenopharyngodon idella*، علیه *Klebsiella pneumoniae* (۷ میلی‌متر) کمترین تأثیر را داشته درحالی‌که باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* (۱۵ میلی‌متر) و *Escherichia coli* (۱۷ میلی‌متر) حساسیت بیشتری نسبت به عصاره موکوس از خود نشان دادند. از طرفی، نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Fuochi و همکاران (Fuochi et al., 2017) نیز مغایرت داشت چراکه نتایج نشان‌دهنده‌ی این موضوع بود که موکوس پوست *Dasyatis pastinaca* فعالیت ضد باکتریایی ویژه و برجسته‌ای علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داد و نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، فعالیت نداشت. این واکنش نسبت به گرم-منفی‌ها را می‌توان بواسطه ماهیت مولکول‌های فعال توضیح داد. در واقع اکثر پپتیدهای ضد میکروبی باید دارای دو شرط باشند: بار کاتیونی خالص و قابلیت اتخاذ ساختارهای آمفی‌پاتیک. ویژگی اول، امکان جذب به غشاهای باکتریایی که دارای بار منفی هستند (مخصوصاً انواع گرم-منفی) را فراهم ساخته و ویژگی دوم، امکان برهمکنش و جذب در باکتری‌ها را فراهم می‌سازد (Mahadevan et al., 2019).

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که خاصیت ضد باکتریایی عصاره موکوس با افزایش غلظت افزایش پیدا می‌کند به این‌صورت که برای تمام باکتری‌های مورد بررسی بزرگ‌ترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و کوچک‌ترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره طی دو فصل پاییز و بهار نشان داد که اثر متقابل بین دو عامل باکتری و فصل دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($P = 0/001$) است به این صورت که عصاره تهیه شده در فصل بهار هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به فصل پاییز نشان داد. باین‌حال، هاله عدم رشدی مربوط به باکتری‌های *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* با هم تفاوت معنی داری نداشتند ولی به‌صورت کلی میانگین هاله عدم رشد برای باکتری *Bacillus subtilis* (۱۴/۳۵ میلی‌متر) بیش‌تر از

باکتری *Escherichia coli* با میانگین هاله عدم رشد ۷۶/۱۳ میلی‌متر بود. از طرفی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* طی دو فصل بهار و پاییز تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد نشان نداد ولی میانگین هاله عدم رشد در بهار (۱۱ میلی‌متر) بیش‌تر از این میانگین در پاییز (۱۰ میلی‌متر) بود. در مجموع بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری *Bacillus subtilis* در فصل بهار با میانگین ۱۵ میلی‌متر و کم‌ترین میانگین هاله عدم رشد (۱۰ میلی‌متر) مربوط به باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در فصل پاییز بود (جدول ۳).

جدول ۳: تاثیر فصل بر روی خاصیت ضد میکروبی عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* علیه سوبه‌های استاندارد چهار نوع باکتری

بهار	پاییز	فصل
		باکتری
15±0/52 ^a	13±0/46 ^b	<i>Bacillus subtilis</i>
15±0/72 ^a	13±0/55 ^b	<i>Escherichia coli</i>
11±0/43 ^d	10 ± 0/32 ^d	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
14±0/48 ^b	12±0/37 ^c	<i>Staphylococcus aureus</i>

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

بررسی همزمان تاثیر فصل و غلظت عصاره بر خاصیت ضد میکروبی موکوس نشان داد که بین این دو عامل اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P=0/001$) به این صورت که در هر غلظت میانگین هاله عدم رشد در فصل بهار و پاییز باهم اختلاف آماری داشته و در همه‌ی موارد موکوس تهیه‌شده در فصل بهار از خود خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نشان داد. همچنین در هر فصل با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی هم افزایش یافت به این ترتیب که بیش‌ترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شده در فصل بهار با میانگین هاله عدم رشد ۱۶ میلی‌متر و کم‌ترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شده در فصل پاییز با میانگین هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متر بود (جدول ۴).

در فصل بهار که اوج رسیدگی جنسی و نیز تخمگذاری در این ماهیان می‌باشد بدن ماهی حساسیت بالایی به محیط نشان می‌دهد و به شدت تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار دارد که همین تنش‌ها محرکی برای تولید موکوس با کیفیت بالاتر می‌شود (Bereiter., 1986) از سوی دیگر با افزایش مقدار غذای مصرفی و نیز بهبود مواد غذایی که در طی فصل بهار صورت می‌گیرد میزان متابولیسم در بدن افزایش می‌یابد و ساختن پروتئین‌های دفاعی با کارایی بالاتری صورت می‌گیرد همه این عوامل در نهایت منجر به افزایش خاصیت ضد میکروبی موکوس تولید شده در فصل بهار می‌گردند (Nordgarden et al., 2002; Kroghdahl et al., 2004).

جدول ۴: تاثیر همزمان فصل و غلظت عصاره بر خاصیت ضد میکروبی موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni*

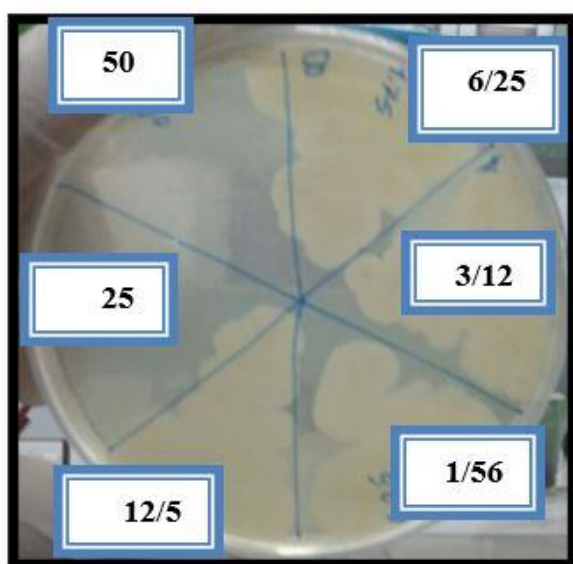
بهار	پاییز	فصل
		غلظت
10±0/33 ^{ef}	10±0/23 ^f	۲۵
13±0/45 ^d	11±0/22 ^e	۵۰
15±0/43 ^c	12±0/44 ^d	۱۰۰
16±0/63 ^a	15±0/40 ^b	۲۰۰

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد ($P < 0/05$) است.

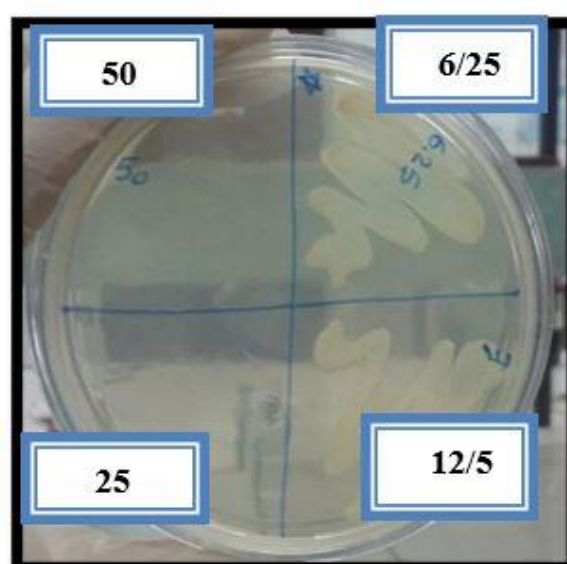
نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره موکوس پوست ماهی

Periophthalmus waltoni

برای تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* که حساسیت بیش‌تری در برابر عصاره تهیه شده از موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* داشتند استفاده شد. مطابق با نتایج به‌دست آمده در فصل پاییز حداقل غلظت مهارکنندگی برای *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* غلظت 12/5 میلی گرم بر میلی لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی برای هر دو باکتری غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به‌دست آمد (تصاویر ۳ و ۴).

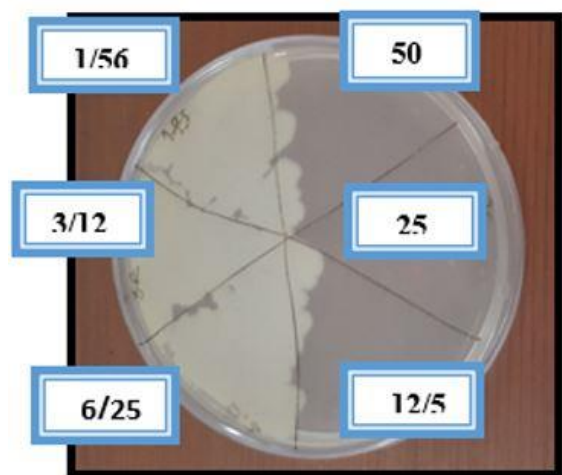


تصویر ۴: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Bacillus subtilis* طی فصل پاییز

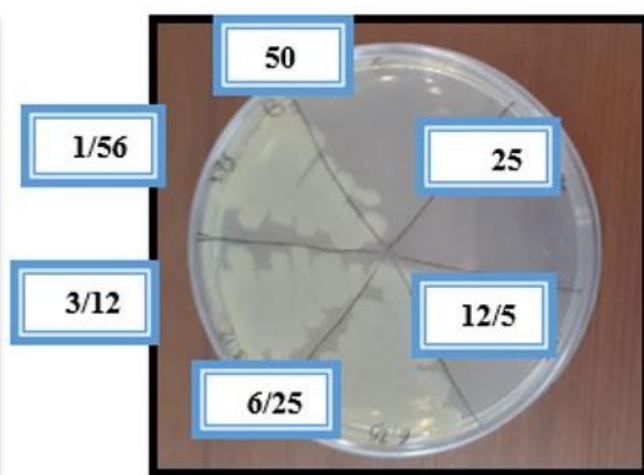


تصویر ۳: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Escherichia coli* طی فصل پاییز

مطالعات انجام‌شده بر روی موکوس به‌دست آمده از نمونه‌ها در فصل بهار نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌ها غلظت 6/25 میلی گرم و حداقل غلظت کشندگی برای آن‌ها غلظت 12/5 میلی گرم بر میلی لیتر بوده است (تصاویر ۵ و ۶). این نتایج نشان می‌دهد که عصاره به‌دست آمده از موکوس ماهی در فصل بهار، دارای خاصیت ضد باکتریایی بالاتری بود.



تصویر ۶: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Escherichia coli* طی فصل بهار



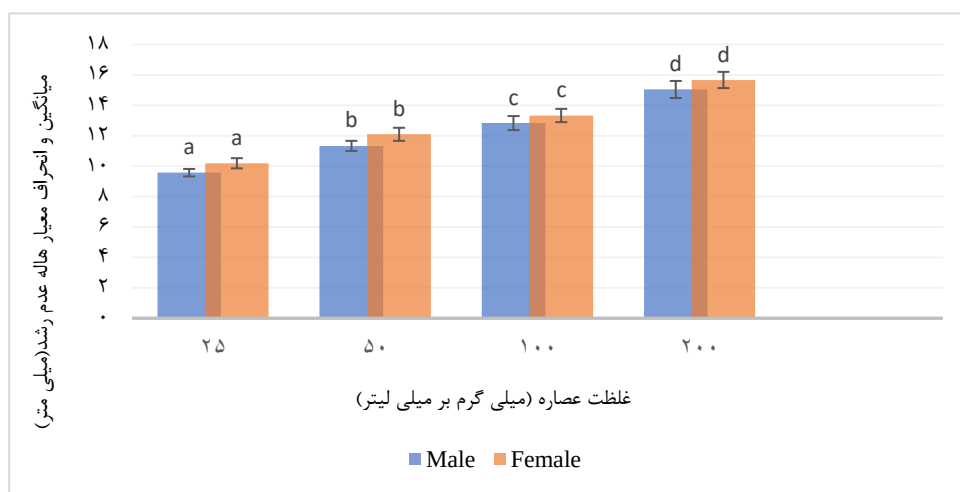
تصویر ۵: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Bacillus subtilis* طی فصل بهار

در سایر مطالعات نیز محققان زیادی به بررسی MIC عصاره‌های موکوس پوست گونه‌های مختلف ماهی پرداخته‌اند که نتایج به‌دست آمده با مطالعه‌ی حاضر قابل قیاس است. Erban و همکاران (Erban et al., 2000) سه پروتئین گلیکوزیده با وزن‌های مختلف را از سوپرناتانت هیدروفوب موکوس پوست مارماهی و قزل‌آلا معرفی کردند که مقدار MIC مربوط به آن، در گستره ۱ تا ۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد. از سوی دیگر، Lemaitre و همکاران (Lemaitre et al., 1996) گزارش کردند که پروتئین‌های گلیکوزیده‌ی جداشده از *Cyprinus carpio*، رشد تمام پاتوژن‌های تست شده را در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر مهار می‌کند. مطابق با نتایج به‌دست آمده از مطالعه Kumari و همکاران (Kumari et al., 2019) MIC مربوط به عصاره‌های ماهیان مطالعه شده برای *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و برای *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Aeromonas hydrophila*، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به‌دست آمد. از طرفی مقدار ترشح موکوس در میان سه گونه ماهی بررسی شده توسط این محققان متفاوت بود. این تغییر در مقدار ترشح موکوس را می‌توان به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی مختلف و همچنین به سلول‌های مختلف تولیدکننده‌ی موکوس نسبت داد که در لایه‌های اپیدرمی گونه‌های مختلف ماهی وجود دارد (Lethbridge, 1977 & Smith, 1982).

در مطالعه Mahadavan و همکاران (Mahadavan et al., 2019) MIC مربوط به عصاره‌های موکوس گل خورک مورد مطالعه در گستره‌ی ۳/۰ و ۲۵ میلی‌لیتر برای پاتوژن‌های مختلف باکتریایی و در گستره‌ی ۰/۱ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای پاتوژن‌های قارچی به‌دست آمد. کمترین مقدار MIC پاتوژن‌های باکتریایی (یعنی ۳ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌ترتیب برای *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* گزارش شد.

نتایج تاثیر جنسیت در میزان اثر ضد میکروبی موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni*

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی در این مرحله نشان دهنده ی تفاوت معنی داری بین جنسیت و خاصیت ضد میکروبی موکوس پوست ماهی نبود ($P>0/001$). ولی در همه حالت ها مقدار اثرگذاری موکوس تهیه شده از جنس ماده به مقدار هرچند جزئی خاصیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به جنس نر از خود نشان داد. همچنین بیش‌ترین خاصیت ضد باکتریایی در مورد عصاره تهیه شده از ماهی ماده در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (با میانگین هاله عدم رشد ۱۶ میلی‌متر) مشاهده شد این درحالیست که عصاره تهیه شده از ماهی نر در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با میانگین هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متر کم‌ترین خاصیت ضد باکتریایی را داشت (نمودار ۱).



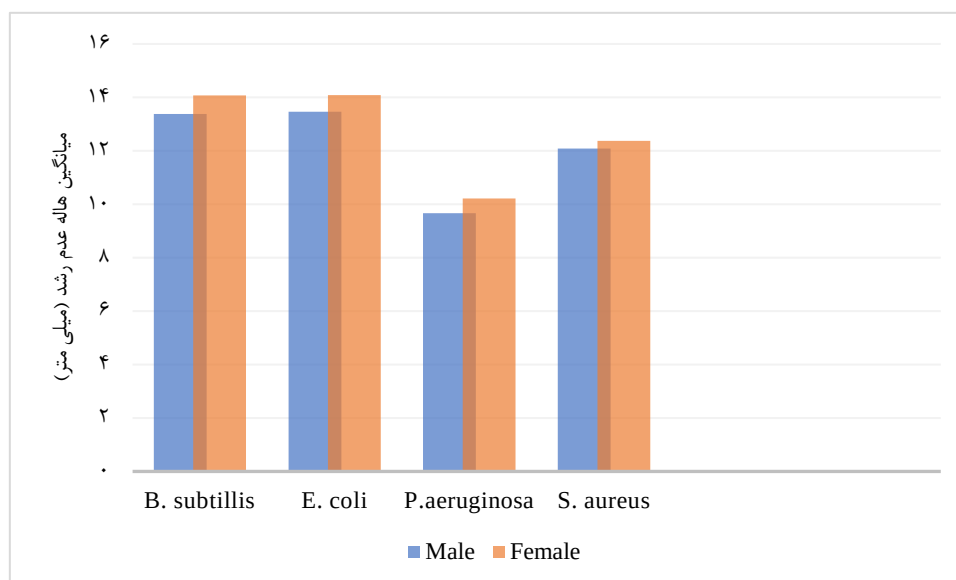
نمودار ۱: مربوط به اثر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده در غلظت‌های مختلف (تاثیر

جنسیت و غلظت عصاره

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

نمودار مربوط به اثر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده علیه باکتری‌های مختلف مورد آزمایش (تاثیر جنسیت) نشان داد که در همه حالت‌ها موکوس تهیه‌شده از ماهی ماده خاصیت ضد باکتریایی کمی قوی تر نسبت به جنس نر دارد (هرچند تفاوت معنی دار نبود و $P>0/001$) و از میان باکتری‌های مورد سنجش نیز باکتری *Bacillus subtilis* بیشترین حساسیت و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره نشان دادند. همچنین باکتری

Escherichia coli و باکتری *Bacillus subtilis* تفاوت معنی‌داری در هاله عدم رشد از خود نشان ندادند با این وجود میانگین هاله عدم رشد باکتری *Bacillus subtilis* با ۱۵ میلی‌متر، کمی بیشتر از میانگین هاله عدم رشد در باکتری *Escherichia coli* (۱۴ میلی‌متر) بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: بررسی تاثیر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده علیه باکتری‌های مختلف مورد آزمایش (تاثیر جنسیت)

نتایج بررسی اثر متقابل جنسیت ماهی و فصل بر روی خاصیت ضد باکتریایی موکوس دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0/001$) بود به این صورت که میانگین هاله عدم رشد برای هر جنس، در فصل بهار بیش‌ترین مقدار را داشت. همچنین در هر فصل موکوس تهیه شده از ماهی جنس ماده خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به موکوس تهیه شده از جنس نر دارد (جدول ۵).

جدول ۵: بررسی تاثیر همزمان جنسیت ماهی و فصل بر روی خاصیت ضد باکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni*

نر	ماده	جنسیت
		فصل
12±0/47 ^a	13±0/47 ^b	بهار
11±0/36 ^b	13±0/37 ^c	پاییز

* نشان حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P < 0/05$) است.

در زمینه‌ی بررسی تاثیر جنسیت بر فعالیت ضدباکتریایی موکوس، مطالعاتی بر روی تعداد محدودی از گونه‌های ماهی انجام شده است. به‌عنوان مثال، غفوری و همکاران (Ghafoori et al., 2014) در مطالعات خود، تغییرات چشمگیری در لیزوزیم موکوس و سرم در *Rutilus frisii kutum* (ماهی سفید دریای خزر) نر و ماده در دماهای فصلی مختلف، رشد گنادی مشاهده

کردند. نسبت تاثیر فاکتورها بر روی تغییرات لیزوزیم، بواسطه‌ی فاکتورهای دمای فصلی (فاکتور اصلی)، فعالیت تولید مثلی و مهاجرت (با تاثیر قابل چشمپوشی)، ترتیب کاهشی نشان داد درحالیکه مقدار لیزوزیم در نمونه‌های نر و ماده، اختلاف چشمگیری نداشت. با کاهش دما و آغاز فصل سرد، کاهش لیزوزیم سرم و موکوس در هر دو جنس نر و ماده مشاهده شد. این موضوع نشان می‌دهد که فاکتورهای فصلی مانند دما می‌تواند بر لیزوزیم به‌عنوان پارامتر ایمنی غیر اختصاصی تاثیر بگذارد. به‌طور کلی همبستگی مثبتی بین فعالیت لیزوزیم و دمای آب در بسیاری از گونه‌ها مانند *Limanda*, *Salmo trutta*, *Pleuronectes platessa* گزارش شده است. به‌نظر می‌رسد با کاهش دما، متابولیسم ماهی و میزان پاتوژن میکروبی در محیط کاهش می‌یابد که این دو عامل در نهایت باعث کاهش میزان لیزوزیم موجود در موکوس ماهی می‌شود که دلیل بر افت فعالیت ضد میکروبی موکوس است (Jung et al., 2012).

لیزوزیم، پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۱۸-۱۴ کیلودالتون یکی از اجزای کلیدی سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی است. این آنزیم در گستره‌ی وسیعی از مهره‌داران شامل ماهیان دریازی و آب شیرین وجود دارد. این آنزیم مستقیماً بر باکتری‌های گرم‌مثبت و لایه‌ی پپتیدوگلیکان داخلی باکتری‌های گرم‌منفی اثر گذاشته و با استفاده از کمپلمان و سایر آنزیم‌ها، موجب از هم گسیختن دیواره‌ی خارجی می‌شود. لیزوزیم، عامل ضد باکتریایی است که توسط سلول‌های سفید خون (عمدتاً نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها و به مقدار کمتری ماکروفاژها) و بافت‌های غنی از لوکوسیت (مانند کلیه، طحال، موکوس پوست، آبشش‌ها و مجرای گوارشی) ترشح می‌شود (Ferguson et al., 1989). بر این اساس این موضوع که فعالیت لیزوزیم می‌تواند در جنس نر و ماده متفاوت باشد نیز مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، Fletcher & White (1976) کاهش چشمگیر فعالیت لیزوزیم سرم را در ماهی lumpsucker نر (*Cyclopterus lumpus*) طی فصل پرورش گزارش دادند در صورتی که فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی ماده افزایش یافت. Wang و همکاران (Wang et al., 2003) نیز نشان دادند که فعالیت سیستم ایمنی در جنس نر و ماده‌ی *Perca fluviatilis* طی دوره‌ی تخم‌ریزی متغیر است به‌طوری‌که مقدار فعالیت مربوط به جنس ماده به‌طور چشمگیری بالاتر از جنس نر گزارش شد. فاکتورهایی که فعالیت ضد باکتریایی لیزوزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهند عبارتند از فصل، دمای محیطی، استرس، گونه‌های ماهی، جنس، سن ماهی، بلوغ جنسی و مواد محرک ایمنی مانند گلوکان (Ghafoori et al., 2014). در مطالعه‌ی حاضر هرچند جنسیت تفاوت معنی داری بر روی خاصیت ضد میکروبی موکوس ماهی نداشت ولی قوی‌تر بودن جزئی موکوس ماهی ماده برای مقابله با پاتوژن‌های بررسی شده نکته‌ی حائز اهمیتی برای مطالعات بعدی خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج بدست آمده، عصاره موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* اثر ضد باکتریایی مناسبی علیه سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش نشان داد. همچنین فاکتور فصل بر میزان اثر ضد باکتریایی موکوس تاثیر نشان داد. با توجه به نتایج

بدست آمده، عصاره موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* به عنوان یک منبع جدید حاوی ترکیبات ضد میکروبی می‌تواند در مقابله با باکتریهای بیماریزا امید بخش باشد و با توجه به پتانسیل ضدباکتریایی عصاره موکوس گل خورک *Periophthalmus waltoni*، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی تاثیر جنسیت ماهی بر روی خاصیت ضد میکروبی موکوس پوست بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- دانشفر، ح (۱۳۸۸) جانورشناسی مهره‌داران. جلد دوم، چاپخانه مدرسه، ۹۱۶ صفحه.
- کیوانی، ی (۱۳۸۴) زیست شناسی ماهی ها، اصفهان: دانشگاه صنعتی اصفهان، مرکز نشر. چاپ اول، ۴۳۸، صفحه.
- محمدپور، ز، نبوی، م. و دهقان مدیسه، س. (۱۳۸۹). بررسی تغییرات فصلی رژیم غذایی ماهی گل خورک *Periophthalmodon schlosseri* براساس شاخص وقوع در سواحل جزر و مدی خور سماعیلی ماهشهر. مجله بیولوژی دریا، صفحات ۹۲-۱۰۲.
- Aguilar, N. (2000). Comparative physiology of air breathing gobies. PhD Thesis. University of California. San Diego. USA.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases, 18: 93-96.
- Balasubramanian, S., Baby Rani, P., Arul Prakash, A. and Prakash, M. (2012). Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable Fishes (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyngodon idella*). African Journal of Microbiology Research, 6(24): 5110-5120.
- Baner, A.W., Kirby, W.M.M., Sherries, J.C. and Truck, M. (1991). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493- 496 .
- Coad, B.C., (2010). Fresh water fish of Iraq. Canadian museum of nature, P.O. Box3443.station D, attuwa, Onatorio, Canada.
- Ferguson, H.W. (1989). Systemic pathology of fish. Iowa state university press, Ames, in: the laboratory fihe, ostrander, G.K, Academic Press .

- Fletcher, T.C. and White, A. (1977). Baldo, B.A. C-reactive protein-like precipitation and lysozyme in lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 57: 353-357.
- Fuochi, V., Volti, G.L., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C., Distefano, A., Petronio, G.P., Barbagallo, I., Viola, M., Furneri, P.M., Di Rosa, M., Avola, R. and Tibullo, D. (2017). Antimicrobial and Anti-Proliferative Effects of Skin Mucus Derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). *Marine Drugs*, 15(11): 342.
- Ghafoori, Z., Heidari, B., Farzadfar, F. and Aghamaali, M. (2014). Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) during reproductive period. *Fish and Shellfish Immunology*, 37(1): 139-46.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., Ober, W.C. and Garrison, C. (2001), Integrated principles of zoology Vol. 15, McGraw-Hill, New York.
- Jung, T.S., Castillo, C.S.D., Javaregowda, P.K., Dalvi, R.S., Nho, S.W. and Bin, P.S. (2012). Seasonal variation and comparative analysis of nonspecific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 38(2): 295–301.
- Krogdahl, A., Sundby, A. and Olli, J(2004).Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture*, 229: 335–360
- Kumari, S., Tyor, A.K. and Bhatnagar, A. (2019). Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. *International Aquatic Research*, <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0231-z> .
- Larson H., Takita T(2004).Two new species of *Periophthalmus* (Teleostei: Gobiidae: Oxudercinae) from northern Australia, and a re-diagnosis of *Periophthalmus novaeguineensis*. *The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*, 20: 175-185
- Lee, Y., Bilung, L.M., Sulaiman, B. and Chong, Y.L. (2020). The antibacterial activity of fish skin mucus with various extraction solvents and their in-vitro evaluation methods. *International Aquatic Research*, 12: 1–21.
- Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, J. and Molle, G. (1996). Characterization and ion channel activities of novel antimicrobial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *European Journal of Biochemistry*, 240:143–149 .

Lethbridge, R. and Potter, I.C. (1982). In the biology of lampreys. Academic Press, 3:377–448 .

Lirio, J.A.C., Deleon, J.A.A. and Villafuerte, A.G. (2018) Antimicrobial activity of epidermal mucus from top aquaculture fish species against medically-important pathogens. Walailak Journal of Science and Technology, 16(5): 329–340 .

Mahadevan, G., Mohan, K., Vinoth, J. and Ravi, V. (2019). Biotic potential of mucus extracts of giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* (Pallas, 1770) from Pichavaram, southeast coast of India. The Journal of Basic and Applied Zoology, 80:13 .

Mangena, T. and Muyima, N.Y. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Letters in Applied Microbiology, 28(4): 291-296.

McKim, J. and Lien, G. (2001). Toxic responses of the skin in Schlenk and Benson target organ toxicity in Marine and fresh water Teleost. 224 pages, Taylor & Francis. New York .

Murdy, E. (1989). A taxonomic revision and cladistics analysis of the Oxudercinae gobies (Gobiidae: Oxudercinae). Research Australia Museum Supply, 11: 1-93.

Nordgarden, U., Hemre, G.I. and Hansen, T(.2002 .)Growth and body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and smolt fed diets varying in protein and lipid contents. Aquaculture, 207: 65– 78.

Ravi, V., Kesavan, K., Sandhya, S. and Rajagopal, S. (2010). Antibacterial activity of the mucus of mudskipper *Boleophthalmus boddarti* (Pallas, 1770) from Vellar Estuary. AES Bioflux, 2(1): 32-40.

Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L. and Vlietinck, A. (1999). Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology, 65(1): 71-77.

Smith, R.J. (1977). In hemical signal in vertebrates' plenum, New York in the laboratory fish, Ostrander, New York.

Subramanian, S., Ross, N.W. and MacKinnon, S.L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 150: 85–92.

- Wang, N., Migaud, L., Acerete, L., Gardeur, N.J., Tort, L. and Fontaine, P. (2003). Mortality in non-specific immune response of Eurasian perch *Perca fluviatilis* during the spawning season. Fish Physiology and Biochemistry, 25: 523-524.
- Wei, O.Y., Xavier, R. and Marimuthu, K. (2010). Screening of antibacterial activity of mucus extract of snakehead fish, *Channa striatus* (Bloch). European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 14:675–681.
- Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. and Richards, S. (1986). In the biology of integument. 2 Vertebrates. 1th edition, Springer-Verlag, 855 pages, Pp: 36-64, Berlin, Heidelberg .

Investigation on antibacterial properties of mucus in (*Periophthalmus waltoni* koumans, 1941) mudskipper

A. Makipour¹, A. Jazayeri^{2*}, I. Darabpour³

Received:2021.4.15

Accepted:2021.5.15

Abstract

Nowadays, emergence and prevalence of drug-resistant pathogenic bacteria has become a great global concern. So, there is an urgent need to discover new antimicrobial agents. The mucus of mudskipper fish may be a new, untapped source for antibacterial agents. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the mucus of *Periophthalmus waltoni*, isolated from Musa estuary, against four pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The effect of gender and seasonal variations on antibacterial activity of mucus was also evaluated. After preparation of the aqueous mucus extract, the antibacterial activity was assessed using disc diffusion method. Also, the minimal Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the mucus extract was determined against two more sensitive bacteria. The results revealed that tested bacteria were susceptible to the mucus extract. *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were the most susceptible and resistant bacteria to the mucus extract, respectively. The gender of the fish did not make a significant difference in the antimicrobial activity of mucus, However, female fish showed slightly higher antimicrobial activity ($P>0/001$). It was also found that fish's mucus has the higher antibacterial property in the spring season ($P<0/001$).

Keywords: Antibacterial activity, Fish, Mucus, *Periophthalmus waltoni*

1- M.Sc., Animal Biology-Biosystematics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khuzestan, Iran

2-Assistant Professor, Sea Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khuzestan, Iran

*(Corresponding author: A.jazayeri@scu.ac.ir)

3-Assistant Professor, Microbiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khuzestan, Iran

بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر تولید اسیدهای فنلی در چند جمعیت کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb)

مرتضی مفید بجنوردی^۱، مهناز اقدسی^{۲*}، سید محمد فاطمی^۳

چکیده

کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb) گیاهی یکساله از تیره کاسنی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر نوع بستر و شرایط کشت بر مقدار شیکوریک اسید در جمعیت‌های مختلف گیاه کاهوی موجدار است. به این منظور بذره‌های جمع‌آوری شده از مناطق (چشمه‌علی، قم، میرزابابیلو، بیارجمند و فیروزکوه)، در گلدان و در دو نوع بستر خاک مزرعه و خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی کشت شد و در دو شرایط فضای باز و اتاقک رشد کشت شدند. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین مقدار شیکوریک اسید (۱/۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در جمعیت فیروزکوه کشت شده در گلدان حاوی خاک منطقه مشاهده شد. بیشترین مقدار کلروژنیک اسید (۰/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و کافئیک اسید (۰/۵۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک) نیز در جمعیت چشمه‌علی کشت شده در گلدان حاوی خاک رویشگاه طبیعی مشاهده شد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مورد بررسی تنوع فیتوشیمیایی بالایی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: خاک، شیکوریک اسید، کاهوی موجدار (*Lactuca undulata* Ledeb)، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار فیزیولوژی مولکولی گیاهی دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

* (نویسنده مسئول: Aghdasi1346@gmail.com)

۳- استادیار سیستماتیک گیاهی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

مقدمه

کاهوی موجدار با نام علمی *Lactuca undulata Ledeb.* گیاهی یک‌ساله از تیره کاسنی است که در اروپا، ترکیه، ایران، قفقاز، روسیه، افغانستان، پاکستان، عراق و اردن گسترش دارد. رویشگاه طبیعی این گیاه در ایران در مناطقی مانند پارک ملی گلستان، اطراف تهران، سمنان، اصفهان، هرمزگان، خراسان، آذربایجان، سیستان و بلوچستان، کرمان و فارس گزارش شده است (Asadi et al., 2013).

بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان داده که گونه‌های مختلف کاهو حاوی متابولیت‌های ارزشمندی از جمله ترکیبات فنلی شامل آنتوسیانین‌ها، اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، اسید فولیک، آسکوربیک‌اسید و سزکونی‌ترین‌های-لاکتونی هستند (Assefa et al., 2019). اولین بار Ramezannejad و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که کاهوی موجدار حاوی فلاونوئیدها، فنل‌ها و مشتقات کافئیک اسید مانند شیکوریک اسید است. این محققان همچنین نشان دادند که ساقه کاهوی موجدار در فاز زایشی دارای مقادیر قابل توجهی از شیکوریک اسید (۲.۳۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) است و به عنوان یک گیاه بومی ایران می‌تواند جایگزین سرخارگل (*Echinacea purpurea*) جهت تولید شیکوریک اسید باشد (Ramezannejad et al., 2019).

شیکوریک اسید ترکیبی با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{18}O_{12}$ است که برای اولین بار از بخش‌های هوایی کاسنی جداسازی شد (Scarpatti & Oriente, 1958). مقدار این ترکیب برحسب گونه، اندام و شرایط رشد متغیر است (Murch et al., 2006). منبع اصلی تولید شیکوریک اسید در دنیا از گیاه سرخارگل است (Thygesen et al., 2007) که بومی ایران نیست امروزه از شیکوریک اسید بعنوان یک ترکیب جدید در سلامت انسان به ویژه در تهیه مکمل‌های غذایی و به عنوان محرک سیستم ایمنی در مقابله با بیماری‌های ویروسی و عفونت‌ها استفاده می‌شود (Nuissier et al., 2010). تاکنون خواص ضدسرطانی (Tsai et al., 2012)، ضد التهاب، التیام زخم (Saeed et al., 2018)، خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Tsai et al., 2017) و بهبود بیماری کبد چرب (Ding et al., 2019) برای شیکوریک اسید گزارش شده است.

کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانوی به ویژه ترکیبات فنلی در گیاهان در سطح جنس، گونه، واریته و جمعیت متفاوت است (Holeski et al., 2012). ژنتیک، شرایط محیطی و برهم‌کنش بین این دو فاکتور از عوامل مهم تاثیرگذار در نوع و مقدار متابولیت‌های ثانوی در گیاهان است (Nicolle et al., 2004). عوامل محیطی گوناگون از جمله دما، شدت و کیفیت نور، ویژگی‌های خاک، مقدار آب در دسترس گیاه با تاثیر بر مسیر سنتز و تجمع ترکیبات فنلی گیاهان باعث افزایش یا کاهش مقدار آنها می‌شوند (Rouphael et al., 2012). در رابطه با تفاوت میزان ترکیبات فنلی در سطح زیرگونه و جمعیت‌های گیاهان مطالعات زیادی وجود دارد. گزارش‌ها نشان داده که در واریته‌های مختلف کاهوی خوراکی در پاسخ به طول موج‌های مختلف نور ترکیبات فنلی گوناگونی تجمع می‌یابند (Ouzounis et al., 2015; Koukounaras et al., 2016). به علاوه چندین مطالعه درباره تنوع لاکتون‌ها در

جمعیت‌های گونه‌های مختلف کاهو در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد (Beharav *et al.*, 2010; Beharav *et al.*, 2015; Beharav *et al.*, 2020). Treuren و همکاران با بررسی پروفایل شیمیایی ۱۵۰ توده از گونه‌های مختلف کاهو شامل *L. saligna*, *L. virosa* و *L. serriola* که در شرایط گلخانه کشت شده بودند، نشان دادند که تنوع فیتوشیمیایی در سطح فراگونه‌ای بین این گیاهان وجود دارد. همچنین این محققان اظهار داشتند که تنوع فیتوشیمیایی به دلیل تنوع ژنتیکی بالا در سطح فراگونه‌ای در این گیاهان است (Treuren *et al.*, 2018). از طرفی دیگر بررسی‌های اولیه بر روی ۵ جمعیت گیاهی کاهوی موجدار جمع آوری شده از مناطق قم، بیارجمند، دشت میرزابایلو در خراسان شمالی، فیروزکوه و چشمه‌علی دامغان نشان داد که بیشترین مقدار شیکوریک اسید (۳/۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های فیروزکوه وجود دارد. در حالی که بیشترین مقدار کافئیک اسید (۱/۲۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های جمع‌آوری شده از قم مشاهده شد (Mofid Bojnoordi *et al.*, 2020).

مشاهدات میدانی ما از رویشگاه‌های کاهوی موجدار (که عموماً در قالب جمعیت‌های پراکنده و دور از هم است) احتمال انقراض آن را در طی چند سال آینده نشان می‌دهد. با نظر به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی سازگار و امکان بهره‌برداری از آنها در جهت تولید فرآورده‌های دارویی از جمله شیکوریک اسید، پژوهش حاضر به بررسی امکان کشت کاهوی موجدار در شرایط آب و هوای گرگان پرداخته است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌تواند به شناسایی عوامل دخیل در تجمع این ترکیبات و نیز اثر شرایط محیطی در تولید مواد موثره کمک نماید.

مواد و روش‌ها

بذرهای کاهوی موجدار در فاصله ۲۰ اردیبهشت تا ۱۰ خرداد از پنج منطقه شهرک پردیسان قم، فیروزکوه، چشمه‌علی دامغان، بیارجمند-روستای دزیان و دشت میرزابایلو واقع در شرق پارک ملی گلستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱: مختصات جغرافیایی و شرایط آب و هوایی مناطق نمونه‌برداری

منطقه نمونه برداری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	نوع آب و هوا	ارتفاع از سطح دریا (متر)
پردیسان قم	۵۰° ۷۰' ۳/۵۵"	۳۴° ۵۰' ۱/۳۴"	گرم و خشک	۹۳۰
فیروزکوه	۵۲° ۴۹' ۱۷/۲"	۳۵° ۴۷' ۱۲/۱"	مرطوب و سردکوهستانی، نیمه	۱۹۵۰
چشمه‌علی دامغان	۵۴° ۵' ۱۱/۶۳"	۳۶° ۱۶' ۴۳/۴۰"	خشک، نیمه خشک و سرد	۱۵۱۶
بیارجمند	۵۵° ۵۹' ۳۴/۱۹۱"	۳۶° ۵۰' ۰/۰۷۳"	گرم و خشک	۱۲۲۶
دشت میرزابایلو	۵۶° ۱۵' ۲۱"	۳۷° ۲۱' ۴۹/۹"	خشک، نیمه خشک و سرد	۱۳۵۰

بستر و شرایط کشت

برای بررسی امکان کشت و پرورش کاهوی موجدار، بذرهاى جمع‌آوری شده در ۲۸ اسفندماه سال ۱۳۹۷ در زمینی واقع در روستای توشن گرگان به صورت طرح بلوک کاملاً تصادفی در کرت‌هایی به اندازه ۲×۱ متر که از قبل آماده شده بودند، کشت شد. بستر خاک مورد استفاده از نوع لوم رسی و بدون افزودن مواد شیمیایی بود. همچنین جهت بررسی اثر عوامل مختلف بر مقدار شیکوریک اسید و دیگر ترکیبات آن در کاهوی موجدار، بذرها در گلدان‌های پلاستیکی به عمق ۲۰ و قطر ۱۵ سانتی‌متر در دو بستر خاک مزرعه و خاک جمع‌آوری‌شده از رویشگاه طبیعی گیاه کشت شدند. برای هر بستر کشت ۳ گلدان انتخاب و در هر گلدان ۵ عدد بذر کشت شدند که پس از جوانه‌زنی تعداد دو عدد گیاه در هر گلدان تا مرحله زایشی نگهداری شدند. سپس هر گروه از گلدان‌ها در دو شرایط فضای باز و اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر ثانیه قرار داده شدند. تا زمان جوانه‌زنی بذرها، آبیاری هر دو روز یکبار و پس از جوانه‌زدن هر ۴ روز یکبار انجام شد. عملیات نمونه‌برداری با شروع فاز زایشی و در اواخر خرداد ماه انجام شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های هر منطقه به‌طور جداگانه، ساقه گیاه از دیگر قسمت‌ها تفکیک شده و پس از خشک شدن در سایه و با تهویه مناسب، جهت انجام سنجش‌های بعدی به آزمایشگاه انتقال یافت.

اندازه‌گیری وزن خشک

نمونه‌های ریشه و اندام هوایی به طور جداگانه در آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز خشک و سپس وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

آنالیز خاک

همزمان با جمع‌آوری بذرها و نمونه‌های گیاهی از رویشگاه‌های طبیعی، خاک ریزوسفر گیاه و نیز خاک مزرعه جهت بررسی‌های بعدی جمع‌آوری و به آزمایشگاه خاک‌شناسی شرکت مهندسين مشاور خاک‌آزما نگین منتقل شد. سپس فاکتورهای مختلف مانند pH، هدایت الکتریکی (EC) (توسط کندانداکتومتر)، درصد آهک (به روش تیتراسیون) و نوع بافت خاک مورد بررسی و سنجش قرار گرفتند.

سنجش محتوی شیکوریک اسید، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید

عصاره‌گیری نمونه‌ها به روش Luo و همکاران (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم پودر اندام هوایی در استونیتریل ۲۰ درصد (V/V) خیسانده شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و بر روی شیکر قرار گرفت. عصاره‌ی حاصل بعد

از فیلترشدن توسط کاغذ صافی به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در نهایت، عصاره شفاف رویی به منظور سنجش شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیزهای HPLC

جهت سنجش اسیدهای فنلی از دستگاه HPL (مدل Hitachi-Japan) مجهز به ستون C_{18} (۴.۶ mm×250 mm) با آشکارساز UV/VIS و ردیاب Diod Array استفاده شد. روش انجام آنالیز از نوع ایزاکراتیک و سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص (حلال A) و آب‌اسیدی شده با ۰/۱ درصد فسفریک اسید (حلال B) بود. طول‌موج‌های آشکارسازی ۳۳۰ نانومتر برای شیکوریک اسید و ۲۷۸ نانومتر برای کلروژنیک و کافئیک اسید بود. حجم ۲۰ میکرولیتر از عصاره پس از فیلترشدن (۰/۴۵ میکرون) به دستگاه تزریق شد.

به منظور رسم نمودارهای استاندارد، محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ (میلی گرم بر لیتر) از هریک از استانداردهای مورد سنجش (Merk- Germany) تهیه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از این محلول‌ها به دستگاه تزریق شدند. نمودار رگرسیون بر اساس مقادیر مختلف این استانداردها و مقادیر مختلف سطح زیر پیک رسم گردید. بعد از ظهور پیک‌های مورد نظر از عصاره‌های تزریق شده، سطح زیر منحنی پیک‌ها محاسبه و سپس در فرمول حاصل از خط رگرسیون مربوط به منحنی استاندارد ترکیبات شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید قرار داده شد تا غلظت هر یک از ترکیبات مورد نظر به دست آید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تمامی سنجش‌ها با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 22) انجام شد. از آنالیز یکطرفه دانکن برای مشخص کردن اختلاف معنی‌دار بین نتایج استفاده شد. سطح اطمینان برای وجود اختلاف معنی‌دار آماری، ۹۵ درصد در نظر گرفته شد. رسم نمودارها و جدول‌ها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

آنالیز خاک: آنالیز نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف کاهوی موجدار نشان داد که بافت خاک مناطق چشمه‌علی و بیارجمند لوم ماسه‌ای بوده، منطقه میرزابایلو لوم، منطقه فیروزکوه لوم رسی و منطقه قم ماسه لومی بوده است. بیشترین مقدار EC در خاک مناطق فیروزکوه، میرزابایلو و چشمه‌علی و کمترین مقدار در قم و بیارجمند ارزیابی شد. نوع خاک هر پنج رویشگاه آهکی با pH قلیایی ضعیف می‌باشد. منطقه بیارجمند و چشمه‌علی بیشترین و منطقه فیروزکوه و قم کمترین درصد ماده آلی را دارند. نتایج حاصل از آنالیز خاک مزرعه نیز نشان داد که بافت خاک از نوع لوم رسی بوده و در مقایسه

با خاک مناطق نمونه‌برداری دارای مقادیر بیشتر درصد ماده آلی و مقادیر کمتر آهک است. در این آزمایش pH خاک زراعی از نوع قلیایی ضعیف بوده است (جدول ۲).

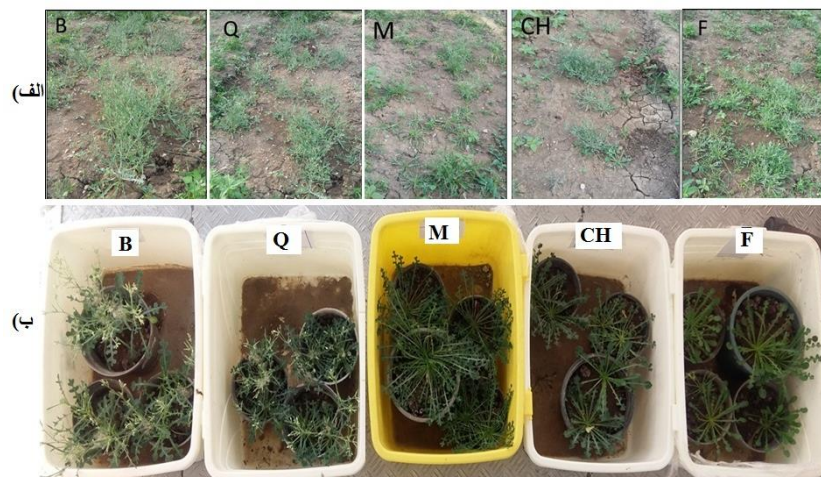
جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهان: بذره‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف که در شرایط مزرعه و یا گلدان‌ها در فضای باز و یا اتاق رشد کشت شده بودند، پس از حدود بیست روز جوانه‌زنی را آغاز کردند. پس از دو ماه گیاهان وارد فاز زایشی (تشکیل ساقه گل‌آذین) شده و پس از حدود ده تا پانزده روز اولین گل‌ها ظاهر شدند. بذره‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه قم و بیارجمند نیز پس از دو ماه (همزمان با گیاهان کشت شده در مزرعه) با تشکیل ساقه گل‌آذین وارد فاز زایشی شده و چرخه زندگی خود را تکمیل کردند. درحالی که نمونه‌های میرزابایلو، چشمه‌علی و فیروزکوه با تاخیر و پس از طی سه ماه وارد فاز زایشی شدند. در بین ۵ جمعیت مورد بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از میرزابایلو که در اتاقک کشت رشد یافته بودند، از رشد بیشتری در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد که طول و وزن تر و خشک ساقه و ریشه در پنج جمعیت کاهوی موج کشت‌شده در شرایط مختلف تفاوت معنی‌داری را در سطح کمتر از یک درصد نشان می‌دهند. بیشترین مقدار طول ساقه ($52/4 \pm 66/23$ cm) در نمونه‌های میرزابایلو که در اتاقک رشد کشت شدند مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که هر پنج جمعیت گیاهان کشت‌شده در مزرعه طول ساقه و ریشه بالاتری در مقایسه با گیاهان کشت‌شده در گلدان داشتند. در بین گیاهان کشت‌شده در شرایط مزرعه و اتاق رشد، نمونه‌های میرزابایلو و بیارجمند دارای بیشترین مقدار طول ساقه بودند که با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان دادند (شکل ۲ و ۳).

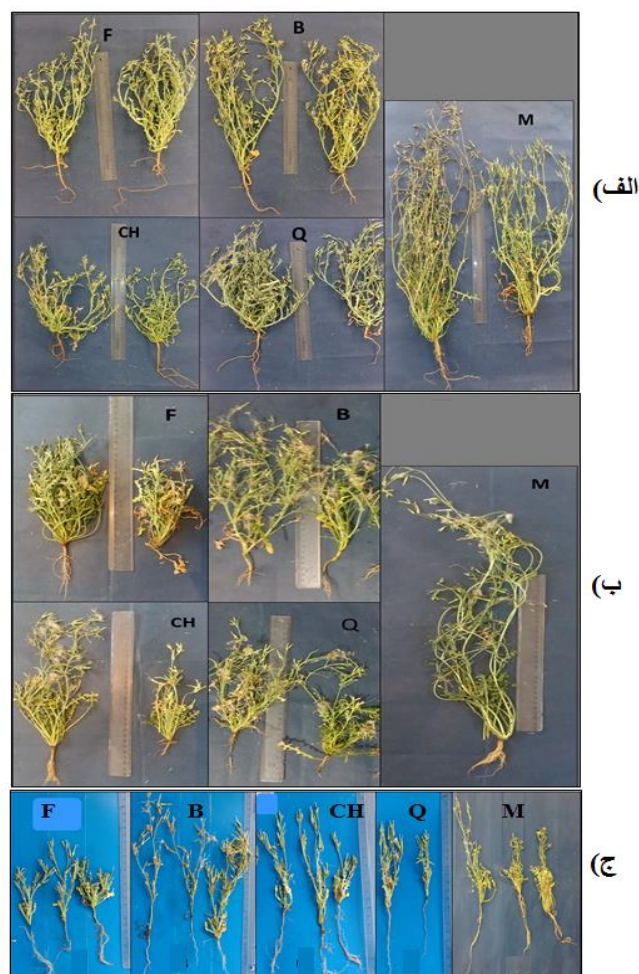
بیشترین مقدار وزن تر و خشک ساقه و ریشه در هر پنج جمعیت در نمونه‌های کشت شده در شرایط مزرعه مشاهده شد. در بین نمونه‌های کشت شده در شرایط مزرعه، نمونه میرزابایلو و قم به‌ترتیب با $11/53 \pm 33/78$ و $4/78 \pm 26/11$ گرم بیشترین مقدار وزن تر را نشان دادند. همچنین بیشترین وزن خشک ساقه به ترتیب در نمونه میرزابایلو و قم به مقدار $0/52 \pm 6/85$ و $5/35 \pm 0/85$ گرم مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۲: تجزیه شیمیایی نمونه خاک مناطق رویش گیاه و خاک زراعی گرگان

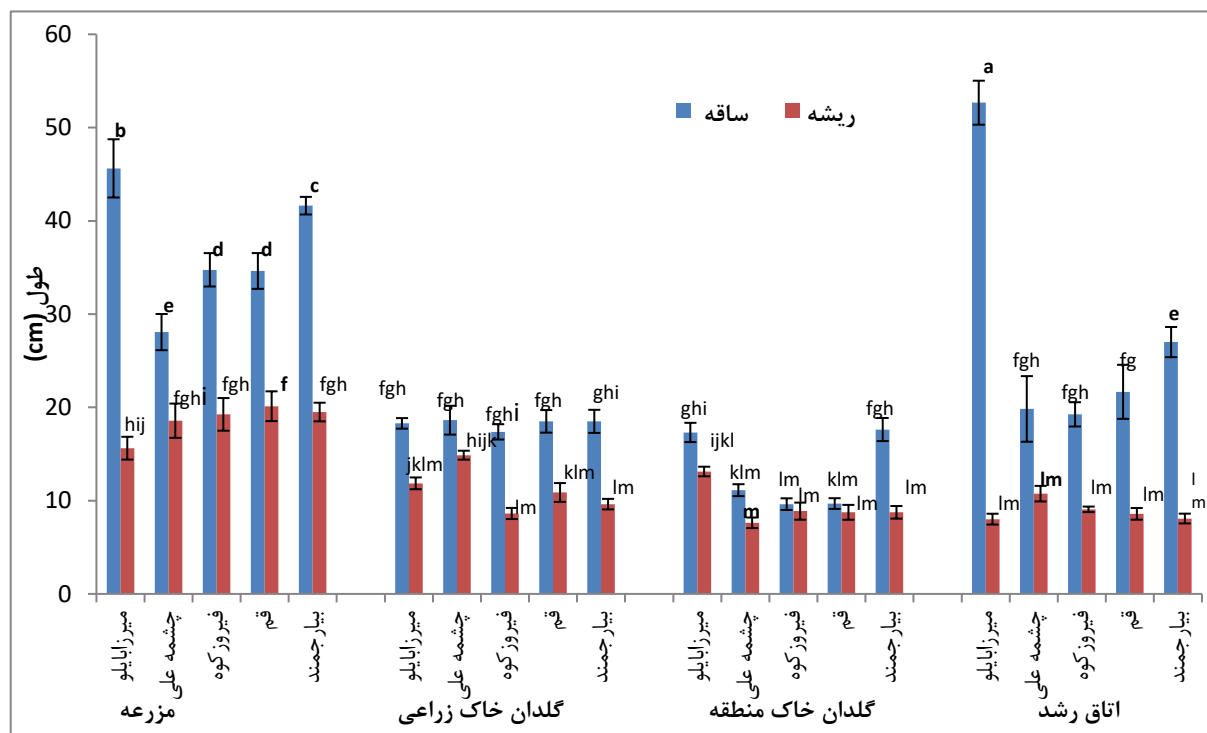
منطقه	بافت خاک	شن (%)	لای (%)	رس (%)	آهک (%)	ماده آلی (%)	pH	EC (Ds/m)
بیارجمند	لوم شنی	۶۶	۲۴	۱۰	۲۵/۶۲	۱/۱۹	۷/۶۹	۰/۷۷
قم	شن لومی	۸۰	۱۲	۸	۱۷/۶۲	۰/۰۳۴	۷/۶۸	۰/۹۱
چشمه علی دامغان	لوم شنی	۴۶	۴۴	۱۰	۵۶/۸۷	۱/۱۹	۷/۸۱	۱/۷۲
میرزابایلو	لوم	۴۶	۲۴	۲۰	۳۳/۶۲	۰/۷۴	۸/۱۰	۱/۷۲
فیروزکوه	لوم رسی	۲۶	۴۲	۳۲	۳۴/۱۲	۰/۰۳۴	۷/۶۹	۳۴/۱۲
گرگان	لوم رسی	۱۲	۵۲	۳۶	۱۲/۶۲	۲/۷۷	۷/۶۰	۲/۷۷



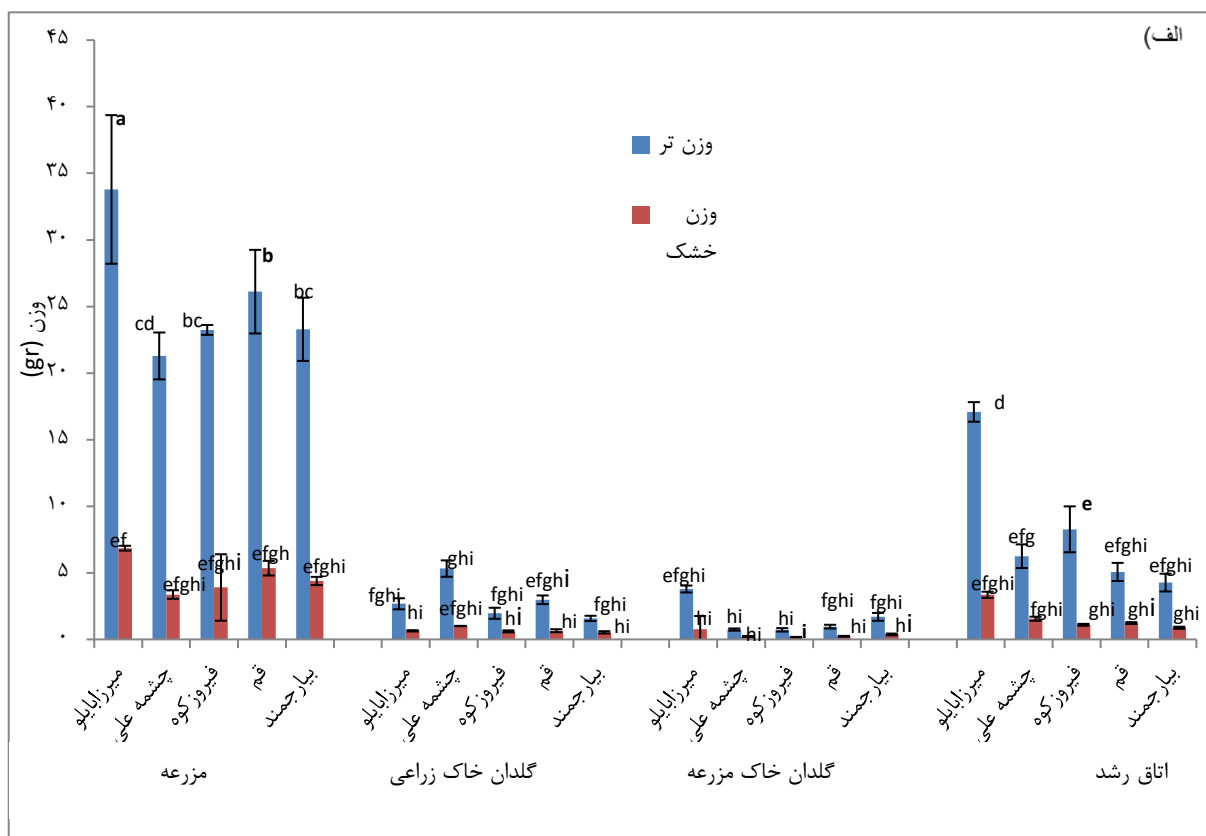
شکل ۱: گیاهان حاصل از کشت بذر پنج جمعیت کاهوی موجدار در (الف) مزرعه و (ب) اتاقک رشد. F: فیروزکوه، CH: چشمه‌علی، M: میرزابایلو، Q: قم و B: بیارجمند پس از ۲ ماه.

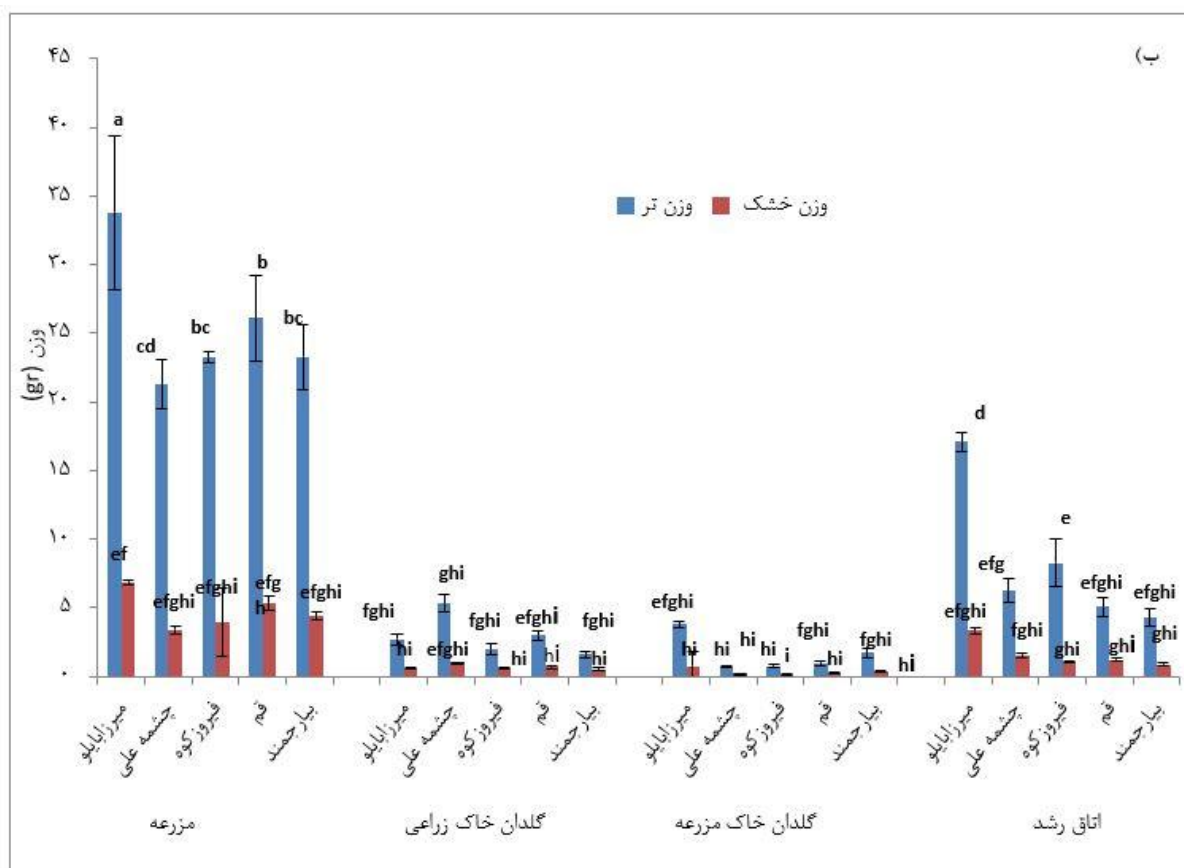


شکل ۲: کاهوی موجدار برداشت‌شده در فاز زایشی حاصل از کشت در (الف) مزرعه، (ب) اتاقک رشد و (ج) گلدان با خاک منطقه در شرایط آب و هوای گرگان. F: فیروزکوه، CH: چشمه‌علی، M: میرزابایلو، Q: قم و B: بیارجمند.



شکل ۳: میانگین طول ساقه و ریشه در ۵ جمعیت کاهوی موجد در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت پس از ۴ ماه. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف معیار است.





شکل ۴: میانگین وزن تر و خشک (الف) ساقه و (ب) ریشه در ۵ جمعیت کاهوی موجدار کشت شده در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت پس از ۴ ماه. هر ستون نشان دهنده میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف معیار است.

بررسی مقدار کافئیک اسید و مشتقات آن به روش HPLC

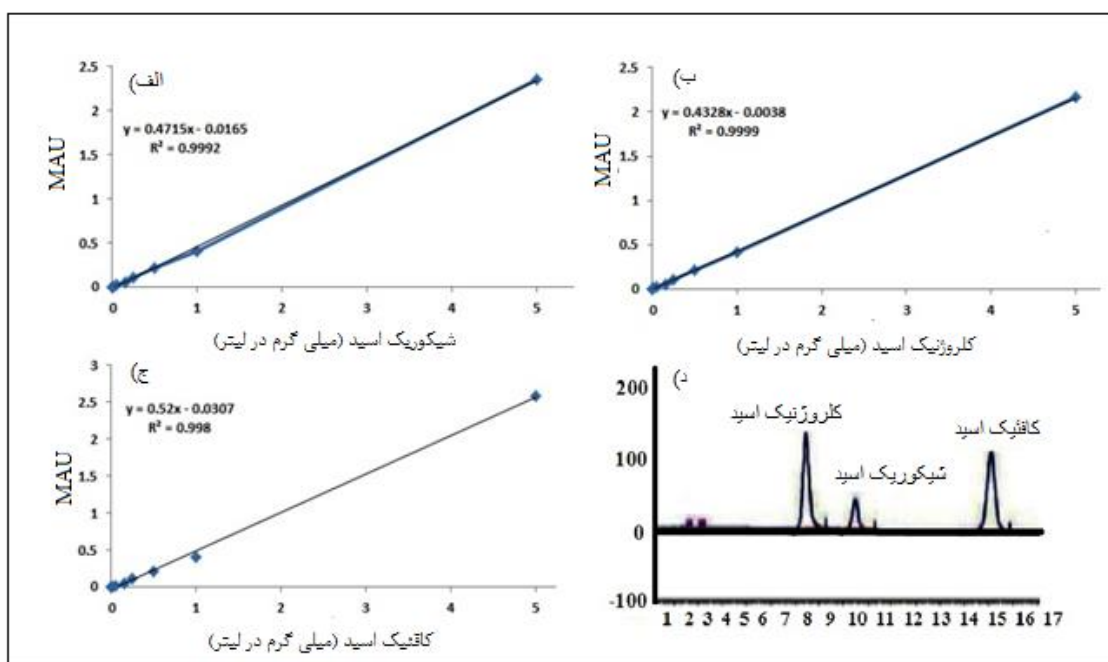
در ابتدا غلظت‌های مختلف ترکیبات استاندارد به دستگاه HPLC تزریق و زمان بازداری هر یک از ترکیبات مورد نظر به دست آمد. بنا به نتایج حاضر زمان بازداری کلروژنیک اسید، شیکوریک اسید و کافئیک اسید به ترتیب در دقایق ۸/۵، ۱۰ و ۱۴/۵ است (شکل ۵).

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش میزان کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید نشان داد که میانگین مقدار این ترکیبات در ساقه گیاهان جمع‌آوری شده از پنج منطقه مختلف که در شرایط مختلف کشت شده‌اند، در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند. نتایج حاصل نشان داد که در تمام جمعیت‌های مورد بررسی، میزان شیکوریک اسید در گیاهانی که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند بیشتر از نمونه‌هایی بود که در مزرعه و یا اتاقک کشت رشد یافته بودند. در این تحقیق بالاترین میزان شیکوریک اسید در نمونه‌هایی که از منطقه فیروزکوه جمع‌آوری شده و در گلدان حاوی خاک منطقه (۱/۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و خاک زراعی (۱/۲۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) رشد یافته بودند مشاهده شد. همچنین

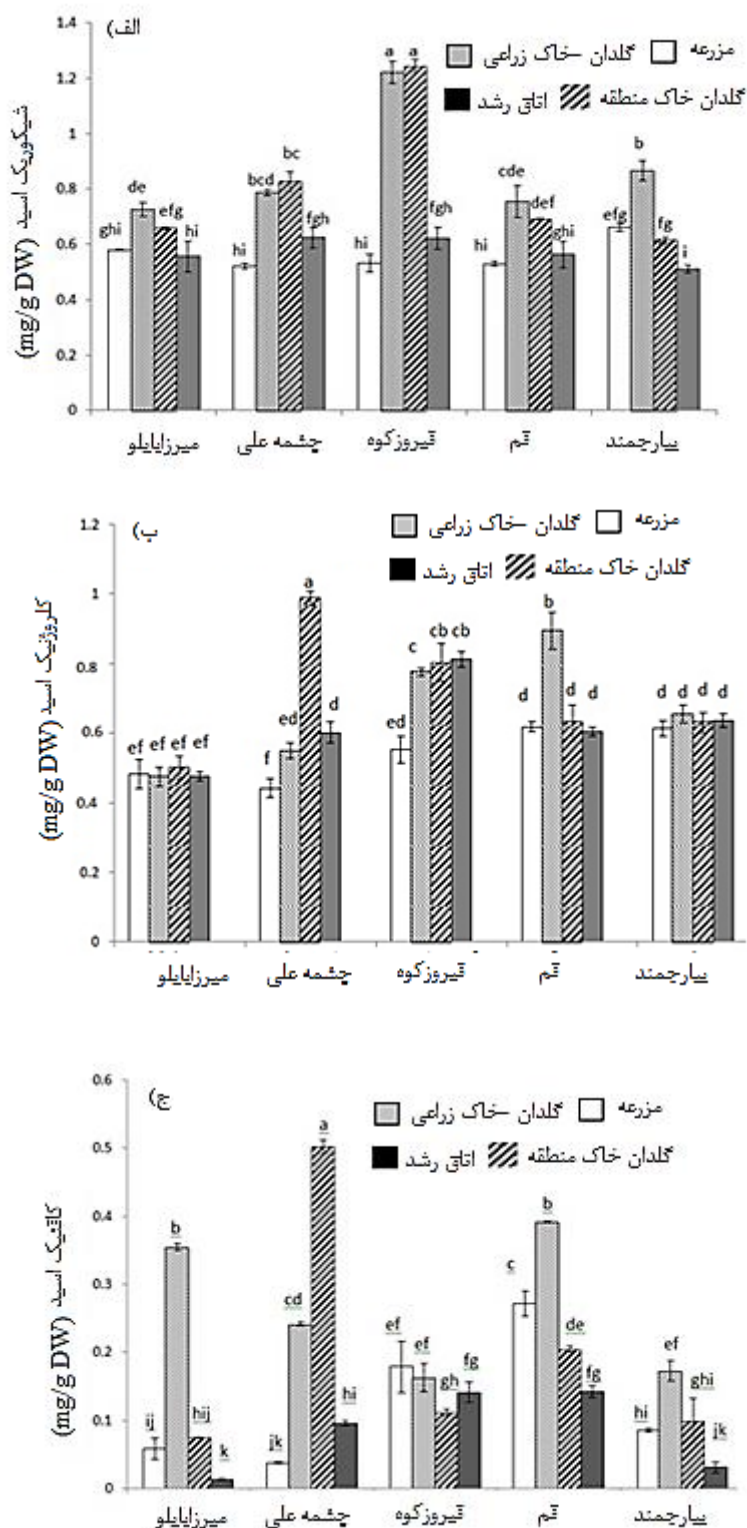
کمترین مقدار شیکوریک اسید در نمونه‌هایی که از منطقه بیارجمند جمع‌آوری شده و در اتاقک رشد کشت شده بودند، مشاهده شد (شکل ۶-الف).

میانگین مقدار کلروژنیک اسید در دو نمونه میرزابایلو و بیارجمند که در شرایط مختلف کشت شده بودند، تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در حالی که بیشترین مقدار کلروژنیک اسید (۰/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه چشمه‌علی که در گلدان حاوی خاک منطقه رویش یافته بودند مشاهده شد. همچنین نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه قم که در گلدان حاوی خاک زراعی رشد یافته بودند حاوی مقادیر بالایی از کلروژنیک اسید (۰/۸۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در خود بودند که با سایر گیاهان تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۶-ب).

بیشترین مقدار کافئیک اسید (۰/۵۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در نمونه‌های چشمه‌علی که در گلدان حاوی خاک منطقه رویش یافته بودند، مشاهده شد. در حالی که بیشترین مقدار کافئیک اسید در نمونه‌های میرزا بایلو و قم که در گلدان حاوی خاک زراعی رویش یافته بودند، مشاهده شد. این گیاهان در مقایسه با سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری را در مقدار کافئیک اسید نشان دادند (شکل ۶-ج).



شکل ۵: نمودار کالبراسیون (الف) شیکوریک اسید، (ب) کلروژنیک اسید، (ج) و کافئیک اسید و (د) کروماتوگرام نمونه استاندارد. شدت جذب در واحد MAU (Measurement of Absorbance Unit) بیان شده است.



شکل ۶: الف) شیکوریک اسید، ب) کلروژنیک اسید و ج) کاتیک اسید در ۵ جمعیت کاهوی موجودار کشت شده در بسترهای مختلف خاک مزرعه و خاک منطقه (رویشگاه طبیعی گیاه) در دو شرایط فضای باز و اتاقک کشت. هر ستون نشان دهنده میانگین داده ها $\pm$ انحراف معیار است ($n=6$). ستون های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۰/۰۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

بحث

مقدار شیکوریک اسید در گیاهان کشت شده در شرایط آب و هوای گرگان در هر پنج جمعیت نسبت به گیاهان برداشت‌شده از طبیعت کاهش معنی‌داری نشان داد. این نتیجه مطابق با مطالعه Binns و همکاران است که گزارش کردند گونه‌های مختلف اکیناسه که بصورت خودرو در طبیعت رشد می‌کنند، مقدار شیکوریک اسید بیشتری نسبت به گیاهان کشت شده دارند (Binns *et al.*, 2002). عوامل محیطی مثل دما، رطوبت، بارش و نور اثر مستقیم بر روی مقدار متابولیت‌های گیاهی دارند (Lee & Scagel, 2013).

نتایج حاضر نشان داد که مقدار رشد و همچنین میانگین مقدار شیکوریک، کلروژنیک و کافئیک اسید در جمعیت‌های کاهوی موجدار تفاوت معنی‌دار دارند. بیشترین مقدار رشد در گیاهان جمعیت میرزابایلو مشاهده شد که همراه با تجمع کمترین میزان شیکوریک اسید در مقایسه با سایر جمعیت‌ها بود. این نتیجه نشان‌دهنده تخصیص بیشتر کربن فتوسنتزی در این جمعیت در جهت رشد گیاه و استفاده کمتر آن برای تولید متابولیت‌های ثانوی است. بررسی میزان شیکوریک اسید در بین جمعیت‌های مختلف کاهوی موجدار که از رویشگاه طبیعی خود نمونه‌برداری شده بودند نشان داد که بالاترین مقدار این ترکیب در جمعیت فیروزکوه (۳/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) وجود دارد (Mofid Bojnoordi *et al.*, 2020). نتایج حاضر نیز نشان داد که بیشترین مقدار شیکوریک اسید (در بین جمعیت‌های مختلف که در شرایط آب و هوای گرگان کشت شده بودند) در جمعیت فیروزکوه که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند (۱/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به دست آمد. با توجه به کشت گیاهان در شرایط یکسان، این نتایج نشان‌دهنده تاثیر ژنتیک بر مسیر سنتز و تجمع این ترکیبات در جمعیت‌های مختلف گیاه است. این نتایج قابل مقایسه با مطالعه Assefa و همکاران است که با کشت ۲۲ واریته کاهوی خوراکی در شرایط یکسان گزارش کردند که مقدار اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و لاکتون‌های سزکوئی‌ترین در این واریته‌ها متفاوت بوده و این تنوع، پایه و اساس ژنتیکی دارد (Assefa *et al.*, 2019).

مقدار شیکوریک اسید در گیاهان کشت‌شده در گلدان در مقایسه با گیاهانی که در مزرعه کشت شده بودند، افزایش معنی‌دار نشان داد. اما مقدار رشد گیاهان کشت شده در گلدان، کمتر از گیاهان کشت شده در مزرعه بود. این نتیجه احتمالاً ناشی از تنش بیشتر در گلدان (در مقایسه با زمین) است که با تغییر مسیر کربن به سمت ساخت متابولیت‌ها باعث کاهش رشد و افزایش ترکیبات دفاعی در مقابل تنش‌ها شده است. با توجه به اینکه گلدان‌ها نسبت به سطح زمین ارتفاع دارند احتمالاً مقدار میزان نوسان دمای شب و روز در آنها بیشتر بوده و این عامل نقش موثری در افزایش شیکوریک اسید در گیاهان کشت شده در گلدان دارد. چنان که گیاهان کشت شده در گلدان و در اتاقک رشد که متحمل نوسان دمایی کمتری بودند مقدار شیکوریک اسید کمتری نیز داشتند. در رابطه با اثر دما بر متابولیسم ترکیبات فنلی می‌توان به نتایج Tudela و همکاران در سال ۲۰۱۷

اشاره کرد که گزارش کردند دمای پایین در فصل رشد باعث کاهش قهوه‌ای شدن کاهو در ارتباط با متابولیسم ترکیبات فنلی می‌گردد (Tudela et al., 2017).

نتایج حاضر نشان داد که مقدار کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید در هر پنج جمعیت، در گیاهان رشد یافته در فضای باز در مقایسه با گیاهان رشد یافته در اتاقک رشد، بیشتر است. باتوجه به اینکه گیاهان رشد یافته در اتاقک رشد در خاک استریل رویش داشته و همچنین این فضا عاری از پاتوژن‌ها است، احتمال دارد افزایش میزان ترکیبات فوق در گیاهان رشد یافته در فضای باز، بدلیل تنش زیستی و یا برهم‌کنش گیاه با قارچ‌ها و میکروب‌های خاک رخ داده باشد. از عوامل تاثیرگذار دیگر بر مقدار ترکیبات مورد بررسی می‌توان به تفاوت نوسان دما، طول موج و شدت نور در فضای باز و اتاق رشد اشاره کرد. گیاهان رشد یافته در فضای باز تحت نوسان دمایی و شدت نور بیشتر نسبت به گیاهان اتاق رشد هستند. از طرفی امکان تابش نور فرابنفش در گیاهان تحت تابش نور خورشید وجود دارد. در این رابطه می‌توان به مطالعه Romani و همکاران اشاره کرد که گزارش کردند کاهوی رشد کرده در شرایط مزرعه نسبت به گیاهان رشد کرده در گلخانه با پوشش پلی‌کربنات میزان شیکوریک اسید بیشتری نشان دادند (Romani et al., 2002). همچنین Yildirim و Turker گزارش کردند مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان *Fragaria vesca* L. رشد کرده در فضای باز در مقایسه با گیاهان رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی و بر روی محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) حداقل ۵ برابر بیشتر بوده است (Yildirim & Turker, 2014).

در گیاهان کاشته شده در گلدان حاوی خاک منطقه و خاک زراعی، در بیشتر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری در مقدار کافئیک اسید، شیکوریک اسید و کلروژنیک اسید مشاهده نشد. خاک زراعی در مقایسه با خاک جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های طبیعی گیاه دارای درصد ماده آلی بیشتر و آهک کمتر است. در این مطالعه مقدار نیتروژن خاک اندازه‌گیری نشده است، اما مطالعات زیادی در رابطه با اثر منفی نیتروژن خاک بر مقدار ترکیبات فنلی گیاهان وجود دارد. از جمله Qadir و همکاران گزارش کردند که در کاهوی خوراکی با افزایش مقدار نیتروژن خاک، میزان اسیدهای فنلی و فلاوئیدها کاهش یافت (Qadir et al., 2017). همچنین Mampholo و همکاران نشان دادند که با افزایش نیتروژن، مقدار اسیدهای فنلی (شیکوریک، کفتاریک، کلروژنیک و کافئیک اسید) و فلاوونوئیدها (ایزورامنتین، کوئرستین، میریستین و اپی‌کاتشین) در واریته‌های مختلف کاهوی خوراکی که در شرایط هیدروپونیک رشد یافته بودند، کاهش یافت (Mampholo et al., 2018).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که سطوح بالایی از تنوع بین جمعیت‌های کاهوی موجد از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی وجود دارد. با توجه به کشت جمعیت‌ها در شرایط یکسان، این امر نشان‌دهنده پتانسیل ژنتیکی بالا در بین

جمعیت‌های مورد بررسی است. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که در بین جمعیت‌های مورد بررسی، بالاترین مقدار شیکوریک اسید (۱/۲۴ میلی گرم برگرم وزن خشک) در جمعیت فیروزکوه که در گلدان و در فضای باز رشد یافته بودند مشاهده می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه گلستان انجام شده است.

منابع

- Asadi, M., Safavi, S.R., Naseh, Y., Jafari, E. and Heydarnia, N. (2013). Flora of Iran, Asteraceae Tribe Cichorieae (No. 77). Research Institute of Forests & Rangelands Press, 548.
- Assefa, A.D., Choi, S., Lee, J.E. Sung, J.S. and Hur, O.S., Ro, N.Y., Lee, H.S., Jang, S.W. and Rhee, J.H. (2019). Identification and quantification of selected metabolites in differently pigmented leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars harvested at mature and bolting stages. BMC Chemistry, 13:56-68.
- Beharav, A., Ben-David, R., Doležalová, I. and Lebeda, A. (2010). Eco-Geographical Distribution of *Lactuca aculeata* Natural Populations in Northeastern Israel. Genetic Resources and Crop Evolution, 57: 679–86.
- Beharav, A., Stojakowska, A., Ben-David, R., Malarz, J., Michalska, K. and Kisiel, W. (2015). Variation of sesquiterpene lactone contents in *Lactuca georgica* natural populations from Armenia. Genetical Resource Crop Evolution, 62: 431–441.
- Beharav, A., Malarz, J., Michalska, K., Ben-David, R. and Stojakowska, A. (2020). Variation of sesquiterpene lactone contents in *Lactuca altaica* natural populations from Armenia. Biochemical Systematics and Ecology, 90: 104030.
- Binns S.E, Livesey J.F, Arnason J.T and Baum B.R. (2002). Phytochemical variation in Echinacea from roots and flower heads of wild and cultivated populations. Journal Agriculture and Food Chemistry, 50:3673–3687.
- Ding, H., Ci, X., Cheng, H, Yu, Q. and Li, D. (2019). Chicoric acid alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through anti-inflammatory and anti-oxidant activities. International Immunopharmacology, 66: 169–176.
- Holeski, L.M., Hillstrom, M.L., Whitham, T.G. and Lindroth, R.L. (2012). Relative importance of genetic, ontogenetic, induction and seasonal variation in producing amultivariate defense phenotype in a foundation treespecies. Oecologia, 170: 695–707.

- Koukounaras, A., Siomos, A.S., Gerasopoulos, D. and Karamanoli, K. (2016). Genotype, ultraviolet irradiation, and harvesting time interaction effects on secondary metabolites of whole lettuce and browning of fresh-cut product. *Journal Horticultural Science Biotechnology*, 91:491–496.
- Lee, J. and Scagel, C.f. (2013). Chicoric acid: chemistry, distribution and production. *Frontiers of Chemistry*, 1:40-45.
- Luo, X.B., Chen, B., Yao, S.Z. and Zeng, J.G. (2003). Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives & alkamides in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by HPLC-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatophy*, 986: 73-81.
- Mampholo, B.M., Maboko, M.M., Soundy, P. and Sivakumar, D. (2018). Variety-specific responses of lettuce grown in a gravel-film technique closed hydroponic system to N supply on yield, morphology, phytochemicals, mineral content and safety. *Journal of Integrative Agriculture*, 17: 2447–2457.
- Mofid Bojnoordi, M., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2020). An investigation on phytochemical components and antioxidant activity of *Lactuca undulate* in 5 natural habitats of Iran. *Journal of medicinal plants*, 75:65-75.
- Murch, S.J., Peiris, S.E., Shi, W.L., Zobayed, S.M.A. and Saxena, P.K. (2006). Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition. *Plant Cell Reports*, 25: 522–532.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P. and Remesy, C. (2004). Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 2061-2069.
- Nuissier, G., Rezzonico, B. and Grignon-Dubois, M. (2010). Chicoric acid from *Syringodium filiforme*. *Food Chemistry*, 120: 783–788.
- Ouzounis, T., Parjikolaei, B.R., Frette, X., Rosenqvist, E. and Ottosen, C.O. (2015). Pre-dawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa* *Front. Plant Science*, 6:19-25.
- Qadir, O., Siervo, M., Seal, C.J. and Brandt, K. (2017). Manipulation of contents of nitrate, phenolic acids, chlorophylls, and carotenoids in lettuce (*Lactuca sativa* L.) via contrasting responses to nitrogen fertilizer when grown in a controlled environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 10003–10010.
- Ramezannejad, R., Aghdasi, M. and Fatemi, M. (2019). An investigation on chicoric acid content and antioxidant activity in some Iranian native species compared to *Echinacea purpurea* L. in different developmental stages. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 34: 909-923.

- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F. and Colla, G. (2012). Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 680-688.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A. and Heimler, D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry*, 79: 337-342.
- Saeed, M., Babazadeh, D., Arain, M.A., Naveed, M., Shah, Q.A., Kamboh, A.A., Moshaveri, A., Modarresi-Ghazani, F., Hejazi, V. and Chao, S. (2018). The use of chicoric acid from *Echinacea purpurea* as a feed additive in poultry nutrition, *World's Poultry Science Journal*, 74: 69-78.
- Scarpati, M.L. and Oriente, G. (1958). Chicoric acid (dicaffeoyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron*, 4:43-48.
- Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H., Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea* , alone and in combination. *Food Chemistry*, 101: 74-81.
- Treuren, R.V., van Eekelen, H.D.L.M., Wehrens, R. and de Vos, R.C.H. (2018). Metabolite variation in the lettuce gene pool: towards healthier crop varieties and food. *Metabolomics*, 14:146-153.
- Tsai, Y.L., Chiu, C.C., Chen, J.Y.F., Chan, K.C. and Lin, S.D. (2012). Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. *Journal of ethnopharmacology*, 143. 914-919.
- Tsai, K.L., Kao, C.L., Hung, C.H., Cheng, Y.H., Lin, H.C. and Chu, P.M. (2017). Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by anti-oxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget*, 8: 29600-29612.
- Tudela, J.A., Hernandez, N., Perez-Vicente, A. and Gil, M.I. (2017). Growing season climates affect quality of fresh-cut lettuce. *Postharvest Biology Technology*, 123: 60-68.
- Yildirim, A.B. and Turker, A.U. (2014). Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae*, 169: 169-178.

Impact of planting bed and culture conditions on phenolic acid production in some *Lactuca undulate* Ledeb populations

M. Mofid Bojnoordi¹, M. Aghdasi^{2*}, M. Fatemi³

Received:2021.1.12

Accepted:2021.4.11

Abstract

Lactuca undulata Ledeb. belongs to the family of Asteraceae. The present study aimed to investigate the impact of planting bed and conditions culture on cichoric acid production in different populations. For this purpose, collected seeds from regions (Cheshmeh Ali Damghan, Qom, Mirzabailo, Biarjamand, and Firoozkooh) were planted in pots with two different kinds of soil (field soil and soil collected from natural habitat) and kept in either outdoor or growth chamber. The current data revealed that the highest amount of chicoric acid (1.24 mg/kg DW) was observed in the Firoozkooh population which was grown in pots containing soil of the region. The highest amount of chlorogenic acid (0.98 mg/g DW) and caffeic acid (0.50 mg/g DW) were also observed in the Cheshmeh Ali population which grown in pots containing natural habit soil. The present results showed that there is high phytochemical diversity among the studied populations.

Keywords: *Caffeic acid, Chlorogenic acid, Cichoric acid, Lactuca undulate Ledeb, Soil*

1- PhD student in Plant Physiology, Golestan University, Gorgan, Iran

2- Associate Professor of Plant Molecular Physiology, Golestan University, Gorgan, Iran

*(Corresponding author: Aghdasi1346@gmail.com)

3- Assistant Professor of Plant Systematics, Golestan University, Gorgan, Iran

بررسی میزان صید کفزیان در آب‌های جنوب کشور (خلیج فارس و دریای عمان) با تاکید بر آب‌های استان سیستان و بلوچستان

سید احمد رضا هاشمی^{۱*}، مسطوره دوستدار^۲

چکیده

بررسی میزان صید بی رویه کفزیان در آب‌های جنوب کشور (سال‌های ۱۳۷۶ الی ۱۳۹۶) براساس مدل صید- محصول حداکثر پایدار (CMSY) و نرم افزار R و رویکرد وضعیت بیزی و شبیه سازی روش مونت کارلو انجام گرفت. میانگین صید کفزیان در آب‌های جنوب کشور برای این دوره مورد مطالعه ۱۴۱۲۲۱ تن و فاصله اطمینان ۱۴۱۳۱۵-۱۴۱۱۲۶ تن بوده و میانگین صید بصورت معنی‌داری طی دو دهه گذشته افزایش یافته ($R = 0.90, P < 0.05$) نشان می دهد. میزان صید بی رویه وزنی کل در آب‌های جنوب کشور بیش از ۳۱ درصد است. در مورد میزان صید بی رویه وزنی کل کفزیان آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان این ارقام به ترتیب بیش از ۴۵ درصد و بیش از ۷۵ درصد رسیده است. براساس شرایط موجود، بنظر می‌رسد میزان صید کفزیان در وضعیت مناسبی قرار نداشته و بایستی در جهت کاهش صید این آبزیان اقداماتی صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: خلیج فارس و دریای عمان، کفزیان، مدل صید- محصول حداکثر پایدار (CMSY)، میزان صید بی رویه.

۱- استادیار مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

۲- استادیار موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول: Seyedahmad91@gmail.com)

مقدمه

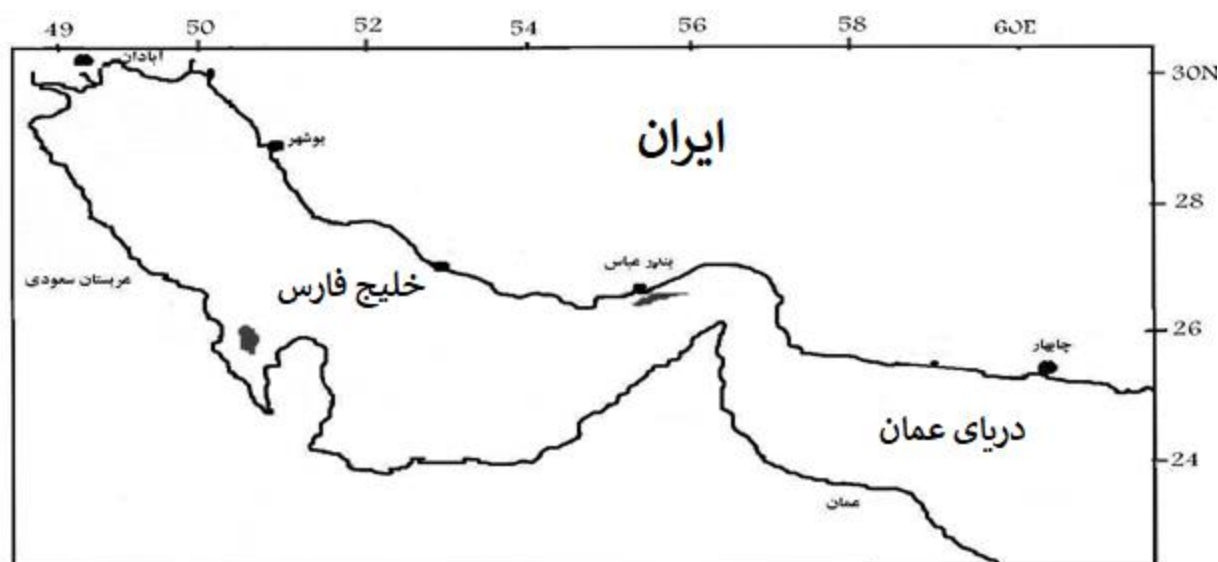
حفظ ذخایر یک اصل مورد تاکید جهانی و یک معیار کلیدی در پایداری بهره برداری از تمام منابع آبی است. تلاش تمام مدیران شیلاتی بروی دسترسی به تامین غذای کافی و مطمئن از منابع طبیعی و تامین نیاز جوامع بشری، با در نظر گرفتن میزان بهره برداری مجاز و صحیح از آنها متمرکز شده است (Ganga & Pillia, 2000). یکی از موارد با اهمیت در زمینه صید، میزان صید بی رویه و درصد این میزان در گونه ها و مکان های مختلف بوده و بطور کلی آمار جهانی نشان دهنده آن است که بیشترین درصد میزان صید بی رویه در ناحیه ۴۷ فائو (جنوب شرق اقیانوس اطلس) و گروه ماهیان کفزی قرار دارد، هرچند این درصد در مکان ها و گونه های مختلف، متفاوت است. هدف توسعه پایدار سازمان ملل در اقیانوس ها این است که تا سال ۲۰۳۰ میلادی به نقطه بدون صید بی رویه (Zero- overfishing) رسیده و برای این منظور بایستی تلاش صیادی ناوگان صیادی در محدوده بهره برداری پایدار زیستی از ذخایر آبی باشد (FAO, 2018).

میزان صید جهانی در سال ۲۰۱۶ حدود ۹۱ میلیون تن بوده که ۸۷ درصد آن در آب های دریایی (۷۹/۳ میلیون تن) و ۱۳ درصد در آب های داخلی (۱۱/۶ میلیون تن) قرار داشته است. همچنین میزان صید جهانی در آب های دریایی نسبت به سال ۲۰۱۵ (۸۱/۲ میلیون تن) حدود ۲ میلیون تن کاهش نشان می دهد (FAO, 2018). اقیانوس هند بیش از ۱۱ میلیون تن صید داشته و قسمت های غربی این اقیانوس حدود ۵ میلیون تن از این صید را دارد (FAO, 2018). میزان کل تولید آبیان شیلاتی در کشور ایران از طریق صید و بهره برداری از ذخایر، میزان صید در آب های جنوبی کشور از حدود ۲۳۹ هزار تن در سال ۱۳۷۶، به میزان نزدیک به ۶۹۱ هزار تن در سال ۱۳۹۶ رسیده است و استان سیستان و بلوچستان دارای بیشترین میزان صید و بیشترین افزایش سالانه صید را داشته است و میزان صید آن از حدود ۴۲ هزار تن در سال ۱۳۷۶، به میزان نزدیک به ۳۰۰ هزار تن در سال ۱۳۹۶ رسیده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۷).

اولین برآورد کفزیان خلیج فارس و دریای عمان در سال های ۱۹۷۶-۱۹۷۹ تحت عنوان UNDP/FAO به مورد اجرا درآمد (Sivasubramaniam, 1981). بعد از آن برآورد ذخایر کفزیان در آب های ایرانی دریای عمان (استان سیستان و بلوچستان) در سال ۱۳۷۷ (محمدخانی و همکاران، ۱۳۸۰) و سپس پایش ذخایر کفزیان به روش مساحت جاروب شده در سال ۱۳۸۰ (دریانبرد و همکاران، ۱۳۸۳) و در آب های استان هرمزگان نیز در منطقه سیریک تا جاسک مورد بررسی قرار گرفت (دهقانی و همکاران، ۱۳۸۳). طی سال های ۱۳۸۳ تا ۱۳۹۴ مقدار زی توده و میانگین صید بر واحد سطح (CPUA) ذخایر کفزیان با استفاده از روش مساحت جاروب شده در خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی قرار گرفت (ولی نسب و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین عباسپورنادری (۱۳۹۶) به بررسی روند تغییرات ده ساله آبیان کفزی دریای عمان و پیش بینی الگوی بهره برداری از آنها پرداخته است. هدف این تحقیق برآورد میزان صید بی رویه و روند تغییرات آنها طی دو دهه گذشته در محدوده مورد مطالعه است.

مواد و روش‌ها

داده‌های لندینگ (صید تخلیه به ساحل) ماهیان کفزی در چهار استان جنوبی، چهار منطقه عمده تخلیه صید آب‌های ساحلی ایران (خلیج فارس و دریای عمان)، مربوط به بیش از ۲۰ سال گذشته (براساس تن) از سازمان شیلات ایران (سال ۱۳۷۶ الی ۱۳۹۶) جمع‌آوری شد (شکل ۱). میزان صید بی‌رویه در آب‌های جنوب کشور براساس روش مدل صید-محصول حداکثر پایدار (CMSY) و نرم افزار R و رویکرد وضعیت بیزی و شبیه‌سازی روش مونت کارلو (Monte Carlo) با ۳۰۰۰۰ بار تکرار مدل‌سازی برحسب توزیع احتمالات صورت پذیرفته و میزان پارامترهای محاسباتی، حدود اطمینان آنها را با درصدهای مختلف اندازه‌گیری می‌نماید.



شکل ۱: موقعیت مناطق جمع‌آوری اطلاعات کفزیان در آب‌های جنوب کشور (خلیج فارس و دریای عمان).

مدل صید-محصول حداکثر پایدار (Catch-MSY) (CMSY)

رویکرد مدل صید-محصول حداکثر پایدار براساس وضعیت بیزی (روش حل مساله با کمک اطلاعات اولیه) با وارد نمودن مقادیر اولیه پارامتر یا پارامترهای ورودی (اطلاعات اولیه محقق) و شبیه‌سازی روش مونت کارلو (روش حل مساله با کمک نمونه‌گیری تصادفی تکرارشونده) با ۱۰۰۰۰ بار تکرار مدل‌سازی برحسب توزیع احتمالات صورت پذیرفته و مقادیر پارامترهای محاسباتی (خروجی) و حدود اطمینان آنها را با درصد‌های مختلف اندازه‌گیری می‌نماید. برای محاسبه پارامترها و بررسی وضعیت ذخیره داده‌های حداقلی گونه‌های مختلف، متفاوت بوده و حداقل ۵ سال داده صید (گونه با انعطاف^۱ بالا و

¹ Resilience

متوسط یعنی نرخ رشد ذاتی بالای ۰/۵) یا حداقل ۱۰ سال داده صید (گونه با انعطاف کم و خیلی کم یعنی نرخ رشد ذاتی کمتر از ۰/۵) نیاز است (Froese *et al.*, 2016).

مدل تولید مازاد گراهام-شیفر^۱ یک روش ساده است که کاربرد وسیعی جهت برآورد بیوماس داشته و در این رویکرد استفاده شده و فرمول آن بصورت زیر است:

$$B_{y+1} = B_y + rB_y (1 - B_y/k) e^{s1} - C_t e^{s2}$$

که در این رابطه B_y = بیوماس در سری زمانی و سال y ، r = نرخ رشد آنی (لحظه ای)^۲، K = ظرفیت حمل^۳ که برابر با بیوماس اولیه یا بیوماس دست نخورده و در ابتدای مدل سازی بین ۱ تا ۲ برابر صید حداکثر بعنوان حداقل ظرفیت حمل و ۴ تا ۱۲ برابر صید حداکثر بعنوان حداکثر ظرفیت حمل بعنوان ورودی مدل بوده، C_y = صید در سری زمانی و سال y است (Froese *et al.*, 2016). در این روش مقادیر نرخ رشد آنی و ظرفیت حمل با کمک فرمول تهی سازی (d)^۴ و اشباعیت ذخیره (S)^۵ محاسبه می شود:

$$d = 1 - S = (1 - B_y/K_y)$$

میزان مرگ و میر صیادی حداکثر محصول پایدار^۶ با کمک فرمول $F_{msy} = r/2$ و حداکثر محصول پایدار از فرمول $MSY = rk/4$ و بیوماس حداکثر محصول پایدار^۷ $B_{msy} = K/2$ محاسبه می شود. وضعیت صیادی معمولاً براساس میزان شاخص بیوماس موجود به بیوماس حداکثر محصول پایدار (B/B_{msy}) ارزیابی شده (Zhou *et al.*, 2017) و مقدار B/B_{msy} کمتر و مساوی عدد ۱ به معنی وضعیت صید بیش از بهینه (overexploited) یا صید بی رویه و مقادیر کمتر از ۰/۲ به معنی وضعیت کاهش شدید در ذخیره (collapsed) است (Anderson *et al.*, 2012; Branch *et al.*, 2011). تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزارهای R studio (۱.۱.۴۴۶) و SPSS (۲۱) و سطح معنی داری ۰/۰۵ و حدود اطمینان ۹۵ درصد بدست آمد.

¹ Surplus production model (SGSPM) Graham-Schaefer

² Intrinsic growth rate (IGR)

³ Carrying capacity (CC)

⁴ Depletion

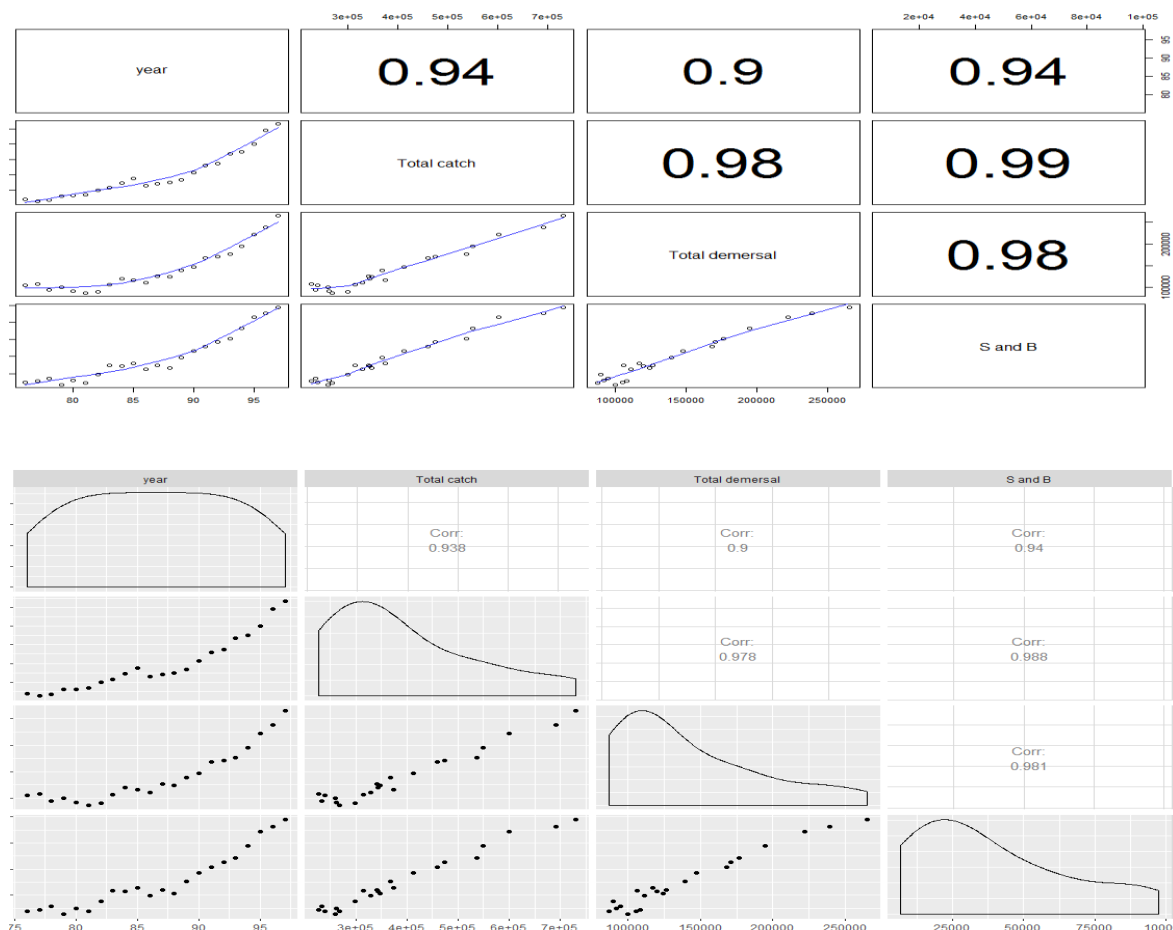
⁵ Saturation

⁶ Fishing mortality of maximum sustainable yield (Fmsy)

⁷ Biomass of maximum sustainable yield (Bmsy)

نتایج

میانگین صید کفزیان در آب های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان (Y_i) در این دوره مورد مطالعه با ۹۵ درصد فاصله اطمینان، به ترتیب ۱۴۱۲۲۱ تن ۱۴۱۳۱۵-۱۴۱۱۲۶ تن و ۳۸۷۷۶ تن و ۳۸۸۴۵-۳۸۷۰۶ تن بود و میانگین صید بصورت معنی داری طی دو دهه گذشته افزایش یافته است ($R = 0.90, P < 0.05$) و ($R = 0.94, P < 0.05$) (شکل ۲).



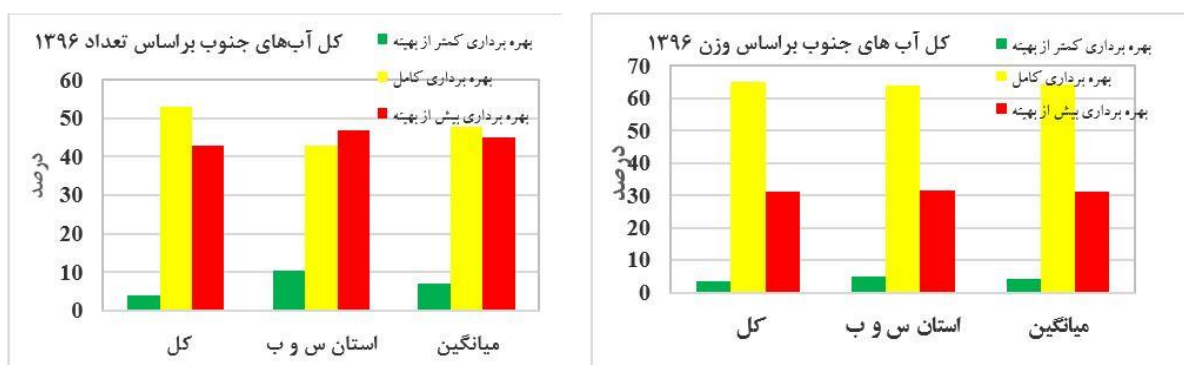
شکل ۲: روند صید کل، ماهیان کفزی در استان سیستان و بلوچستان آب های جنوب کشور طی سالیان گذشته (۱۳۷۶-۱۳۹۶).

میزان صید کفزیان در آب های جنوبی کشور از حدود ۱۰۵ هزار تن (۴۴ درصد از کل صید) در سال ۱۳۷۶، به میزان نزدیک به ۲۳۹ هزار تن (۳۵ درصد از کل صید) در سال ۱۳۹۶ رسیده است و استان سیستان و بلوچستان دارای روند افزایشی صید کفزیان در آب های جنوبی کشور بوده (شکل ۳) و میزان صید کفزیان آن حدود ۱۰ هزار تن (۲۲ درصد از کل صید) در سال ۱۳۷۶، به میزان نزدیک به ۹۰ هزار تن (۳۰ درصد از کل صید) در سال ۱۳۹۶ رسیده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۷).



شکل ۳: روند صید کفزیان و درصد صید کفزیان به ازای کل صید در آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان طی سالیان گذشته (۱۳۷۶-۱۳۹۶).

وضعیت صیادی براساس میزان شاخص بیوماس موجود به بیوماس حداکثر محصول پایدار (B/B_{MSY}) ارزیابی شده و بطور کلی میزان صید طی دوره ۱۳۷۶ تا سال ۱۳۸۷ و براساس روش مدل صید- محصول حداکثر پایدار نشان دهنده آن است که میزان صید بی رویه وزنی کل آبزیان در آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان به ترتیب کمتر از ۶ درصد و کمتر از ۴ درصد و در مورد میزان صید بی رویه وزنی کل کفزیان آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان این ارقام به ترتیب حدود ۱۶ درصد و حدود ۱۳ درصد رسیده است.



شکل ۴: میزان صید بی رویه (برحسب تعداد و وزن) در آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان در سال ۱۳۹۶.

وضعیت صید طی دوره ۱۳۷۶ تا سال ۱۳۹۶ و براساس روش مدل صید- محصول حداکثر پایدار نشان دهنده آن است که میزان صید بی رویه وزنی کل آبزیان در آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان به ترتیب بیش از ۳۱ درصد

و حدود ۳۱ درصد و در مورد میزان صید بی رویه وزنی کل کفزیان آب های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان این ارقام به ترتیب بیش از ۴۵ درصد و بیش از ۷۵ درصد رسیده است (شکل ۴).

گونه های آبی تحت فشار بهره برداری با مقدار B/B_{MSY} کمتر و مساوی عدد ۱ به معنی وضعیت صید بیش از بهینه یا صید بی رویه در سال ۱۳۹۶ از جمله اره، پرستو، حلوا سفید، خارو، زمین کن، سرخو، سفره، سوس، کفشک، کوسه، گربه، مرکب و میش برای آب های جنوب کشور بوده و برای استان سیستان و بلوچستان می توان به گونه های اره، پرستو، خارو، راشگو، سرخو، سفره، سوس، شانک، شبه شوریده، طوطی، کفشک اشاره کرد.

بحث و نتیجه گیری

صید بی رویه یا بهره برداری شدید از اجتماع ماهیان اقتصادی می تواند برکل زنجیره غذایی تاثیر بگذارد (Travers *et al.*, 2010). صیادی دارای اثرات مستقیم و غیر مستقیم بر ذخایر آبی و کل اکوسیستم بوده و از جمله اثرات مستقیم بروی ساختار اجتماع، رشد، تولید مثل و توزیع گونه های هدف و نیز اثرات غیر مستقیمی بروی جمعیت های گونه های بی مهره و ماهیان غیر هدف و زیستگاه آنها دارد (Arias-Gonzalez *et al.*, 2004). همچنین صیادی ساختار و کارکرد شبکه های غذایی اکوسیستم های دریایی را دچار تغییر می کند و فشار ماهیگیری بروی گونه های ماهی هدف از طریق رقابت، شکار، و کاهش دسترسی به مواد غذایی برای شکارچیان بر کل اکوسیستم تأثیر می گذارد (Mashjoor & Kamrani, 2015, Razzaghi *et al.*, 2017).

نسبت ذخایر با سطح ناپایدار زیستی (ذخایر بیش از حد بهره برداری شده) به سطح پایدار زیستی (ذخایر کمتر بهره برداری شده و کامل بهره برداری شده)، یکی از مهمترین مباحث در بحث بهره برداری پایدار و توسعه پایدار از دریا بوده و در آب های جنوب کشور و بخصوص در مورد کفزیان، بنظر می رسد این نسبت (نسبت ذخایر ناپایدار زیستی) تغییر محسوسی داشته و از حدود ۱۶ درصد در سال ۱۳۸۷ به بیش از ۴۵ درصد در سال ۱۳۹۷ رسیده است. در مورد کفزیان آب های استان س و ب این افزایش، شدیدتر است. ذخایر با سطح ناپایدار زیستی در سال ۱۹۷۴ حدود ۱۰ درصد بود و در سال ۲۰۱۶ به حدود ۳۳ درصد رسیده است. ذخایر با سطح پایدار زیستی در سال ۱۹۷۴، ۹۰ درصد بوده و در سال ۲۰۱۶ به حدود ۶۷ درصد رسیده است. بیشترین نسبت ذخایر با ناپایداری زیستی در دریای مدیترانه، دریای سیاه، جنوب شرقی اقیانوس آرام و جنوب غربی اقیانوس اطلس دیده می شود (FAO, 2018).

وضعیت صیادی معمولاً براساس میزان شاخص بیوماس موجود به بیوماس حداکثر محصول پایدار (B/B_{MSY}) ارزیابی می‌شود و به سه بخش کلی تقسیم می‌گردد: مقدار B/B_{MSY} بزرگتر و مساوی عدد ۱/۵ به معنی وضعیت صید کمتر از بهینه^۱، بین ۱/۵ تا ۰/۵ به معنی وضعیت بهره برداری کامل^۲ و بین ۰/۵ تا ۰/۲ به معنی وضعیت صید بیش از بهینه^۳ و مقادیر کمتر از ۰/۲ به معنی وضعیت کاهش شدید در ذخیره^۴ است (Anderson et al., 2012; Branch et al., 2011). تقسیم بندی های مختلفی برای بررسی میزان صید بی رویه در جهان وجود دارد، براساس تقسیم بندی Pauly و Lam (۲۰۱۶)، پنج بخش برای این امر با رنگ بندی مختلف (آبی= حداقل، سبز=کم، زرد= متوسط، نارنجی=زیاد، قرمز= بیشترین) در نظر گرفته شده است (جدول ۱).

جدول ۱: طبقه بندی‌های مختلف درصد صید بی رویه براساس تعداد و وزن (Pauly & Lam, 2016)

شاخص	حداقل	کم	متوسط	زیاد	بیشترین
درصد صید بی رویه (براساس تعداد)	۰-۳۴	۳۴-۴۶	۴۶-۵۱	۵۱-۵۹	۵۹-۱۰۰
درصد صید بی رویه (براساس وزن)	۰-۱۰	۱۰-۱۸	۱۸-۳۱	۳۱-۴۷	۴۷-۱۰۰

با در نظر گرفتن میزان صید بی رویه (وزنی) کل صید در جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان وضعیت متوسط به رو به زیاد (رنگ نارنجی به سمت قرمز) میزان صید بی رویه وجود داشته و برای میزان صید بی رویه (وزنی) صید کفزیان در جنوب کشور و استان س و ب کفزیان به ترتیب حالت زیاد (رنگ نارنجی) و بیشترین (رنگ قرمز) دیده می‌شود. افزایش میزان صید بی رویه در سالیان گذشته و بویژه در مورد کفزیان نگران کننده است. ولی نسب و همکاران (۱۳۸۹) ذخایر کفزیان تجاری آبهای خلیج فارس و دریای عمان به روش مساحت جاروب شده برای استانهای خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان به ترتیب ۹۸۹۰ تن، ۲۹۱۲۲ تن، ۲۲۰۸۴ تن و ۱۲۵۷۳ تن (مجموع بیش از ۷۳ هزار تن) برآورد نمود و کفزیان تجاری خلیج فارس را بیش از دو برابر کفزیان تجاری دریای عمان گزارش نمودند.

نرخ رشد آنی (لحظه ای)، یکی از پارامترهای مهم در امر مدل سازی و مدیریت شیلاتی بوده و عامل تعیین کننده در رشد جمعیت، قابلیت تحمل فشار صیادی، و بازایی و تجدید نسل جمعیت های تخلیه شده است (Zhou et al., 2016). طبقه بندی گونه ها براساس نرخ رشد آنی بصورت زیر است. مقادیر نرخ رشد ذاتی ۱/۵-۰/۶ نشان دهنده گونه با انعطاف بالا، مقدار ۱-۰/۲ نشان دهنده گونه با انعطاف متوسط، مقدار ۰/۵-۰/۰۵ گونه با انعطاف کم و مقادیر کمتر از ۰/۱-۰/۰۱۵ نشان دهنده گونه با

¹ Under exploited

² Fully exploited

³ Overexploited

⁴ Collapsed

انعطاف کم می باشد (Froese et al., 2016; Martell & Froese., 2013). بین پارامتر r و سایر پارامترهای تاریخچه حیات رابطه معنی داری بویژه مرگ و میر طبیعی (M) وجود داشته و این رابطه در ماهیان استخوانی $r=1.73 M$ و در ماهیان غضروفی $r=0.76 M$ گزارش شده است (Zhou et al., 2016). در مطالعات Froese و Pauly (۲۰۱۵)، میزان پارامتر r تقریباً معادل ۲، مرگ و میر صیادی حداکثر محصول پایدار (F_{MSY})، ۲ مرگ و میر طبیعی (M)، ۳ ضریب رشد منحنی وان برتالانفی (K)، ۳ تقسیم بر تجدید نسل^۱ (t_{gen}) و ۹ تقسیم بر حداکثر طول عمر^۲ (t_{max}) حاصل شده است ($r \approx 2F_{MSY} \approx 2M \approx 3K \approx 3/t_{gen} \approx 9/t_{max}$).

نتیجه‌گیری نهایی

میانگین صید کفزیان در آب‌های جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان برای دوره مورد مطالعه (۱۳۷۶-۱۳۹۶) بصورت معنی داری طی دو دهه گذشته افزایش یافته است. میزان صید بی‌رویه (وزنی) کل صید در جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان طی دو دهه گذشته روند افزایشی داشته و وضعیت متوسط به رو به زیاد (رنگ نارنجی به سمت قرمز) را نشان داده و برای میزان صید بی‌رویه (وزنی) صید کفزیان در جنوب کشور و استان سیستان و بلوچستان کفزیان به ترتیب حالت زیاد (رنگ نارنجی) و بیشترین (رنگ قرمز) دیده می‌شود. با توجه به شرایط و وضعیت اشاره شده، بنظر می‌رسد میزان صید کفزیان در وضعیت مناسبی قرار نداشته و بایستی در جهت کاهش صید این آبزیان اقداماتی صورت گیرد و افزایش میزان صید بی‌رویه در سالیان گذشته و بویژه در مورد کفزیان نگران‌کننده است.

منابع

دریانبرد، غ.، حسینی، ع. و ولی نسب، ت.، ۱۳۸۳. تعیین میزان توده زنده کفزیان به روش مساحت جاروب شده در دریای عمان (سواحل سیستان و بلوچستان). مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۱ صفحه.

محمدخانی، ح.، تقوی مطلق، ا.، عطاران، گ.، خدای، ش. و دریانبرد، غ.، ۱۳۸۰. ارزیابی ذخایر کفزیان تور ترال کف به روش مساحت جاروب شده در آب‌های دریای عمان (۱۰۰-۱۰ متر) آب‌های استان سیستان و بلوچستان. مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور. ۲۰۸ صفحه.

دهقانی، ر.، ولی نسب، ت.، کمالی، ع.، درویشی، م.، بهزادی، س.، اسدی، ه. و اکبری، ح.، ۱۳۸۳. پایش ذخایر کفزیان آب‌های استان هرمزگان به روش مساحت جاروب شده؛ پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان. ۸۹ صفحه.

¹ Generation time (t_{gen})

² Maximum age (t_{max})

۲۰۲ / سید احمد رضا هاشمی و مسطوره دوستدار: بررسی میزان صید کفزیان در آب‌های جنوب کشور (خلیج فارس و دریای عمان)

سازمان شیلات ایران ۱۳۹۷. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۶-۱۳۷۶. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه. ۶۵ صفحه.

عباسپور نادری، ر.، ۱۳۹۶. بررسی روند تغییرات ده ساله آبزیان کفزی دریای عمان و پیش بینی الگوی بهره برداری (سواحل استان سیستان و بلوچستان). پایان نامه دکترا دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۴۱ صفحه.

ولی نسب، ت.، خورشیدیان، ک.، پارسامنش، ا.، کامرانی، ا.، و دهقانی پشتروبی، ر. ۱۳۸۰. برآورد کفزیان خلیج فارس (اعماق ۱۰ تا ۵۰ متر) با روش مساحت جاروب شده (۱۳۷۵-۱۳۷۳)، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۲۱ ص.

ولی نسب، ت.، دریانبرد، ر.، آذیر، م.ت.، مومنی، م.، مبرز، ع.، و صفی خانی، ح. ۱۳۸۹. تعیین توده زنده کفزیان به روش مساحت جاروب شده در آب های خلیج فارس و دریای عمان. گزارش نهایی، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۳۸۴ ص.

ولی نسب، ت.، آذیر، م. ت.، صدقی، ن.، و کمالی، ع. ۱۳۸۹. پایش ذخایر کفزیان تجاری آبهای خلیج فارس و دریای عمان به روش مساحت جاروب شده، فصلنامه محیط زیست جانوری، ۲(۳): ۴۵-۵۶ ص.

ولی نسب، ت.، ۱۳۹۰. تعیین میزان توده زنده کفزیان خلیج فارس و دریای عمان به روش مساحت جاروب شده (۱۳۸۷-۱۳۸۳). مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۵۶ صفحه.

ولی نسب، ت.، ۱۳۹۴. تعیین میزان توده زنده کفزیان خلیج فارس و دریای عمان به روش مساحت جاروب شده (۱۳۹۰-۱۳۸۸). مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۳۵۶ صفحه.

Arias-Gonzales EJ, Nunes-Lara E, Gonzales-alas C, Galzin, R. 2004. Trophic models for investigation of fishing effect on coral reef ecosystems. Ecol Model 172:197-212.

Anderson, S. C., Branch, T. A., Ricard, D., and Lotze, H. K. 2012. Assessing global marine fishery status with a revised dynamic catch-based method and stock-assessment reference points. Journal of Marine Science, doi:10.1093/icesjms/fss105.

Branch, T. A., Jensen, O. P., Ricard, D., Ye, Y., and Hilborn, R. 2011. Contrasting global trends in marine fishery status obtained from catches and from stock assessments. Conservation Biology, 25: 777-786.

Froese, R., Demirel, N., Sampang, A. 2015. An overall indicator for the good environmental status of marine waters based on commercially exploited species. Marine Policy 51, 230-237.

- Froese, R., Demirel, N., Gianpaolo, C., Kleisner, K.M., Winker, H. 2016. Estimating fisheries reference points from catch and resilience. *Fish and Fisheries* 18(3):506-526, doi:10.1111/faf.12190.
- Froese, R. Pauly, D. eds. 2015. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version. (10/2015), accessed at www.fishbase.org in November/December 2015.
- Ganga, U. and Pillai, N. 2000. Field identification of Scombrotoxicosis from Indian sea. In: Pillai, N.G.K., Menon, N.G., Pillai, P.P and Ganga, U. (Eds.) *Management Scombrotoxicosis Fisheries*. Central Marine Fishery Research Institute, Kochi. 1-13 p.
- Mashjoor, S. and Kamrani, E. 2015. Evaluation of the “fishing down marine food web” process in the north-west of Persian Gulf (Khuzestan Province) during the period of 2002–2011. *Acta Oceanologica Sinica*, doi: 10.1007/s13131-015-0726-4.
- Martell, S.; Froese, R. 2013. A simple method for estimating MSY from catch and resilience. *Fish and Fisheries* 14 (4): 504–514.
- Pauly, D., and Lam, V. W. Y. 2016. Chapter 6.1: The Status of fisheries in large marine ecosystems, In IOC-UNESCO and UNEP (2016). *Large marine ecosystem: Status and trends*. United Nations Environmental Programme, Nairobi, PP 113-137 .
- Razzaghi, M. Mashjoor, S. and kamrani, E. 2017. Mean trophic level of coastal fisheries landings in the Persian Gulf (Hormuzgan Province), 2002–2011. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-017-5311-6> .
- Sivasubramaniam, K. 1981. Demersal resources of the Gulf and Gulf of Oman. Regional Fishery Survey and Development Project. UNDP/FAO. Rome, 122p.
- Travers, M, Watermeyer, K. Shanon, L.J. and Shin, Y.J. 2010. Changes in food web structure under scenarios of overfishing in the southern Benguela: comparison of the Ecosim and OSMOSE modelling approaches. *J Marine Syst* 79:101–111.
- Zhou, S., Chen, Z., Dichmont, C. M., Ellis, A. N., Haddon, M., Punt, A. E., Smith, A. D. M., Smith, D.C., Ye, Y. 2016. Catch-based methods for data-poor fisheries. Report to FAO. CSIRO, Brisbane, Australia. 74 P.
- Zhou, S., Punt, A. E., Smith, A. D. M., Ye, Y., Haddon, M., Dichmont, C. M., Smith, D. C. 2017. An optimized catch-only assessment method for data poor fisheries. – *ICES Journal of Marine Science*, doi:10.1093/icesjms/fsx226.

Investigation of demersal fish catch in Iranian Southern Waters (The Persian Gulf and Oman Sea) with emphasis on the Sistan and Baluchestan province waters

S. A. R. Hashemi^{1*}, M. Doustdar²

Received:2020.9.22

Accepted:2021.5.15

Abstract

Fish species overexploited level in Iran (Southern waters from 1997 to 2017) was assessed based on the catch maximum sustainable yield (CMSY), R-software, Bayesian approach, and Monte-Carlo simulation. The average of demersal fish catch in Iranian southern waters during this period was 141221 tons (C.I =141131 to 141612 tons) and the mean catch was significantly increased over the past two decades ($R = 0.90$, $P < 0.05$). The total overfished (weight) level of southern water was more than 31 percent. Demersal fish overfished in Iranian southern water and the northern waters of the Oman Sea (total weight level) were exceeded 45 percent and 75 percent, respectively. Due to the existing situation, it seems that the amount of overexploited (overfished) is not in favorable condition and a further decrease in exploitation ratio and fishing effort are proposed.

Keywords: *Catch-maximum sustainable yield (CMSY), Demersal, Overfished, Persian Gulf and Oman Sea*

1- Assistant Prof, Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran

2- Assistant Prof, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

*(Corresponding author: Seyedahmad91@gmail.com)