

۱. افزایش شاخص‌های رشد، رنگیزه و برخی متابولیت‌های اولیه در گیاهچه‌های شاهی (*Lepidium sativum* L.) تحت شرایط تنش شوری با کاربرد بتاکاروتن و گالیک اسید
مرضیه بابایی، لیلا شبانی*، شهلا هاشمی شهرکی
۲. بررسی تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تکوین اندام‌های رویشی و زایشی گیاه *Arabidopsis thaliana* L.
الهام بصیری، سایه جعفری مرندی*، صدیقه اربابیان، احمد مجد، محمد علی ملبوبی
- ۳- کاربرد هیومیک اسید روی بهبود رشد رویشی و زایشی پسته رقم اکبری
زهرا پاک‌کیش، هادی اصغری و سهیلا محمدرضاخانی
- 4- بررسی فاکتورهای مؤثر بر بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات (PHBV) به روش پلاکت-برمن و بهینه‌سازی بهره‌وری تولید با تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا
ندا سینائی، داود زارع*، مهرداد آذین
- ۵- بررسی تأثیر آللوپاتی عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) بر مؤلفه‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی چچم (*Lolium rigidum* Gaudin)
عبدا... عطایی، ابراهیم غلامعلی پور علمداری*، زینب اورسجی، علی راحمی کاریزکی
- ۶- برآورد وراثت‌پذیری محتوای روغن و پروتئین دانه در ارقام تجاری کنگد در سطوح مختلف آبیاری و قارچ‌های میکوریزا
اسماعیل قلی‌نژاد، رضا درویش زاده، عباس ابهری
- ۷- مطالعه عوامل مؤثر بر حذف زیستی اورانیوم توسط ریزجلبک زنده *Chlorella vulgaris*
پریسا محمدی، نورا جوانمردی، پریسا تاجرمحمدقزوینی*
- ۸- اثر باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در اختلاط با نانوذرات سیلیکا و نیمازین در کنترل لارو سن دوم برگ‌خوار چغندر قند (*Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) در شرایط آزمایشگاهی
مجید علیمحمدیان، شهرام آرمیده*، شهرام میرفخرایی، مریم فروزان
- ۹- اثر پیش تیمار بذر با نانولوله‌های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی (*Pistacia Desf & P. khinjuk* Stocks) *atlantica*
فهیمه محمدپور، فرهاد قاسمی آقباش، مهرداد زرافشار* و احسان قنبری
- ۱۰- جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده ال-آسپاراژیناز از گیاه مریم گلی باغی (*Salvia nemorosa* L.)
سمانه نریمانی، مصطفی عبادی، محمد پاژنگ، سعید ملائی

بسم الله الرحمن الرحيم
فصلنامه علمی مجله زیست شناسی کاربردی

زمستان ۱۴۰۰

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)
سردبیر: دکتر محمد رضا صعودی ، استاد دانشگاه الزهرا (س)
مدیر مسئول: دکتر مهوش سیفعلی ، استادیار دانشگاه الزهرا (س)
دبیر تخصصی: دکتر پریناز قدم ، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دبیر تخصصی: دکتر احیا عبدی عالی ، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه

دکتر مهناز اقدسی ، دانشیار دانشگاه گرگان
دکتر حمید اجتهادی ، استاد دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر نرگس حسینمردی ، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دکتر فرشاد درویشی ، استاد دانشگاه الزهرا (س)
دکتر مرجان سیدی ، دانشیار دانشگاه تهران
دکتر مسعود رنجبر ، استاد دانشگاه بوعلی سینا
دکتر عذرا صبورا ، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر احیا عبدی عالی ، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر پریناز قدم ، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر زرین مینوچهر ، دانشیار دانشگاه تهران
دکتر تورج ولی نسب پوری ، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

اعضای هیأت تحریریه بین المللی

دکتر حسین رجایی ، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کونینگ آلمان
دکتر شهرام شهابی ، استاد مدیر پژوهش کمپانی داروسازی هایلند و عضو هیات علمی وابسته کالج پزشکی نچروپاتی ساوت وست
مدیر اجرایی: شهربانو برجیان
ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)
ویراستار: خانم معصومه اصلان زاده
چاپ و صحافی: انتشارات دانشگاه الزهرا (س)
ترتیب و انتشار: فصلنامه

این فصلنامه علمی - پژوهشی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴ / ۸۹/۳/۱۱ - در تاریخ ۸۹/۹/۸ منتشر می گردد.

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست شناسی ایران منتشر می شود .

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می شود : www.isc.gov.ir

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

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

مورد	وضعیت اعمال مورد	محققان با رعایت سلامت و اصالت کامل نویسندگی در چهارچوب های اخلاق حرفه ای، مقالات علمی-پژوهشی خود را براساس نکات زیر تدوین و ارائه نمایند.
تعهدات		- فقط در صورت هیأت علمی بودن (مربی پژوهشی، استادیار، دانشیار و استاد) اقدام به ارسال مقاله فرمایید. - نشریه زیست شناسی کاربردی در برابر مقاله های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
		الزامیست نویسنده مسئول مقاله یکی از اعضاء محترم هیات علمی دانشگاه ها یا موسسات تحقیقاتی باشد. از این رو ایمیل نویسنده مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
		در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
		مقاله قبلا به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور همزمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
		تعهد نامه مطابق فرمت مجله ارسال شود.
		چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی است این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد(ان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
		مقاله ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرند. هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد که همراه عنوان و واژه های کلیدی انگلیسی در انتهای مقاله آورده شود.
نگارش		مقاله کامل دارای عنوان فارسی، نام و آدرس نویسندگان، چکیده فارسی، واژه های کلیدی، مقدمه، مواد و روش ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع، عنوان، آدرس، چکیده و واژه های کلیدی انگلیسی می باشد.
		شکل ها، نمودارها و جدول ها شماره گذاری شده و به همراه زیرنویس اشکال و بالانویس جداول در متن مقاله آورده شوند
		تایپ مقاله با نرم افزار Microsoft Office Word 2007 باحاشیه ۲/۵ سانتی متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل ها و بالانویس و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم در پایین و وسط صفحه با فونت B Nazanin شماره گذاری شوند. در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
		از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز درون پرانتز و در مقاله آورده شود.
		همواره فونت فارسی B Nazanin و فونت انگلیسی Times New Roman با دو سایز کوچکتر باشد و جزییات مطابق زیر رعایت شود:
		عنوان فارسی مقاله: وسط چین، Bold و ۱۴ و انگلیسی وسط چین، Bold و ۱۲ باشد.
		نام نگارندگان: وسط چین، Bold و ۱۱ باشد و با کاما از هم جدا شوند. در مورد انگلیسی هم همینطور ولی با فونت ۹. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده مسئول سمت راست آن عدد باشد. (Akbari*)
		نشانی نگارندگان: وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد.
		چکیده باید شامل هدف، مقدمه، پارامترها و نتیجه گیری باشد و از این به بعد نویسندگان ملزم به رعایت چکیده های بخش بندی شده می باشند
		چکیده فارسی: فونت ۱۲ نازک و ایتالیک، در یک پاراگراف و حد اکثر ۱۵۰ کلمه باشد.
		واژگان کلیدی فارسی Bold: و ۱۲ و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.
		متن فارسی: ۱۲ و انگلیسی ۱۰ باشد.
		عناوین بخش های مختلف: عناوین اصلی، درجه دو و سه Bold باشند. عنوان اصلی فارسی راست چین ۱۴ و انگلیسی چپ چین و ۱۲ باشند. پس از عناوین اصلی و درجه دوم دو نقطه استفاده نشود و ادامه متن از سطر جدید نوشته شود ولی عناوین درجه سه با دو نقطه از مطلب جدا شود.
		چکیده مبسوط انگلیسی: (مشاهده شیوه تنظیم چکیده گسترده انگلیسی)
		چکیده انگلیسی: فونت ۱۰ نازک و در یک پاراگراف باشد.

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

		• واژگان کلیدی انگلیسی: فونت ۱۰ Bold باشند. • • شماره صفحه: پایین وسط با فونت ۱۲ B Nazanin
		• ابتدای هر پاراگراف ۱/۲۷ سانتی متر تورفتگی داشته باشد.
		• برای نوشتن اسامی علمی تحت جنس (سرده) سیستم دونامی رعایت شود.
		• در مقاله، علائم نگارشی مثل نقطه و غیره به کلمه قبلی چسبیده و از بعدی یک فاصله داشته باشد. از علامت % استفاده نشود بلکه کلمه درصد نوشته شود(به استثنای جداول و اشکال).
		• برای بیان مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
جدول و شکل		• جدول با سه خط افقی رسم شود(دو خط نشان دهنده سر تیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).
		• فونت اعداد و متن داخل جداول و اشکال ۱۰ نازک و وسط چین باشد.
		• اعداد حداکثر تا دو رقم اعشار نوشته شوند.
		• عنوان جداول(در بالای جدول) و اشکال(در پایین شکل) وسط چین با فونت ۱۱ Bold
مرجع نویسی در متن		• علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با فونت ۸ نازک نوشته شوند.
		• منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). منابع با دو نگارنده: نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, ۲۰۰۱). منابع با بیش از دو نگارنده: تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه <i>et al</i> (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (<i>et al</i> Fernandes, ۲۰۰۱). در متن مقاله می توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953))
منابع		• بدون شماره بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و نیم سانتی متر تورفتگی داشته باشند. عنوان مجلات کامل نوشته شوند. برای استناد به مقاله هایی که هنوز چاپ نشده اند به جای ذکر سال از عبارت (in press) استفاده شود. • تمامی منابع به زبان انگلیسی باشد. • نشریات: الف) با یک نویسنده: Wilson, R.G.J.(1981). Weed control in established dryland Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>). <i>Weed science</i>, 29: 615-618. ب) با دو نویسنده: Pline, W.A. and Wilcut, J.W. (2007). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.). <i>Journal of Agriculture Food and Chemistry</i>, 50: 506-512. ج) با بیش از دو نویسنده: Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998). Weed control in established Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) with posremergrnce herbicides. <i>Weed Technology</i>, 3: 424-428. د) بهتر است سایت به عنوان مرجع مورد استفاده قرار نگیرد ولی در صورت اضطرار حتما تاریخ مشاهده و دسترسی ذکر شود. • کتاب الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، حرف اول نام(سال انتشار) نام کتاب. تعداد چاپ ها، ناشر، تعداد صفحات. ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، نام کتاب، تعداد چاپ ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک است و سپس شهر محل انتشار. Ahrens, W.H. (1994). <i>Herbicide Handbook</i>. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America 224 Pp. losAngeles. ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود.

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

–مقاله‌ای در یک کتاب: نام خانوادگی، حرف اول نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفات مقاله، عنوان کتاب. ناشر (کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ).

Baver, L.D. and Gardner, W.H. (1972). Flow in stratified soil systems. Pages 343–345 in Baver LD, ed. Soil Physics New York: Academic Press.

– خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور.

Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005). Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – peroxidase activity of field bindweed (Convolvulus arvensis L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia.

–گزارش علمی مستخرج از طرح تحقیقاتی: نام خانوادگی، حرف اول نام، سال انتشار، عنوان پروژه تحقیقاتی. ذکر سالیانه یا نهایی بودن گزارش، نام موسسه تحقیقاتی، تعداد صفحات.

Shimi, P. (2003). Management of Cynanchum acutum in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institute of Plant Protection Pp25.

–منابع بی نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود:
بی نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

Anonymous, (2001). Project Summary Comparative Genomics of Domestication Traits in Lettuce and Sunflower. <http://veghome.ucdavis.edu/faculty/micheltmore/Project summary.htm>. Accessed August 23, 2001.

–استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه htm ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه روز، سال).

Agriculture and Agri-Food Canada. (1999). Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division. http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean_e.html. Accessed: January 29, 2001.

–وقتی مقاله ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.

• نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که براساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به عنوان الگو استفاده نمایند.

• مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله (<http://jab.alzahra.ac.ir>) به دبیرخانه ارسال شود.

۱. افزایش شاخص‌های رشد، رنگیزه و برخی متابولیت‌های اولیه در گیاهچه‌های شاهی (*Lepidium sativum* L.) تحت شرایط تنش شوری با کاربرد بتاکاروتن و گالیک اسید
 مرضیه بابایی، لیلا شبانی*، شهلا هاشمی شهرکی ----- ۶
۲. بررسی تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تکوین اندام‌های رویشی و زایشی گیاه *Arabidopsis thaliana* L.
 الهام بصیری، سایه جعفری مرندی*، صدیقه اربابیان، احمد مجد، محمد علی ملبوبی ----- ۲۴
- ۳- کاربرد هیومیک اسید روی بهبود رشد رویشی و زایشی پسته رقم اکبری
 زهرا پاک‌کیش، هادی اصغری و سهیلا محمدرضاخانی ----- ۵۰
۴. بررسی فاکتورهای موثر بر بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات (PHBV) به روش پلاکت-برمن و بهینه‌سازی بهره‌وری تولید با تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا
 ندا سینائی، داود زارع*، مهرداد آذین ----- ۶۸
۵. بررسی تأثیر آللوپاتی عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) بر مؤلفه‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی چچم
(Lolium rigidum Gaudin)
 عبدا... عطایی، ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری*، زینب اورسجی، علی راحمی کاریزکی ----- ۹۴
- ۶- برآورد وراثت‌پذیری محتوای روغن و پروتئین دانه در ارقام تجاری کنگد در سطوح مختلف آبیاری و قارچ‌های میکوریزا
 اسماعیل قلی‌نژاد، رضا درویش زاده، عباس ابهری ----- ۱۱۳
- ۷- مطالعه عوامل مؤثر بر حذف زیستی اورانیوم توسط ریزجلبک زنده *Chlorella vulgaris*
 پریسا محمدی، نورا جوانمردی، پریسا تاجر محمدقزوینی* ----- ۱۳۳
- ۸- اثر باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در اختلاط با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگ‌خوار چغندر قند
Spodoptera exigua Hb. (Lep.: Noctuidae) در شرایط آزمایشگاهی
 مجید علیمحمدیان، شهرام آرمیده*، شهرام میرفخرایی، مریم فروزان ----- ۱۴۸
- ۹- اثر پیش تیمار بذر با نانولوله‌های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی (*Pistacia atlantica* Desf & *P. khinjuk* Stocks) فهیمة
 محمدپور، فرهاد قاسمی آقباش، مهرداد زرافشار* و احسان قنبری ----- ۱۶۴
- ۱۰- جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده ال-آسپاراژیناز از گیاه مریم‌گلی باغی (*Salvia nemorosa* L.)
 سمانه نریمانی، مصطفی عبادی، محمد پاژنگ، سعید ملائی ----- ۱۸۰

افزایش شاخص‌های رشد، رنگیزه و برخی متابولیت‌های اولیه در گیاهچه‌های شاهی (*Lepidium sativum* L.) تحت شرایط تنش شوری با کاربرد بتاکاروتن و گالیک اسید

مرضیه بابایی^۱؛ لیلا شبانی^{۲*}؛ شهلا هاشمی شهرکی^۳

چکیده

در مطالعه حاضر، از اسپری محلول پاشی دو آنتی اکسیدان بتاکاروتن و گالیک اسید قبل از تنش، برای مطالعه اثر متقابل آنتی اکسیدان‌ها و تنش شوری در گیاهچه‌های شاهی (*Lepidium sativum* L.) استفاده شد. نتایج نشان دادند که شاخص‌های رشد، میزان محتوای نسبی آب (RWC)، میزان کلروفیل *a* کلروفیل *b* و نسبت کلروفیل *a/b* به طور منفی تحت تأثیر ۲۵ میلی‌مولار قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این مطالعه، اثرات مفید پیش تیمارهای دو آنتی اکسیدان را در گیاهچه‌های شاهی تحت شرایط تنش و بدون تنش با توجه به افزایش وزن خشک ریشه، محتوای نسبی آب، رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای کربوهیدرات و کاهش معنی‌دار محتوای H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) نشان داد. بنابراین، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان به صورت پیش تیمار در تنش شوری ممکن است برای افزایش بیوماس و تنظیم اسمزی در گیاه شاهی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، شاهی، کلرید سدیم، گالیک اسید

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران * نویسنده مسئول: lshabani@gmail.com

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

مقدمه

گیاه شاهی با نام علمی *Lepidium sativum* L. متعلق به خانواده‌ی Brassicaceae است. این گیاه ابتدا در مناطق شرق آفریقا شناخته شده و سپس در سراسر جهان گسترش یافته است (Falana et al., 2014). جنس *Lepidium* شامل حدود ۱۵۰ گونه است که در سراسر جهان توزیع شده‌اند (Falana et al., 2014). شاهی بومی جنوب‌غربی آسیا است که قرن‌ها پیش به اروپای غربی گسترش یافت. این گیاه توسط مصریان باستان به عنوان یک منبع غذایی مورد استفاده قرار گرفت و در نقاط مختلف اروپا از جمله انگلیس، فرانسه، ایتالیا و آلمان گسترش یافت (Mirza & Najafpour, 2006). از طرف دیگر، تنش شوری عامل اصلی محیطی محدود کننده رشد و عملکرد گیاه است. وقتی گیاهان در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند، تنش اسمزی و سمیت یون باعث کاهش رشد می‌شود (Munns, 1993). به‌طور کلی تأثیرات تنش شوری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه شامل افزایش سرعت تنفس و سمیت یون، تغییرات در رشد گیاه، توزیع مواد معدنی، بی‌ثباتی غشا ناشی از جانشینی Ca^{2+} به وسیله Na^{+} ، نفوذپذیری غشا و کاهش کارایی فتوسنتز است. تنش شوری می‌تواند منجر به بسته شدن روزنه شود، که باعث کاهش میزان CO_2 در برگ‌ها و مهار تثبیت کربن می‌شود. همچنین کلروپلاست‌ها را در معرض انرژی برانگیخته زیادی قرار می‌دهند که به نوبه خود باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی می‌شود. ROSها بسیار واکنش‌پذیر هستند و ممکن است تنش اکسیداتیو از طریق اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ایجاد شود (Ahmad et al., 2010). برای بهبود اثرات ناشی از شرایط تنش، پیش تیمار مواد شیمیایی مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاهان یک روش مؤثر است (Makoi & Ndakidemi, 2012). در بین آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنولی می‌توانند در جوانه‌زنی، رشد و نمو گیاهان نقش داشته باشند (Maqbool et al., 2013). این ترکیبات در پاکروبی رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها در غشای سلولی نقش دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً به دلیل خاصیت ردوکس آن‌هاست که می‌توانند نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشاندن اکسیژن یکتایی یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند (Michalak, 2006). گالیک اسید (۳، ۴ و ۵ تری هیدروکسی بنزوئیک اسید) یک ترکیب تری‌فنولیک طبیعی با وزن مولکولی کم و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان مختلف به‌ویژه در چای سبز، انگور، انبه، گردو است (Yousuf & Vellaichamy, 2015). گالیک اسید به دلیل ویژگی پاکروبی گونه‌های اکسیژن فعال مانند آنیون‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل، اثرات منفی تنش اکسیداتیو را بهبود می‌بخشد (Reckziegel et al., 2016). بتاکاروتن آنتی‌اکسیدان مهم دیگری است. بتاکاروتن یک متابولیت ثانویه سنتز شده توسط گیاهان است و به یک گروه از ترکیبات اکسید نشده از کاروتنوئیدها تعلق دارد. بتاکاروتن یک ترکیب آلی، با فرمول $C_{40}H_{56}$ دارای زنجیره بلندی از پیوندهای دوگانه است (Fratianni et al., 2010). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدان

برون را در فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌ها مانند فلزات سنگین (Gokul et al., 2021; Sharma et al., 2021) نقش دارد. نجارخدابخش و سرما (Ozfidan-Konakci et al., 2019) و تنش شوری (Azooz et al., 2013; Liu et al., 2016) نشان دادند که تنش شوری منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه شاهی شده و کاربرد اکزوزن آسکوربیک اسید به عنوان آنتی‌اکسیدان اثرات مضر و تنش اکسیداتیو حاصل از شوری را بهبود بخشیده است. همچنین احسانپور و اسکندری (۱۳۹۴) نشان دادند که بتاکاروتن (۶ میلی گرم در لیتر) قابلیت افزایش تحمل به تنش شوری گیاه گوجه‌فرنگی را از طریق افزایش ریشه‌دهی داشته است. با توجه به اینکه تنش شوری از عوامل محدود کننده در تولید محصولات کشاورزی محسوب می‌شود، بنابراین تحقیق بر روی مکانیزم مقاومت گیاهان به تنش شوری حائز اهمیت است. در این میان استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بهبود و رفع آثار تنش شوری سودمند است. در این پژوهش تاثیر پیش تیمار آنتی‌اکسیدان‌های گالیک اسید و بتاکاروتن در شرایط تنش شوری بر رشد، رنگیزه و برخی ترکیبات اولیه در گیاهچه‌های شاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۹۷-۹۸ در آزمایشگاه گیاهشناسی دانشکده علوم دانشگاه شهرکرد انجام شد. جهت تعیین غلظت آستانه شوری و همچنین مناسب‌ترین غلظت ترکیبات فنولیک که بهترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد گیاه شاهی داشته باشد، تیمار اولیه بذرهای گیاه شاهی با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و غلظت‌های مختلف اسید گالیک و بتاکاروتن، انجام شد. بنابراین از نتایج آزمایش اولیه غلظت ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم، غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بتاکاروتن و ۵ میلی‌مولار گالیک اسید برای انجام این پژوهش استفاده شد.

برای ضدعفونی کردن بذرهای به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار داده شدند. سپس سه‌بار با آب مقطر شستشو داده و تعداد ۳۰ بذر در هر ظرف کشت که از قبل کف آن‌ها با کاغذ صافی پوشانده شده بود، قرار داده شدند. سپس ظرف‌های کشت به اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و بذرهای با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از گذشت پنج روز، سه گیاهچه یکسان و یک فرم انتخاب و در سینی‌های حاوی پرلیت کشت شدند. برای آبیاری محلول غذایی هوگلند ۲۵ درصد استفاده شد. پس از کاشت، آبیاری سه روزی یک‌بار (۷ میلی‌لیتر) انجام شد. کشت‌ها در گلخانه با شرایط رطوبت نسبی ۷۰ درصد، ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول بتاکاروتن با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار و محلول گالیک اسید با غلظت ۵ میلی‌مولار (هر کدام به حجم ۵ میلی‌لیتر برای هر چاهک سینی)، در سه روز متوالی و هر روز سه بار (صبح، ظهر، عصر) بر روی گیاهچه‌های شاهی برگپاشی شد. سپس

گیاهچه‌های هشت روزه با محلول هوگلند ۲۵ درصد حاوی کلرید سدیم ۲۵ میلی‌مولار تیمار شد. پس از گذشت یک هفته گیاهچه‌ها برداشت و برای آنالیز به آزمایشگاه منتقل شدند و شاخص‌های فیزیولوژیک و رشد شامل وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام هوایی و محتوای نسبی آب برگ اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئیدها

براساس این روش ۰/۱ گرم بافت تازه برگ با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰درصد در هاون چینی ساییده شد. روش Arnon (۱۹۴۹) برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b و روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) برای اندازه‌گیری کاروتنوئید استفاده شد. از استون ۸۰درصد به عنوان محلول بلانک استفاده شد.

سنجش محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول

اندازه‌گیری محتوای پرولین به روش Troll و Lindsley (۱۹۵۵) انجام شد. در ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سائیده شد. پس از قرار گرفتن عصاره حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت، به مدت ۵ دقیقه در $g \times 14000$ سانتریفیوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی، با ۴۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (شامل: استیک اسید، اتانول، نین‌هیدرین و آب مقطر که دور از نور نگهداری شد) رقیق گردید و از این محلول برای سنجش پرولین استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول با روش Villar و Pooter (۱۹۹۷) انجام شد. این روش بر اساس اسپکتروفتومتری و سنجش شدت رنگ ایجاد شده از واکنش قندها با معرف آنترون استوار است. برای آماده سازی نمونه ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه‌های تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰درصد در یک هاون به خوبی ساییده و همگن شدند. عصاره به دست آمده در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل مجدداً در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰درصد حل و در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شدند.

سنجش میزان H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدئید

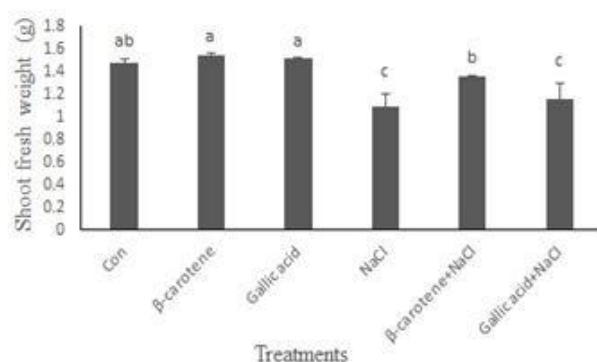
برای اندازه‌گیری H_2O_2 از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای عصاره‌گیری ۰/۱ گرم بافت فریز شده برگ در هاون سرد شده با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار KI اضافه شد. میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت گردید و از محلول TCA ۰/۱ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. برای محاسبه مقدار H_2O_2 از منحنی استاندارد استفاده شد. برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید کیت اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی (شماره کاتالوگ KMDA96، ایران) خریداری شده از شرکت کیازیت مورد استفاده قرار گرفت. از TBA جهت معرف مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ تا ۵۶۰ خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

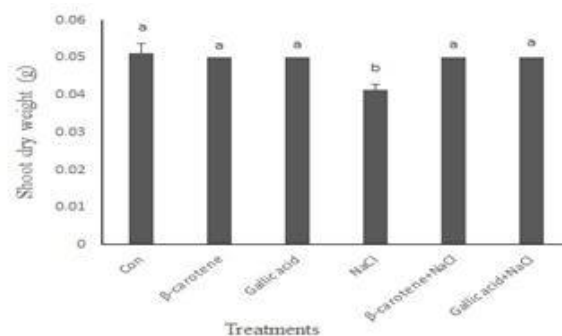
این تحقیق طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تکنیکی به ازای هر تیمار انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون ANOVA انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

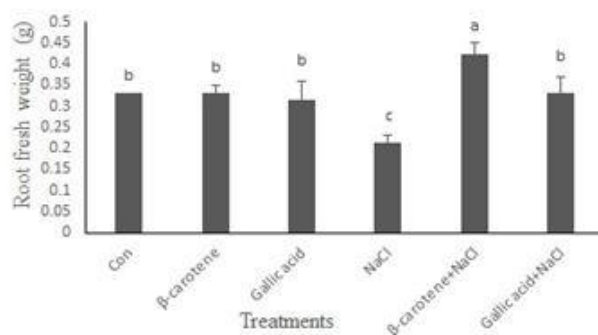
مطابق شکل ۱ (الف) تنش شوری منجر به کاهش وزن تر اندام هوایی گیاهچه‌ها به میزان ۲۷ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد شد. تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید به ترتیب به میزان ۵ درصد و ۲ درصد منجر به افزایش وزن تر اندام هوایی گیاهچه‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد شدند. وزن تر گیاهچه‌های تحت تیمار بتاکاروتن + کلرید سدیم در مقایسه با گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم ۲۵ درصد افزایش نشان داد. ترکیب گالیک اسید + کلرید سدیم تأثیر معنی‌داری بر وزن تر گیاهچه‌های شاهی در مقایسه با گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم نداشت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر اندام هوایی مربوط به گیاهچه‌های تحت تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید بود و کمترین میزان این شاخص در گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم و ترکیب گالیک اسید + کلرید سدیم مشاهده شد.



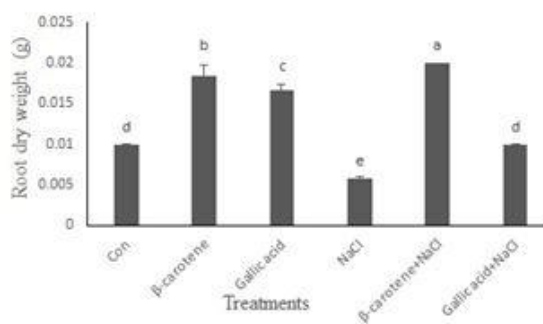
(الف)



(ب)



(ج)



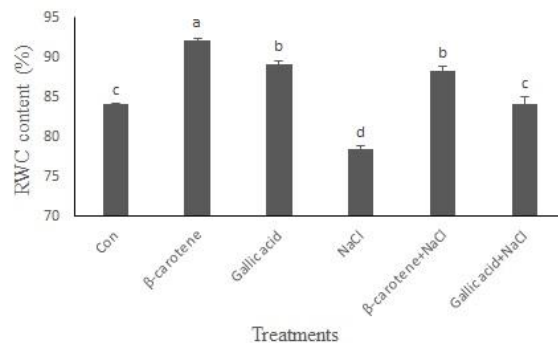
(د)

شکل ۱: تأثیر بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار)، ترکیب بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) بر وزن تر اندام هوایی (الف)، وزن خشک اندام هوایی (ب)، وزن تر ریشه (ج)، وزن خشک ریشه (د) گیاهچه‌های شاهی (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون Duncan است).

مطابق شکل ۱ (ب) تنش کلرید سدیم منجر به کاهش وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌ها به میزان ۱۹ درصد در مقایسه با شاهد شد. تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌ها نداشتند. تیمارهای بتاکاروتن+کلرید سدیم و گالیک اسید+کلرید سدیم هر دو به میزان ۲۱ درصد منجر به افزایش وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم شدند. نتایج شکل ۱ (ج) نشان داد که تیمار کلرید سدیم منجر به کاهش وزن تر ریشه به میزان ۳۵ درصد در مقایسه با شاهد شد. تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه گیاهچه‌های شاهی نداشتند. تیمار

بتاکاروتن+کلرید سدیم منجر به افزایش وزن تر ریشه به میزان ۹۸ درصد در مقایسه با کلرید سدیم شد. وزن تر ریشه تحت تیمار گالیک اسید + کلرید سدیم در مقایسه با کلرید سدیم ۵۳ درصد افزایش نشان داد. تیمار کلرید سدیم منجر به کاهش وزن خشک ریشه به میزان ۴۲ درصد در مقایسه با شاهد شد. تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید منجر به افزایش وزن خشک ریشه به ترتیب به میزان ۸۳ درصد و ۶۷ درصد در مقایسه با شاهد شدند. تیمار بتاکاروتن + کلرید سدیم منجر به افزایش وزن خشک ریشه به میزان ۳/۴۷ برابر نسبت به کلرید سدیم شد. وزن خشک ریشه تحت تیمار گالیک اسید + کلرید سدیم در مقایسه با کلرید سدیم ۷۴ درصد افزایش یافت (شکل ۱ (د)).

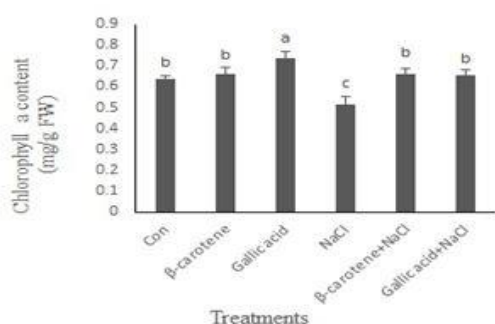
نتایج شکل ۲ نشان داد که تیمار کلرید سدیم منجر به کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب در مقایسه با شاهد شد. تیمار بتاکاروتن و گالیک اسید منجر به افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب (RWC) گیاهچه‌ها به ترتیب به میزان ۱۰ درصد و ۶ درصد در مقایسه با شاهد شدند. تیمار بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به افزایش محتوای نسبی آب به ترتیب به میزان ۱۳ درصد و ۷ درصد در مقایسه با کلرید سدیم شدند.



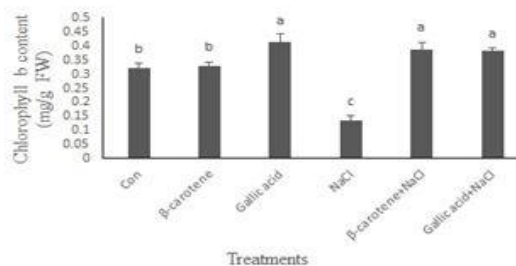
شکل ۲: تأثیر بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار)، ترکیب بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) بر شاخص محتوای نسبی آب (RWC) گیاهچه‌های شاهی (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون Duncan است).

نتایج شکل ۳، میزان کلروفیل *a* (الف) تحت تیمار کلرید سدیم ۲۰ درصد کاهش در مقایسه با شاهد را نشان داد. تیمار بتاکاروتن تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل *a* نداشت و تیمار گالیک اسید ۱۵ درصد افزایش در مقایسه با شاهد را نشان داد. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به افزایش میزان کلروفیل *a* به میزان ۲۸ درصد در مقایسه با تیمار کلرید سدیم شدند. میزان کلروفیل *b* (ب) تیمار کلرید سدیم منجر به کاهش میزان کلروفیل *b* به میزان ۵۹ درصد در مقایسه با

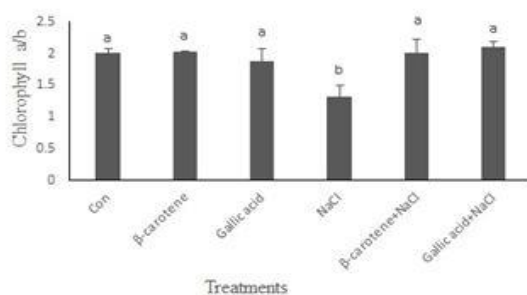
شاهد شد. تیمار بتاکاروتن تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل *b* نداشت و تحت تیمار گالیک اسید ۲۹ درصد افزایش یافت. میزان کلروفیل *b* تحت تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم به ترتیب ۲/۹۱ و ۲/۸۷ برابر در مقایسه با کلرید سدیم افزایش یافت. نسبت کلروفیل *a/b* (ج) تحت تیمار کلرید سدیم به میزان ۳۴ درصد در مقایسه با شاهد کاهش یافت. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به افزایش نسبت کلروفیل *a/b* به ترتیب به میزان ۵۳ درصد و ۶۰ درصد در مقایسه با کلرید سدیم شدند. میزان کاروتنوئید (د) تحت تیمار گالیک اسید و تیمار بتاکاروتن+کلرید سدیم به ترتیب به میزان ۲۵ درصد و ۲۰ درصد افزایش یافت. سایر تیمارها تأثیر معنی‌داری بر میزان کاروتنوئید نداشتند.



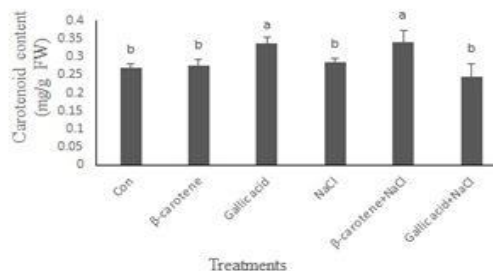
(الف)



(ب)

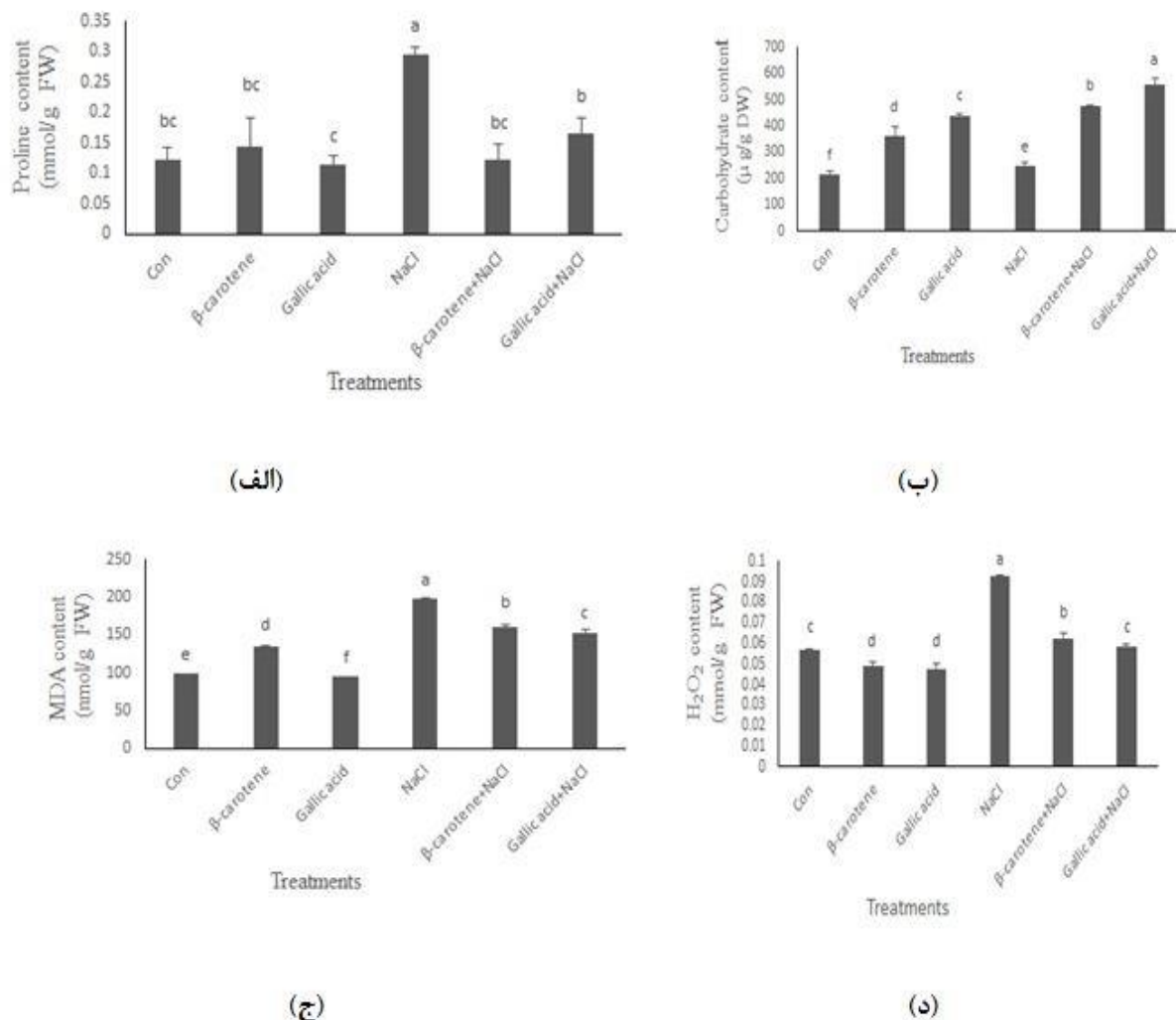


(ج)



(د)

شکل ۳: تأثیر بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار)، ترکیب بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) بر مقادیر کلروفیل *a* (الف)، کلروفیل *b* (ب)، نسبت کلروفیل *a/b* (ج) و کاروتنوئید (د) در گیاهچه‌های شاهی (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون Duncan است).



شکل ۴: تأثیر بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار)، ترکیب بتاکاروتن (۵/۰ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) و گالیک اسید (۵ میلی‌مولار) + کلرید سدیم (۲۵ میلی‌مولار) بر میزان پرولین (الف)، کربوهیدرات (ب)، مالون دی‌آلدئید (ج)، H_2O_2 (د) در گیاهچه‌های شاهی (حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون Duncan است).

مطابق نتایج شکل ۴ (الف) بیشترین محتوی پرولین در گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم مشاهده شد، به‌طوری‌که تیمار کلرید سدیم منجر به افزایش میزان پرولین به میزان ۲/۴۳ برابر نسبت به شاهد شد. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به کاهش مقدار پرولین گیاه به‌ترتیب به‌میزان ۵۸ درصد و ۴۴ درصد در مقایسه با کلرید سدیم شدند. نتایج شکل ۴(ب) نشان داد که میزان کربوهیدرات‌های محلول طی تیمار کلرید سدیم، در مقایسه با شاهد، به‌میزان ۱۵ درصد افزایش داشت.

تحت تیمار بتاکاروتن به میزان ۶۷ درصد و تحت تیمار گالیک اسید به میزان ۲/۰۱ برابر نسبت به شاهد افزایش یافتند. همچنین تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول به‌ترتیب به‌میزان ۱/۹۱ و ۲/۲۴ برابر نسبت به کلرید سدیم شدند. همانطور که در شکل ۴ (ج) نیز نشان داده شده میزان مالون‌دی‌آلدئید تحت تیمار کلرید سدیم ۹۹ درصد افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. تحت تیمار بتاکاروتن ۳۶ درصد افزایش و در تیمار گالیک اسید ۵ درصد کاهش در میزان مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با شاهد مشاهده شد. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم میزان مالون‌دی‌آلدئید را در مقایسه با کلرید سدیم به ترتیب ۱۹ درصد و ۲۲ درصد کاهش دادند. نتایج شکل ۴ (د) نشان داد که تیمار کلرید سدیم منجر به افزایش محتوی H_2O_2 به میزان ۶۳ درصد در مقایسه با شاهد شد. میزان H_2O_2 تحت تیمارهای بتاکاروتن و گالیک اسید به‌ترتیب ۱۳ درصد و ۱۷ درصد در مقایسه با شاهد کاهش یافت. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به کاهش H_2O_2 به میزان ۳۳ درصد و ۳۷ درصد نسبت به کلرید سدیم شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه تیمار کلرید سدیم منجر به کاهش شاخص‌های رشد در مقایسه با شاهد شد. تیمارهای بتاکاروتن و اسید گالیک به‌تنهایی و بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد در مقایسه با تیمار کلرید سدیم شدند. مطابق با این مشاهدات Mekawy و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که تیمار شوری از رشد گیاهچه برنج به‌طور قابل توجهی جلوگیری کرده است و افزودن آبی ژنین، اثرات تنش شوری را بهبود داده است. آبی ژنین می‌تواند طول و وزن خشک گیاهچه برنج را افزایش دهد. دلیل افزایش رشد ناشی از تیمار آبی ژنین نه تنها افزایش توانایی پاکروبی ROS، بلکه همچنین افزایش محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و فعالیت آنزیم‌های اکسیداز در گیاهچه برنج بود. همچنین Singh و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که پیش‌تیمار بذرهای برنج با گالیک اسید و روتین موجب افزایش جوانه‌زنی و پارامترهای رشد گیاهچه‌های برنج شده است. نقش بتاکاروتن در افزایش مقاومت به شوری برخی گونه‌های جلبک *Dunaliella* نیز گزارش شده است. برای مثال گونه *D. salina* وقتی در شرایط تنشی مثل افزایش شوری، درجه حرارت، نور شدید، کمبود مواد غذایی قرار بگیرد، بتاکاروتن زیادی تولید می‌کند که با افزایش مقاومت جلبک نسبت به این تنش‌ها همراه است (Coesel et al., 2008). بهبود وزن تر و خشک در اثر افزودن بتاکاروتن و اسید گالیک تحت تنش شوری می‌تواند به‌دلیل آن باشد که آن‌ها به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی عمل می‌کند و قادر به پاکسازی واسطه‌گرهای اکسیژنی و رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Telfer, 2014). وزن تر اندام هوایی در تیمار بتاکاروتن تحت تنش

شوری بیشتر از تیمار اسید گالیک تحت تنش شوری است. نویسندگان پیشنهاد می‌کنند این افزایش می‌تواند به دلیل افزایش بالاتری از شاخص RWC در تیمار بتاکاروتن تحت تنش شوری نسبت به تیمار اسید گالیک تحت تنش شوری باشد.

در این تحقیق، RWC تحت تنش کلرید سدیم به طور قابل توجهی کاهش یافت که تیمار با بتاکاروتن و گالیک اسید توانستند این کاهش را بهبود بخشند. افزایش شاخص RWC پس از کاربرد بتاکاروتن و گالیک اسید در برگ‌های گیاهچه‌های شاهی تحت تیمار کلرید سدیم توسط القاء تجمع اسمولیت‌هایی مانند کربوهیدرات است. این نتایج با یافته‌ها در مورد خیار در معرض اسید فولیک به همراه تنش اسمزی PEG سازگار است (Li *et al.*, 2013). Li و همکاران (۲۰۱۳) پیشنهاد کردند که اسید فولیک با افزایش محتوای پرولین و قندهای محلول باعث افزایش مقادیر RWC گیاهچه‌های دارای تنش اسمزی PEG شد.

در این تحقیق، کلرید سدیم منجر به کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل a و b و نسبت کلروفیل a/b شد. احتمالاً تنش شوری با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند H_2O_2 باعث تخریب کلروفیل ناشی از آسیب اکسیداتیو می‌شود. بتاکاروتن و گالیک اسید توانستند اثرات منفی تنش شوری بر میزان کلروفیل‌ها را بهبود بخشند، بنابراین احتمال می‌رود بتاکاروتن و گالیک اسید به لحاظ نقش آنتی‌اکسیدانی از تخریب کلروفیل در تنش شوری جلوگیری کرده باشند. قابل ذکر است که بتاکاروتن به دلیل نقش در چرخه گزانتوفیل نیز می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کند. Singh و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهچه‌های برنج پرایم شده با گالیک اسید و روتین به طور معنی‌داری افزایش یافته است. طبق مشاهدات آن‌ها افزایش کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در تیمار گالیک اسید به ترتیب $2/2$ و $2/26$ برابر و در تیمار روتین به ترتیب $1/53$ و $1/26$ برابر در مقایسه با شاهد بوده است.

یکی از مهم‌ترین شاخصه‌های شرایط شوری، محتوای پرولین است که در شرایط شوری غلظت آن افزایش یافته و سبب تعدیل پتانسیل اسمزی می‌گردد. پرولین در مواجهه با تنش‌های اسموتیک دارای نقش‌های محافظتی در سلول‌ها مانند حفظ پایداری مولکول‌ها و ساختارهای سلولی، جمع نمودن رادیکال‌های آزاد و تنظیم اسمزی است. در سلول‌های گوجه فرنگی در محیط‌هایی با پتانسیل آب پایین، تجمع پرولین به عنوان یک ویژگی در افزایش تحمل به کار می‌رود. گزارش شده که سنتز پرولین در طول تنش القاء می‌شود. افزایش پرولین منجر به افزایش مقاومت گیاه به شوری شده، این تغییر بستگی به گونه گیاه دارد. گاهی مقدار آن در گیاه تحت تنش به ۱۰۰ برابر گیاه شاهد می‌رسد زیرا تجمع آن نقش سازشی در گیاه داشته و به عنوان یک اسمولیت ذخیره کننده کربن و نیتروژن عمل می‌کند (Heuer, 2010). در مطالعه حاضر تیمار کلرید سدیم منجر به افزایش محتوای پرولین گیاهچه شاهی در مقایسه با شاهد شد. پیش تیمارهای بتاکاروتن و گالیک اسید تأثیر چندانی بر محتوای پرولین نداشتند. تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم منجر به کاهش محتوای پرولین در مقایسه با گیاهچه‌های تحت تنش کلرید سدیم شدند.

بنابراین به‌نظر می‌رسد، اثر بهبود تنش شوری توسط بتاکاروتن و گالیک اسید از طریق پرولین نبوده است. احسانپور و اسکندری (۱۳۹۴) گزارش کردند که محتوای پرولین گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری به طور معنی‌داری افزایش یافته است. آن‌ها همچنین گزارش کردند که افزودن بتاکاروتن به محیط کشت حاوی نمک موجب افزایش میزان پرولین در اندام هوایی گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود. تجمع قندهای محلول نیز همانند تجمع پرولین در پاکروبی گونه‌های اکسیژن فعال، تسهیل جذب آب و تنظیم اسمزی سلول‌های گیاهی نقش مهمی را بر عهده دارد. قندهای محلول نظیر گلوکز، فروکتوز، ساکارز و ... سبب تنظیم اسمزی و پایداری غشا و پروتئین‌های موجود در سلول می‌شوند. این عمل می‌تواند از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل قندها و زنجیره‌های قطبی پروتئین‌ها و بالاخره پایدارسازی پروتئین‌ها صورت گیرد. برای مثال تجمع ساکارز موجب حفظ فسفولیپیدهای غشا شده و از تغییرات ساختاری در پروتئین‌های محلول سلول جلوگیری می‌کند (Nuccio *et al.*, 1999). در این تحقیق، تیمار کلرید سدیم منجر به افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با شاهد شد، کاملاً محتمل است که کربوهیدرات‌های محلول در پاسخ به تنش شوری به عنوان اسمولیت‌های سازگار تجمع یافته‌اند تا به‌عنوان محافظ اسمزی عمل نمایند. همچنین پیش تیمارهای بتاکاروتن و گالیک اسید و تیمارهای بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم محتوای کربوهیدرات‌های محلول را به طور معنی‌داری افزایش دادند. به‌نظر می‌رسد، بتاکاروتن و گالیک اسید، سطح کربوهیدرات‌های محلول را از طریق افزایش محتوای کلروفیل و فتوسنتز تقویت کرده است. محتوای مالون‌دی‌آلدئید و H_2O_2 نمونه‌هایی از تأثیرات تنش اکسیداتیو تنش شوری است. ROS‌هایی مثل H_2O_2 و O_2^- در گیاهان معمولاً به عنوان محصولات سمی متابولیسم هوازی تولید می‌شوند که وقتی گیاهان در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند غلظت آن‌ها افزایش می‌یابد (Singh *et al.*, 2017). تنش اکسیداتیو بوجود آمده در نتیجه شوری منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن، رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید می‌گردد (Noctor & Foyer, 1998). برخلاف سایر انواع اکسیژن فعال پراکسید هیدروژن قادر به انتشار از طریق غشاها است. سمیت زیستی پراکسید هیدروژن از طریق اکسیداسیون گروه‌های SH مدت‌هاست که شناخته شده است. پراکسید هیدروژن یک بازدارنده قوی چرخه کلونین است. پراکسید هیدروژن در حضور کاتالیزورهای فلزی خاص یا کلات‌های فلزی از طریق واکنش‌های Haber-Weiss یا Fenton تولید رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل می‌نماید و سمیت خود را افزایش می‌دهد (Sudhakar *et al.*, 2001). اثر دیگر پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد دیگر پراکسیداسیون لیپیدها است. از این پراکسیداسیون موادی مانند مالون‌دی‌آلدئید تولید می‌شود. معمولاً پراکسیداسیون لیپیدها ناشی از رادیکال‌های آزاد مربوط به اسیدهای چرب غیر اشباع مثل لینولئیک اسید و لینولنیک اسید است (Dash & Panda, 2001). حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی در شرایط تنش یکی از اجزای مقاومت در برابر تنش‌هایی نظیر شوری و خشکی است (Masood *et al.*, 2006).

در این تحقیق، محتوای H_2O_2 و MDA در گیاهچه‌های تحت تیمار کلرید سدیم افزایش یافت، که نشان می‌دهد سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه شاهی در شرایط تنش برای پاکروبی محتوای MDA کافی نبوده است. کاهش میزان MDA در گیاهچه‌های پیش‌تیمار شده با گالیک اسید و همچنین گیاهچه‌های تحت تیمار بتاکاروتن + کلرید سدیم و گالیک اسید + کلرید سدیم نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های افزون نیز می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال را پاکروبی کرده و پراکسیداسیون لیپید را خاتمه دهند، که می‌تواند آسیب‌های تنش شوری را بهبود بخشند. مطابق با نتایج این پژوهش Singh و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که میزان MDA در گیاهچه‌های پیش‌تیمار شده با گالیک اسید کاهش یافته است. پیشنهاد شده است که کاهش میزان MDA می‌تواند ناشی از کاهش سطح ROS و رادیکال‌های آزاد مانند H_2O_2 و O_2^- باشد که به دلیل افزایش فنولیک کل و فلاونوئیدها و تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار گالیک اسید است.

نتیجه‌گیری کلی

تیمار گیاهچه‌های شاهی با ۲۵ میلی‌مولار NaCl باعث کاهش رشد گیاه از طریق کاهش وزن تر و خشک، محتوای نسبی آب، رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش پراکسیداسیون لیپید غشاء و پراکسید هیدروژن شد. نتایج این پژوهش نشان داد که کاهش پراکسیداسیون لیپید غشاء و پراکسید هیدروژن، افزایش محتوای کلروفیل، تجمع اسمولیت‌هایی مانند کربوهیدرات‌های محلول در طی پیش‌تیمار گیاهچه‌های شاهی با ترکیبات بتاکاروتن و گالیک اسید باعث افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش شوری شد. بنابراین کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های بتاکاروتن و گالیک اسید به‌عنوان موادی نسبتاً ارزان و در دسترس می‌تواند در شرایط شوری با حفظ و تنظیم مکانیزم‌های مذکور به بقای بیشتر گیاه منجر گردند.

منابع

احسانپور، ع. ا. و اسکندری، ه. (۱۳۹۴). اثر بتاکاروتن بر ریشه‌دهی و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) تحت تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه‌ای. خشکبوم، ۵، ۱-۹.

نجارخداخش، آ. و چاپارزاده، ن. ۱۳۹۴. نقش آسکوربیک اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی. مجله پژوهش‌های

- Ahmad, P., Jaleel, C. and Sharma, S. (2010). Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57:509-517.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environment*, 24: 1337-134.
- Arnon, D. (1949). Determination of chlorophyll concentration in leaf tissues of plants. *Plant Physiol.* 24.
- Azooz, M. M., Alzahrani, A. M. Youssef, M. M. (2013). The potential role of seed priming with ascorbic acid and nicotinamide and their interactions to enhance salt tolerance in broad bean (*Vicia faba* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7: 2091-2100.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. and Varela, J. C. S. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10: 602-612.
- Dash, M. and Panda, S. (2001). Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum*, 44: 587-589.
- Falana, H., Nofal, W. and Nakhleh, H. (2014). A review article *Lepidium sativum* (Garden cress). Pharm-D Program, College of Nursing, Pharmacy and Health Professions, Birzeit University, 1-8.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L. and Panfili, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 867-871
- Gokul, A.; Fahiem Carelse, M.; Niekerk, L.-A.; Klein, A.; Ludidi, N.; Mendoza-Cozatl, D.; Keyster, M. (2021). Exogenous 3,30-Diindolylmethane improves vanadium stress tolerance in *Brassica napus* seedling shoots by modulating antioxidant enzyme activities. *Biomolecules*, 11: 436.

- Heuer, B. (2010). Role of proline in plant response to drought and salinity. Handbook of Plant and Crop Stress. CRC Press, Boca Raton, 213-238.
- Li, D.M., Nie, Y.X., Zhang, J., Yin, J.S., Li, Q., Wang, X.J. and Bai, J.G. (2013). Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings. *Biologia Plantarum*, 57:711-717.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. Elsevier, 148: 349-382.
- Liu, Y., Hou, L.-Y., Li, Q.-M., Jiang, Z.-P., Liu, D. Zhu, Y. (2016). The effects of exogenous antioxidant germanium (Ge) on seed germination and growth of *Lycium ruthenicum* Murr subjected to NaCl stress. *Environmental Technology*, 37: 909-919.
- Makoi, J. H. and Ndakidemi, P. A. (2012). Allelopathy as protectant, defence and growth stimulants in legume cereal mixed culture systems. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40: 161-186.
- Maqbool, N., Wahid, A., Farooq, M., Cheema, Z. and Siddique, K. (2013). Allelopathy and abiotic stress interaction in crop plants. *Allelopathy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 451-468.
- Masood, A., Shah, N. A., Zeeshan, M. and Abraham, G. (2006). Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *Environmental and Experimental Botany*, 58: 216-222.
- Mekawy, A.M.M., Abdelaziz, M.N. and Ueda, A. 2018. Apigenin pretreatment enhances growth and salinity tolerance of rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130: 94-104.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4): 523-530.
- Mirza, M., and N.M. Najafpour. (2006). Essential oil composition of *Lepidium sativum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 4(30):481-488

- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*. 16:15-24.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49: 249-279.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., Mcneil, S. D. and Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 128-134.
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Yildiztugay, A. Kucukoduk, M. (2019). Cold stress in soybean (*Glycine max* L.) roots: exogenous gallic acid promotes water status and increases antioxidant activities. *Botanica Serbica*, 43: 59-71.
- Pooter, H. and Villar, R. 1997. The fate acquire carbon in plants: chemical composition and constructions costs. *Plant Resource Allocation*. 39-72.
- Reckziegel, P., Dias, V.T., Benvegnú, D.M. , Bouffleur, N., Barcelos, R.C.S. , Segat, H.J., Pase, C.S., Dos Santos, C.M.M., Flores, É.M.M. and Bürger, M.E. (2016). Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats. *Toxicology reports*, 3:351-356.
- Sharma, P., Gautam, A., Kumar, V., Khosla, R., Guleria, P. (2021). Naringenin reduces Cd-induced toxicity in *Vigna radiata* (mungbean). *Plant Stress* 1: 100005
- Singh, A., Gupta, R. and Pandey, R. (2017). Exogenous application of rutin and gallic acid regulate antioxidants and alleviate reactive oxygen generation in *Oryza sativa* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23: 301-309.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161: 613-619
- Telfer, A.(2014). Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of β -carotene. *Plant and Cell Physiology*, 55: 1216-1223.

Troll, W. and Lindsley, J. (1955). A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry*, 215: 655-660.

Yousuf, M. J. and Vellaichamy, E. (2015). Protective activity of gallic acid against glyoxal-induced renal fibrosis in experimental rats. *Toxicology Reports*, 2: 1246-1254.

Increase of growth parameters, pigmentation and some primary metabolites in *Lepidium sativum* L. seedlings under salinity stress using β -carotene and Gallic acid

M. Babaei¹, L. Shabani^{2*}, S. Hashemi Shahraki³

Received: 2021.2.23

Accepted: 2021.9.4

Abstract

In the present study, foliar spray of two antioxidant compounds (β -carotene and gallic acid) before the stress was used to study the interactive effect of antioxidants and salinity stress in seedlings of *Lepidium sativum* L. Our results showed growth indices, relative water content (RWC), chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and chlorophyll *a/b* were negatively affected by 25 mM NaCl. The results obtained in the present study showed the beneficial effects of the pre-treatments of two antioxidants in *Lepidium sativum* L. seedling under stress and non-salinity stress condition with respect to increasing root dry weight, RWC, photosynthetic pigments, the content of carbohydrate and significant reduction of H₂O₂ and malondialdehyde (MDA) content. Therefore, usage of antioxidant compounds as a pretreatment under salinity stress may be the advantageous for increasing biomass and osmotic adjustment in *Lepidium sativum* L. seedlings.

Keywords: β -carotene, Gallic acid, *Lepidium sativum* L., Sodium chloride

¹MSc Graduate, Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran *Email (corresponding author: lshabani@gmail.com)

³Assistance Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

بررسی تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تکوین اندام‌های رویشی و زایشی گیاه^۱

Arabidopsis thaliana

الهام بصیری^۲، سایه جعفری مرندي^{۳*}، صدیقه اربابیان^۴، احمد مجد^۵، محمد علی ملبوبی^۶

چکیده

تثبیت فسفات توسط کودهای شیمیایی علاوه بر پر هزینه بودن، خطرات زیست محیطی را در بردارد. امروزه کود زیستی فسفات بارور ۲ حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات باعث تجزیه ترکیبات فسفر نامحلول و قابل جذب برای گیاه است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کودهای زیستی بارور ۲ (*Pseudomonas putida* (strain P13) و *Pantoea agglimerans* (strain P5) (فقط یک‌بار در ابتدای دوره رشد) و فسفات پتاسیم در سه غلظت (0, 1.2mM, 5mM) (تا پایان دوره رشد گیاهان، هفته‌ای یک‌بار همراه با آبیاری) بر برخی ویژگی‌های تکوینی گیاه *Arabidopsis thaliana* در شرایط گلخانه‌ای، ۱۵ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۶۰۰۰ لوکس در قالب طرح تصادفی انجام شد. بعد از مراحل سلول - بافت شناختی، لام‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. نتایج، کاهش معنی‌دار تراکم آوند چوب در ساقه گیاهان تحت تیمار با فسفات پتاسیم 5 mM و 1.2 mM را در مقایسه با دو تیمار دیگر نشان داد. هم چنین فسفات پتاسیم 5mM سبب افزایش لایه‌های تونیکا و ضخامت دیواره مخصوص تترادها شد. افزایش سلولی پریموردیم تخمکی، پیش رویان و آویزه در گیاهان تیمار با کود زیستی و فسفات 5mM مشاهده شد. تیمار با کود زیستی، بیشترین میانگین تعداد دانه‌های تولید شده را نشان داد. کاربرد کود زیستی بارور ۲ در این آزمایش با اثراتی مشابه با فسفات

۱. قسمتی از رساله دکتری از دانشگاه تهران شمال. اساتید: سایه جعفری مرندي، صدیقه اربابیان، احمد مجد، علی محمد ملبوبی

۲. دانشجوی دوره دکترای دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران

۳. استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران *نویسنده مسئول s_jafari@iau-tnb.ac.ir

۴. دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران

۵. استاد دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ایران

۶. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

پتاسیم، عملکرد کمی و کیفی آرابیدوپسیس را افزایش داد. کود زیستی می‌تواند به عنوان یک جایگزین مطمئن و موثر برای افزایش بهره‌وری خاک و رشد گیاه در کشاورزی پایدار و به حداقل رساندن آلودگی محیطی باشد.

واژه های کلیدی: پرموردیم تخمکی، پیش‌رویان، ریزوباکتری‌ها، ساختار تشریحی، مریستم رویشی

مقدمه

فسفر یکی از عناصر اصلی و پرمصرف برای رشد و نمو گیاهی از جمله تقسیم سلولی، رشد بافت جدید، و ترکیبی در ساختار اسید نوکلئیک‌هاست که در ساخت پژوتئین‌ها نقش دارند. هم‌چنین در کل گیاه متابولیسم کربوهیدرات‌ها را تحریک کرده و یکی از غنی‌ترین ترکیبات موجود در (ATP, CTP, GTP, UTP) است (Afzal *et al.*, 2005; Ciereszko *et al.*, 2017; Maathuis, 2009;) (Malhotra *et al.*, 2018; Mehra *et al.*, 2019; Péret *et al.*, 2011; Vessey, 2003).

یکی از مشکلات موجود در کشاورزی پایدار، تثبیت فسفر در خاک و غیرقابل استفاده شدن این عنصر برای گیاهان است. گیاهان در زمان فقر فسفات تغییراتی در رفتارهای فیزیولوژیکی و پاسخ‌های ریخت‌شناسی خود ایفا نموده، که جذب فسفات را افزایش می‌دهند (از طریق استراتژی‌های همزیستی، تغییرات در معماری ریشه، ترشح اسیدهای آلی و اسیدفسفات‌ها توسط ریشه‌ها (Amtmann *et al.*, 2005; Betencourt *et al.*, 2012; Hakeem *et al.*, 2014; Latati *et al.*, 2016; Péret *et al.*, 2011; Scheible & Rojas-Triana, 2015; Zhang *et al.*, 2014) و عامل دیگر در جذب فسفات توسط ریشه، تعدیل فعالیت میکروبی در مجاورت ریزوسفر است (Morgan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009) این میکروارگانیسم‌ها تحت عنوان (plant growth PGPM (promoting microbes رشد گیاه را به طور مستقیم و یا غیر مستقیم تحت شعاع قرار می‌دهند (Mishra & Sundari, 2013; Sukriti *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2017).

ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPRs) به طور مستقیم از مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با حل شدن و جذب مواد مغذی (به عنوان مثال P، K، Zn و غیره)، تثبیت بیولوژیکی N₂ و تولید فیتوهورمون و مولکول‌های سیدروفور (Fankem *et al.*, 2006; Panhwar *et al.*, 2011) و نیز به طور غیرمستقیم با تعدیل مکانیسم‌های دفاعی گیاهان و سیگنال‌های القاکننده ایمنی گیاهی در برابر حملات فیتوپاتوژن‌ها رشد گیاه را تحریک می‌کنند (Kumar *et al.*, 2018).

از مهمترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توان به *باسیلوس* (*Bacillus*) و *سودوموناس* (*Pseudomonas*) اشاره کرد (Tilak *et al.*, 2005).

محصولات کشاورزی با بازدهی بالا نیاز به استفاده مداوم کودهای شیمیایی در سیستم‌های زراعی دارند (Zahid, 2015). با این حال، قیمت و در دسترس بودن این مواد یک عامل محدودکننده تولید محصولات به ویژه در کشورهای در حال توسعه در سراسر جهان است (Zahid, 2015). استفاده مداوم از کودها ممکن است اثرات منفی بر سیستم اکوسیستم کشاورزی مانند شستشو، آلودگی منابع آب، انتشار گازها به اتمسفر داشته باشند، در نتیجه صدمات جبران‌ناپذیری به کل اکوسیستم و محیط زیست وارد می‌کنند (Qureshi et al., 2012). نتایج موفقیت آمیزی از کاربرد گونه های PGPM شامل *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* و *Enterobacteria*، روی ذرت، کلزا، گندم و سایر محصولات هم در محیط آزمایشگاه و هم در شرایط مختلف اکولوژی بدست آمده است (Abbasi et al., 2011; Almaghrabi et al., 2013; El-Sayed et al., 2014; Iqbal Hussain et al., 2013; Mehta et al., 2014; Yadav et al., 2015).

آرابیدوپسیس یک جنس از گیاهان خانواده شب‌بوین (Brassicaceae) است. *A.thaliana* یکی از گونه‌های این جنس است که به عنوان یک گیاه مدل در زیست‌شناسی گیاهی بطور گسترده استفاده می‌شود (Franzke et al., 2009). این گیاه اولین گیاهی است که تمام ژنوم آن توالی‌یابی شده و به گیاه‌شناسان اجازه آنالیزهای مناسب گیاهی، ترکیبی از زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیکی را می‌دهد تمام چرخه زندگی این گیاه در مدت شش هفته کامل می‌شود (Cotter, 2005; Page & Grossniklaus, 2002). ریشه‌های *آرابیدوپسیس* دارای ساختمان ساده، آسان برای مطالعه در کشت است و نیز ریشه این گیاه، همزیستی با باکتری‌های تثبیت نیتروژن و قارچ‌های میکوریزایی را ندارد (Smyth et al., 1990). معرفی ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPRs) از جمله باکتری‌های حل‌کننده فسفات (Phosphate solubilizing bacteria (PSB) به عنوان کودهای زیستی گزینه‌ای پایدار برای دسترسی بیشتر مواد مغذی و بهبود رشد گیاه و عملکرد آن پیشنهاد می‌شود (Vessey, 2003). کاربرد این باکتری‌ها، به جهت کاهش استفاده از کودهای شیمیایی بدون به خطر انداختن عملکرد، در حال حاضر یکی از ویژگی‌های مهم تحقیقات در زمینه کشاورزی، میکروبی‌شناسی و فناوری زیستی است (Minorsky, 2008). با فرض اینکه کودزیستی با تاثیر بر پدیده‌های رشد و نمو می‌تواند منجر به بهبود عملکرد گیاه *آرابیدوپسیس* شود، در پژوهش حاضر ارزیابی عملکرد کود زیستی بارور ۲ در مقایسه با فسفات پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای *Arabidopsis thaliana* (واریته کلمبیا) از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران تهیه شد و بعد از ضدعفونی کردن (به منظور استریل کردن، بذرها با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه شسته شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند در نهایت ۳ بار با آب دوبار تقطیر شسته شدند و سپس به مدت ۶ ساعت در آب دو بار تقطیر

نگه داری شدند (Ma et al., 2016). بذرها ی استریل به گلدان‌هایی به ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۳ سانتی‌متر متشکل از پرلیت، ورمیکولیت و پیت به نسبت ۱:۱:۱ در شرایط گلخانه‌ای با ۱۵ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. گروهی از بذرها با کود زیستی فسفات تهیه شده از شرکت زیست فناوری سبز تهران، از نوع فسفات بارور ۲ آغشته شدند که حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات *Pseudomonas Putida* (P13) و *Pantoea Agglomerans* (P5) بود. سایر نمونه‌های مورد آزمایش در دومین هفته رویش بذرها، در بستر پیت، با اضافه نمودن فسفات پتاسیم با غلظت های (0, 1.2mM, 5mM) هفته ای یک بار همراه آبیاری تا پایان دوره رشد تیمار شدند. هم چنین به منظور تهیه برش‌گیری دستی از اندام های رویشی، ابتدا نمونه‌ها در الکل، گلیسرین (۱:۱) تثبیت شده و سپس برش‌گیری دستی و رنگ آمیزی به روش مضاعف با آبی‌متیل و کارمن‌زاجی انجام شد. برای برش میکروتومی مریستم راس ساقه، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در فیکساتور فرمالدئید ۳۷ درصد، اسیداستیک ۱۰۰ درصد اتانول ۷۰ درصد (۱۷:۱:۲) (FAA) تثبیت شدند. پس از آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف سازی با تولوئن و سپس قالب‌گیری در پارافین، با میکروتوم (Cut 4060 Co., Mainz, Germany) برش‌هایی با ضخامت ۸ میکرومتر تهیه گردید. پس از طی مراحل پارافین‌زدایی و آب‌دهی، رنگ‌آمیزی با همتوکسیلین و انوزین صورت گرفت (Yeung, 1984). پس از تهیه لام، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری (BLACKL.3000) مشاهده و عکس برداری صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری محیط دانه‌های گرده از نرم‌افزار Digimizer استفاده شد.

آزمون آماری

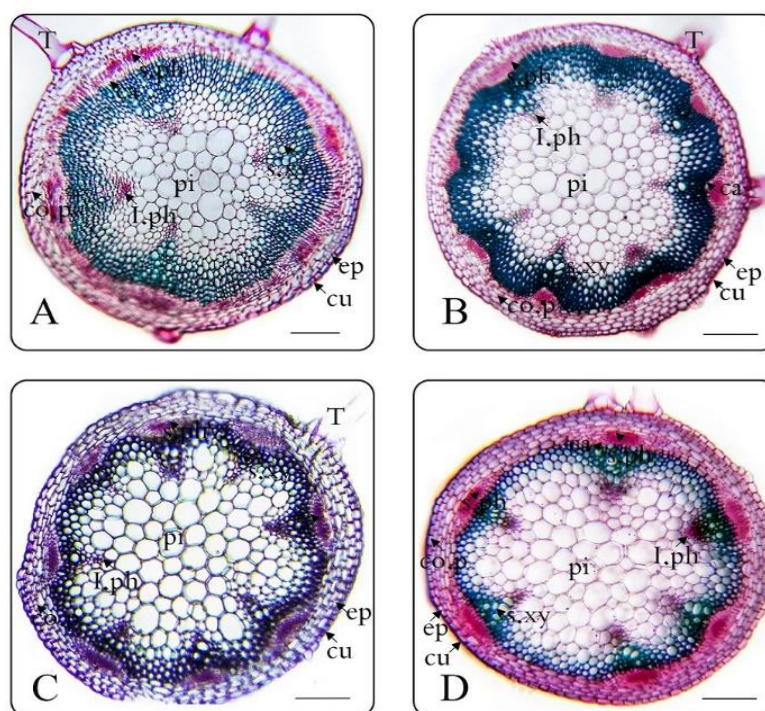
به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (20) و Excel استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ۳ تکرار (میانگین $\pm$ انحراف معیار) گزارش شدند. سطح معنی داری آزمایش‌ها ($P \leq 0.5$) در مورد اختلافات بین میانگین پارامترهای مختلف در نمونه‌های مورد آزمایش با آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت

نتایج

بررسی ساختار تشریحی ساقه

در مشاهدات میکروسکوپی برش عرضی ساقه مشخص شد که، بیرونی ترین بخش را سلول های مکعبی شکل اپیدرم (ep) تشکیل می‌دهد که توسط لایه‌ای از کوتیکول (Cu) احاطه شده است. هم چنین در این لایه تعدادی کرک (T) دیده می‌شود. منطقه بعدی پارانشیم پوست (Co.p) است که بین اپیدرم و استوانه مرکزی قرار دارد و از چند ردیف سلول مکعبی شکل تشکیل شده است.

استوانه مرکزی شامل بافت آبکش پسین (s.ph) به صورت پیوسته به طرف خارج و آبکش به صورت منقطع به سمت داخل است. بافت چوبی پسین (s.xy) در داخل با دیواره‌ای ضخیم و سبز رنگ مشاهده می‌شود. حد فاصل آبکش پسین و چوب پسین لایه کامبیوم (Ca) وجود دارد. رشد چوب در ساقه این گیاه به صورت گریز از مرکز بوده و پروتوزایلم (p.x) با سایز کوچکتر در نوک دسته آوندی و به سمت مرکز قرار دارد و متازایلم (M.x) با سایز بزرگتر به سمت آبکش قرار دارد. مغز نیز در قسمت میانی ساقه واقع شده است. تراکم آوند چوب در ساقه نمونه‌های تحت تیمار با فسفات پتاسیم 5 mM و 1.2 mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد و کود زیستی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱). هم چنین سلول‌های بافت پارانشیم پوست در نمونه‌های تحت تیمار با فسفات پتاسیم در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمار شده با کود زیستی حجیم‌تر اند. ضخامت و پیوستگی آبکش پسین در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده است و کمترین ضخامت بافت آبکش در نمونه زیستی مشاهده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی تغییرات تشریحی برش عرضی ساقه *A. thaliana*: A: شاهد, B: کود زیستی بارور ۲, C: فسفات

پتاسیم 1.2 mM, D: فسفات پتاسیم 5 mM: cu کوتیکول، ep روپوست؛ co.p پارانشیم پوستی، s.ph: آبکش

پسین، ca: کامبیوم، s.xy: چوب پسین، I.ph: آبکش داخلی، pi: مغز، T: کرک، مقیاس 50μm.

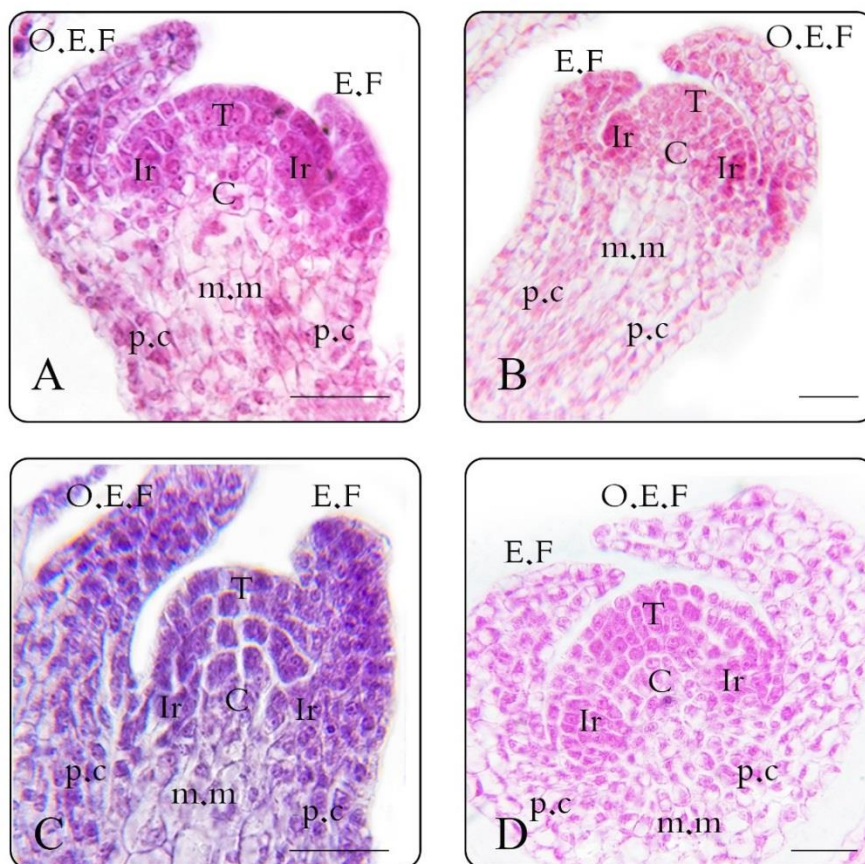
جدول ۱: مقایسه نتایج ساختاری تشریحی در ساقه آرابیدوپسیس تالیانا

تیمار	بدون فسفات پتاسیم	کود زیستی	1.2 mM Pi	5 mM
Pi				
وسعت آوند چوبی (μm)	۳۲/۲±۸/۵۱۵ a	۲±۳۲/۳۸۵ a	۱۸/۱±۶/۱۳۷ b	
				۱۸/۱±۶/۵۰۴b

نتایج بصورت $\bar{x} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

بررسی ساختار تشریحی مریستم راس ساقه

این مریستم در گیاه *آرابیدوپسیس* از نوع مریستم‌های تیپ برآمده یا گنبدی شکل است و نواحی زیر در آن قابل تشخیص است. ناحیه انتهایی مریستم شامل سه ردیف سلول منظم و مکعبی شکل است که تونیکا نام دارد. سلول‌های زیر تونیکا، کورپوس نام دارد که به صورت توده‌ای از سلول‌های کم و بیش کوچک و چند وجهی‌اند. در زیر ناحیه انتهایی و در پهلوه‌ای مریستم، یک منطقه فعال به نام حلقه بنیادی وجود دارد. حلقه بنیادی دارای سلول‌های ریزتر با هسته‌های درشت و حجیم است که نشانه تقسیم سلولی در آنهاست، بنابراین نسبت به سایر نواحی مریستم رنگ‌پذیری بیشتری دارند. ناحیه مریستم مغز که در زیر ناحیه انتهایی قرار دارد، دارای سلول‌های کم و بیش کشیده هستند. واکوئل در سلول‌های این منطقه گسترش زیادی دارد. رنگ‌پذیری کم، نشانگر فعالیت کم میتوزی این ناحیه است. با فعالیت این قسمت مغز ساقه ایجاد می‌شود. در اثر تقسیمات مماسی زیر تونیکا و شعاعی تونیکا محل تشکیل برگ جدید متورم می‌شود (I.f) اطراف مریستم راسی به وسیله طرح‌های اولیه برگ (E.F) احاطه شده است و در بخش‌هایی نوارهای پروکامبیومی (p.c) نیز قابل رویت هستند. در گیاهان شاهد (بدون فسفات پتاسیم) مریستم رویشی، شامل تونیکا با سه لایه و کورپوس و حلقه بنیادی، به طور مشخص در حال فعالیت مشاهده می‌شود که با فعالیت خود مولد برگ‌های متناوب است. مریستم مغز با سلول‌های واکوئلی در قسمت میانی مشخص هستند اما در گیاهان تحت تیمار با کود زیستی بارور ۲ سلول‌های تونیکا نسبت به گروه شاهد کوچک‌تر به نظر می‌رسند و نظمی در آرایش سلول‌های این لایه نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده نمی‌شود. ناحیه مربوط به مریستم مغز واکوئلی شده و ضریب نوکلئوسیتوپلاسمی در سلول‌های مغز این گروه نسبت به نمونه شاهد کمتر و هسته در مقایسه با کل سلول کوچک‌تر است. در گیاهان تحت تیمار با فسفات پتاسیم 1.2 mM مریستم حالت لایه لایه پیدا کرده است ناحیه مربوط به تونیکا و کورپوس از هم قابل تشخیص نیست منطقه مربوط به حلقه بنیادی در مقایسه با دو نمونه قبل تقلیل یافته است.



شکل ۲: بررسی تغییرات تشریحی مریستم رویشی *A. thaliana*. A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات

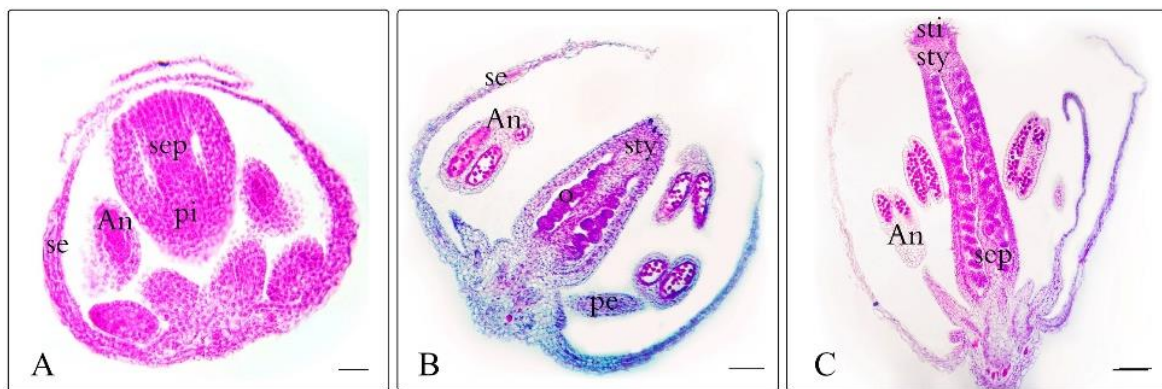
پتاسیم ۱.۲ mM، D: فسفات پتاسیم ۵ mM، T: تونیکا، C: کورپوس، Ir: حلقه بنیادی، m.m: مریستم مغز pc

، نوارهای پروکامبیومی، E.f: طرح اولیه برگ، O.E.F: طرح اولیه برگ قدیمی، مقیاس ۵۰µm.

ضریب نوکلئوسیتوپلاسمی در مقایسه با دو نمونه قبل افزایش یافته است. در گیاهان تحت تیمار با فسفات ۵mM مریستم تقریباً همگن است و تمام سلول‌ها شروع به فعالیت کرده است که در نتیجه لایه تونیکا ۴ لایه‌ای و مریستم در مقایسه با نمونه شاهد حجیم‌تر شده است (شکل ۲).

بررسی ساختار تشریحی تکوین تخمک

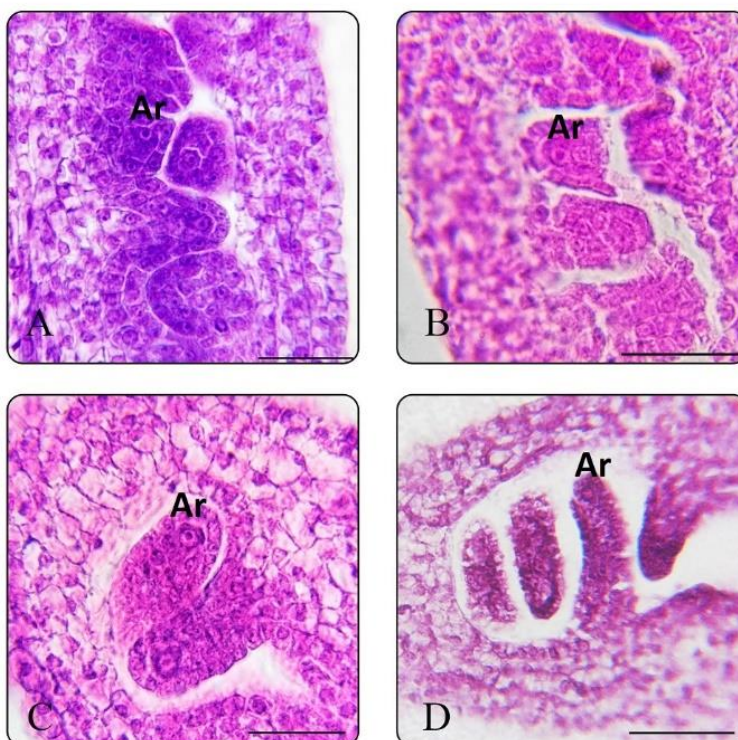
با تکوین پرچم‌ها، توده میانی مریستم هاگزا در جهت تشکیل مادگی تمایز می‌یابد. تخمدان در ابتدا تخم مرغی (شکل-A) و سپس به شکل کشیده در می‌آید (شکل-B). نهایتاً به سه بخش تخمدان، خامه و کلاله تمایز می‌یابد (شکل-C). تخمدان در گونه مورد بررسی به صورت فوقانی است، بدین صورت که مادگی بالاتر از نقطه اتصال گلبرگ و کاسبرگ‌ها قرار دارد (شکل-C) تخمدان دو خانه (دارای دو برچه) است که توسط تیغه کاذبی از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل-B, C). در هر خانه تخمدان، تخمک‌های زیادی چسبیده به محور میانی هستند که با پیشرفت تکوین آنها تعداد زیادی دانه در درون خانه‌های تخمدانی ظهور می‌کند.



شکل ۳: برش طولی گل *A. thaliana* تکوین تخمدانی (دو برچه با تیغه میانی بین آنها) **pi**: مادگی، **sep**: تیغه میانی،

se: کاسبرگ، **pe**: گلبرگ، **An**: پرچم، **o**: تخمک، مقیاس 50µm

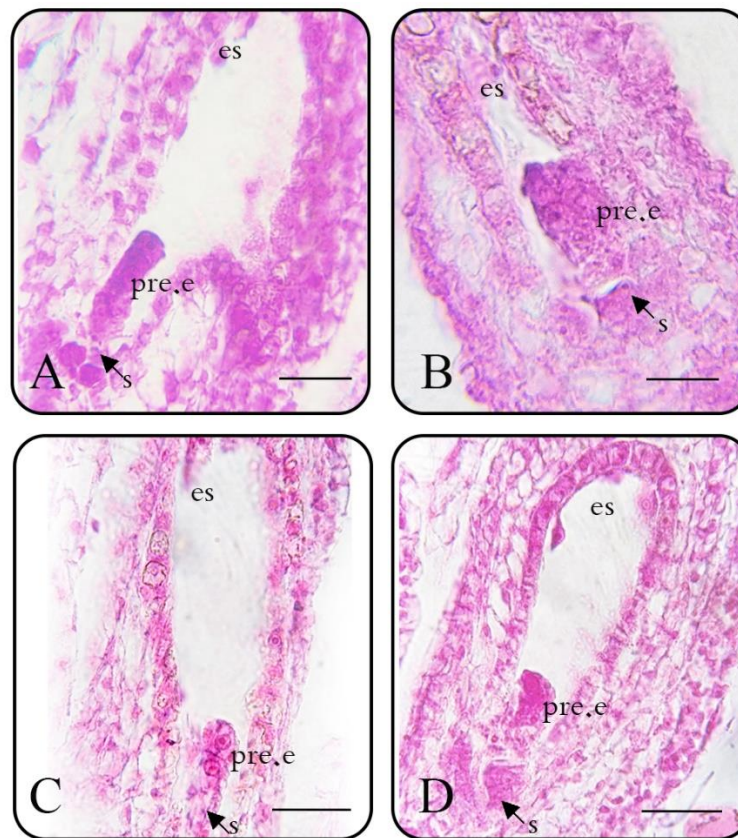
بنیان تخمکی به صورت برآمدگی کوچکی ابتدا در بخش کناری حفره تخمدان تشکیل شده و تمکن از نوع محوری است (شکل ۳-B). تخمک به صورت برجستگی کوچک کم و بیش کروی (پرموردیوم تخمک) در جدار تخمدان قبل از تکوین بخش‌های فوقانی تخمدان و تشکیل خامه و کلاله پدیدار می‌شود (شکل ۳-B). پرموردیوم تخمکی در گروه‌های تحت تیمار با کود زیستی و فسفات پتاسیم 5 mM و 1.2 Mm، نسبت به گروه شاهد که کوتاه‌تر و گنبدی شکل هستند، حالت طویل و کشیده‌تر (انگشتی مانند) دارند (شکل ۴).



شکل ۴: بررسی تغییرات تشریحی پرموردیوم تخمکی *A. thaliana*: شاهد, B: کود زیستی بارور ۲, C: فسفات پتاسیم 1.2, D: فسفات پتاسیم 5 mM, Ar: آرکئوسپور, مقیاس 50μm.

بررسی تشریحی پیش‌رویان

سلول تخم در امتداد محور راسی پایه‌ای طولی شده و به دنبال آن تقسیم نامتقارن رخ می‌دهد. پیش‌رویان و سوسپانسر حاصل تقسیم نامتقارن در سلول زیگوت هستند سلول کوچک‌تر، یعنی سلول راسی رویان و سلول بازال سوسپانسر را تولید می‌کند سلول‌های سوسپانسر به طور قابل ملاحظه‌ای واکوئلی هستند اما سلول‌های رویان با اندازه کوچک‌تر و سیتوپلاسم متراکم و بدون واکوئل از سوسپانسر قابل تشخیص اند (شکل ۵). تقسیمات پیش‌رویان در نمونه‌های تحت تیمار فسفات پتاسیم 5mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد نامنظم‌تراند. در پیش‌رویان نمونه شاهد سطح رویان کاملاً صاف است در حالی که در گروه‌های تحت تیمار به صورت نامنظم هستند (به ویژه در گیاهان تحت تیمار با 5mM). این سلول‌ها در گیاهان شاهد و 1.2 mM فسفات پتاسیم درشت‌تر و کاملاً مشخص هستند در حالیکه در نمونه‌های دیگر سلول‌ها کوچک‌تر شده و به راحتی قابل تفکیک و تمایز نیستند. هم چنین تعداد سلول‌های سوسپانسر (آویزه) با تقسیمات پری کلینال و آنتی کلینالی خود در گیاهان تیمار با کود زیستی و 5mM فسفات پتاسیم افزایش یافته‌اند که در مقایسه با نمونه شاهد پهن تر به نظر می‌رسد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی تغییرات تشریحی. پیش رویان در کیسه رویانی گیاه *A.thaliana*

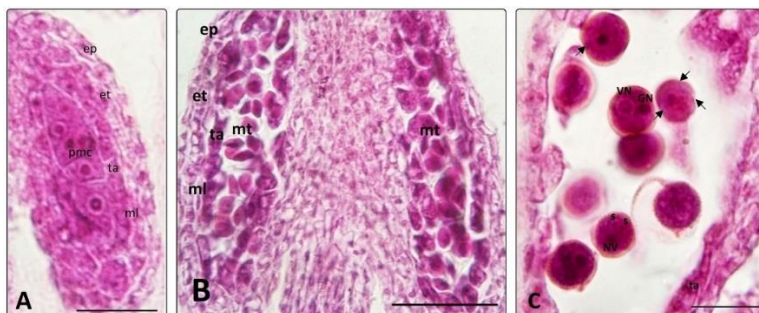
A: شاهد, B: کود زیستی بارور ۲, C: فسفات پتاسیم ۱.۲ mM, D: فسفات

پتاسیم ۵ mM, es: پیش‌رویان, pre.e: کیسه رویانی, s: آویزه, مقیاس ۵۰μm.

میکروسپورزایی و نمو دانه

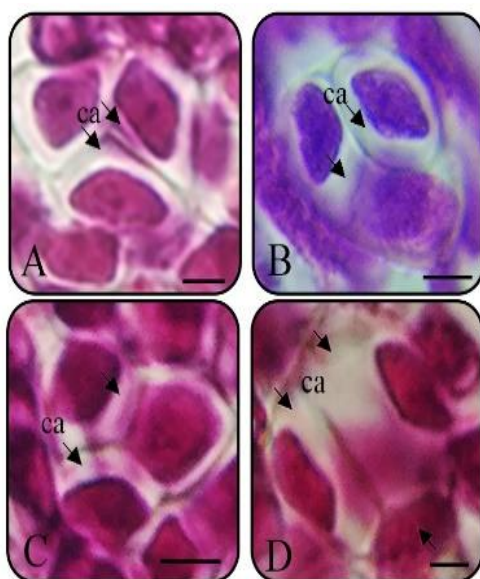
سلول‌های بافت هاگ‌زای به وجود آمده از سلول‌های آرکئوسپور به سلول‌های مادر گرده تمایز پیدا می‌یابند. سلول‌های مادر گرده با سیتوپلاسم متراکم، اندازه بزرگ و هسته‌های مشخص از سلول‌های بافت احاطه‌کننده متفاوت هستند (شکل ۶-۱). یاخته‌های مادر گرده با تقسیم میوزی تتراسپورها هاپلوئیدی را تولید می‌کنند. در اطراف میکروسپوروسیت‌ها با شروع میوز، کالوز شروع به تشکیل می‌کند که در تصاویر میکروسکوپی تهیه شده به صورت یک لایه ضخیم و شفاف در اطراف میکروسپوروسیت‌ها (شکل ۶-۲) و تترادها (آرایش تترادها میکروسپور در داخل دیواره کالوزی در گونه مورد بررسی از نوع تتراهدرا و به ندرت از نوع تتراکونال است) مشاهده می‌شود (شکل ۶-۲). گرده بالغ کروی و منفذدار با سه هسته (یک هسته رویشی و دو اسپرم) قابل رویت است (شکل ۶-۳).

در تکوین گامتوفیت نر، افزایش ضخامت دیواره مخصوص تترادها در نمونه تحت تیمار با 5 mM فسفات نسبت به نمونه‌های دیگر بسیار مشهود است (شکل ۷).



شکل ۶: بررسی میکروسپورزایی و نمو دانه گرده A: کیسه گرده حاوی سلول‌های مادر گرده، B: سلول‌های تترادی، C: دانه گرده بالغ، pmc: سلول مادر گرده، ep: اپیدرم، et: لایه مکانیکی، ml: لایه میانی، ta: لایه تاپی، mt: تترادهای میکروسپوری، VN: هسته رویشی دانه گرده، GN: هسته زایشی دانه گرده، S: اسپرم.

مقیاس 50µm.



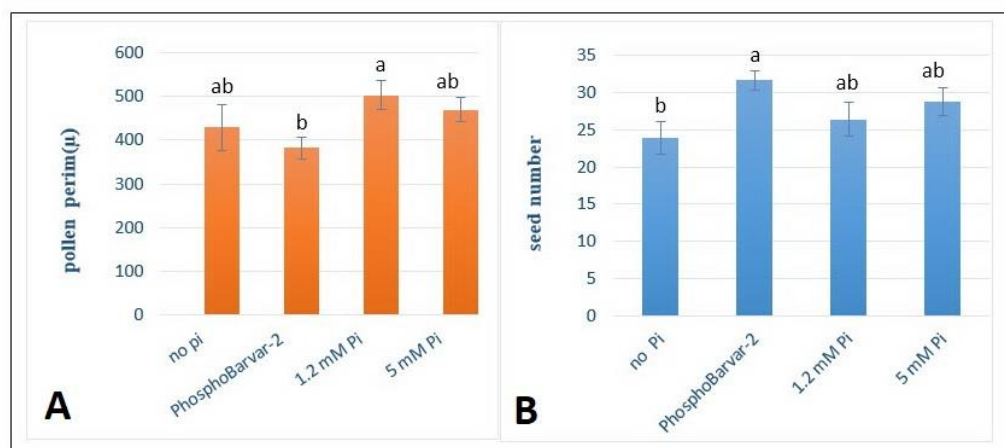
شکل ۷: بررسی ضخامت دیواره ویژه A: شاهد، B: کود زیستی بارور ۲، C: فسفات پتاسیم 1.2 mM، D: فسفات

پتاسی 5 mM، ca: لایه کالوز (دیواره ویژه)، مقیاس 10µm.

ویژگی ریخت‌شناسی

بررسی تشریحی دانه گرده و تعداد دانه

نتایج حاصل از بررسی‌های تشریحی دانه گرده نشان می‌دهد تنها بین دو گروه 1.2 mM فسفات و کود زیستی اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین محیط دانه گرده به نمونه‌های تیمار با 1.2 mM فسفات تعلق دارد (شکل A-۸) (جدول ۲). تعداد دانه‌های هر غلاف در نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان تیمار با کود زیستی است. و با نمونه‌های تیمار شده با فسفات پتاسیم اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل B-۸) (جدول ۲).



شکل ۸: نمودار تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر محیط دانه گرده (نمودار A) و تعداد دانه

گیاه (نمودار B) *A.thaliana*

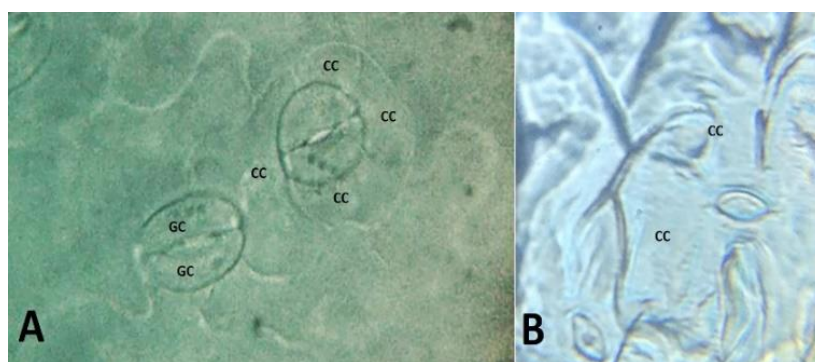
جدول ۲: مقایسه نتایج محیط دانه گرده و تعداد دانه در غلاف در گیاه آراییدوپسیس تالیانا

تیمار	بدون فسفات پتاسیم	کود زیستی	1.2 mM Pi	5mM Pi
محیط دانه گرده μm	۴۲۹/۵۲±۸۶۰/۵۱۷ ab	۳۸۱/۲۴±۶۸۳/۷۶۵ b	۵۰۳/۱۸۷ ۳۱±/۰۹۸ a	۴۶۹/۲۸±۲۶۹/۰۶۷ ab
تعداد دانه در غلاف	۲۳/۹۲ ۲±/۲۱۱ b	۳۱/۶۲ ۱±/۲۷۱ a	۲۶/۲±۳۹/۲۷۳ ab	۲۸/۱±۷۵/۹۱۳ ab

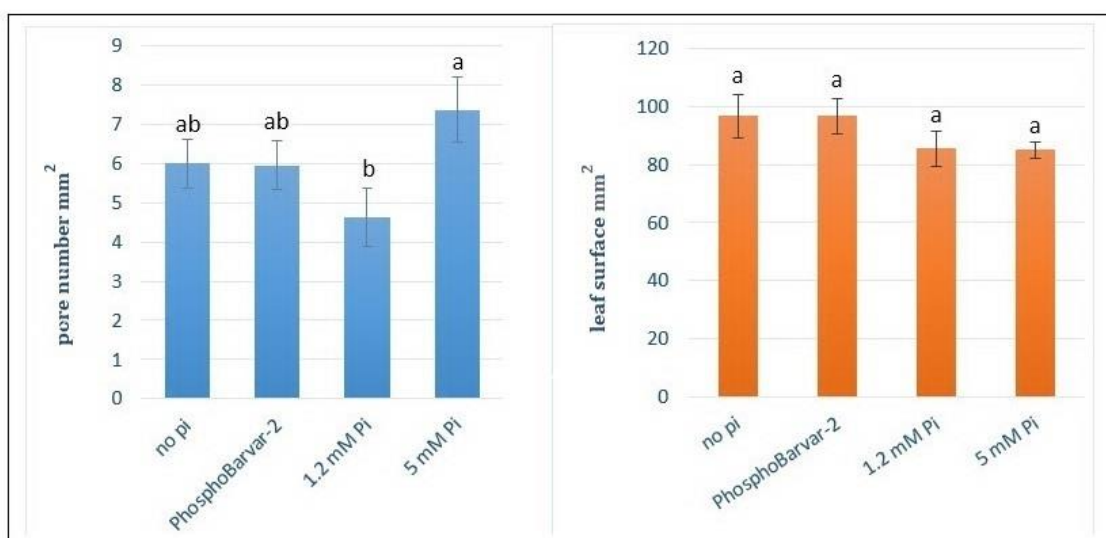
نتایج بصورت $\bar{x} \pm \text{SE}$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است

بررسی تعداد روزنه و سطح برگی

در گیاه *A.thaliana* سلول‌های همراه اطراف سلول‌های نگهبان اندازه متفاوتی دارند و از نوع آنیزوسیتیک هستند (شکل ۹- A,B) نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در غلظت‌های مختلف فسفات، میانگین تعداد روزنه، به طور معنی‌داری در نمونه‌های فسفات پتاسیم ۵mM بیش از نمونه‌های فسفات پتاسیم ۱.۲ mM است و با نمونه‌های دیگر آزمایش اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل A-۱۰) (جدول ۳). اما از لحاظ سطح برگی در گیاهان شاهد و سایر نمونه‌های تحت تیمار با کود زیستی و فسفات پتاسیم ۱.۲ mM و ۵ mM تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل B-۱۰) (جدول ۳).



شکل ۹: روزنه و سلول‌های اپیدرمی در گیاه *A.thaliana*



شکل ۱۰: نمودار تاثیر کود زیستی بارور ۲ و فسفات پتاسیم بر تراکم روزنه (نمودار A) و سطح برگی (نمودار B) گیاه

A.thaliana

جدول ۳: مقایسه نتایج تراکم روزنه و سطح برگ گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

تیمار	بدون فسفات پتاسیم	کود زیستی	1.2 mM Pi	5 mM Pi
تراکم روزنه (mm^2)	$0.6/623ab$	$5.0/9623ab$	$4.0/6741b$	$7.0/36823a$
سطح برگ (mm^2)	$96/76/264a$	$96/68/065a$	$85/55/097a$	$288/086a$

نتایج بصورت $\bar{x} \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است

بحث

در برش عرضی ساقه سلول‌های مکعب مستطیلی اپیدرم و سلول‌های پارانشیم پوستی با دیواره‌ی نازک در زیر آن حاکی از وجود ساختاری مشابه با سایر گیاهان دو لپه ای‌ها دارد و با پژوهش باقری ابیانه و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی گیاه شاهی (*Lepidium sativum*, L.) از این خانواده هم‌خوانی دارد. وجود آبکش دوطرفه در این گیاه که در انتقال و ترابری مواد آلی به تمام بخش‌های گیاه کمک زیادی می‌کند با پژوهش باقری ابیانه و همکاران (۱۳۹۶) بر روی گیاه شاهی هم‌سو نیست. سلول‌های مریستمی کامبیوم در گیاهان دولپه همیشه به صورت حلقه‌ای است اما همواره در استوانه آوندی حلقه‌ای کامل از چوب و آبکش به وجود نمی‌آید. در آرابیدوپسیس نیز کامبیوم فقط در ناحیه آوندی ایجاد این دو بافت هادی را می‌کند که با گزارش‌های باقری ابیانه و همکاران در سال ۱۳۹۶ بر روی گیاه شاهی (*Lepidium sativum*, L.) از این خانواده مطابقت دارد.

Zahid و همکاران (2015) گزارش دادند به دلیل ضرورت فسفات برای رشد گیاه، استفاده از کودهای فسفات برای تولید محصول ضروری است. با این حال در دسترس بودن فسفات برای گیاه، یک مسئله جدی است که به دلیل تثبیت و رسوب آن در خاک باعث کاهش کارایی فسفر اضافی می‌شود. Qureshi و همکاران (2012) نشان دادند که بیش از ۸۰ درصد فسفات به عنوان کود در حضور ترکیبات یونی در خاک (ترکیب با Ca^{+2} در خاک‌های آهکی، ترکیب با Fe^{+3} و Al^{+3} در خاک‌های اسیدی) از بین می‌رود. در تغذیه گیاه، نه تنها باید عناصر ضروری به اندازه کافی در دسترس گیاه قرار گیرند، بلکه تعادل در میان عناصر غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است (مجیدیان و همکاران، ۱۳۸۷). Chapin و همکاران (Chapin et al., 1988) بیان کردند ۵۰ تا ۹۰ درصد نیتروژن و فسفر گیاه در مرحله گل‌دهی از برگ‌ها و ساقه به سمت دانه حرکت می‌کنند. بنابر این اگر گیاه در مراحل اولیه رشد در جذب عناصر مغذی با محدودیت مواجه شود، به دلیل انتقال کم عناصر به دانه عملکرد و کیفیت محصول هر دو تحت تاثیر قرار می‌گیرد. میکروارگانیزم‌های خاک در طیف گسترده‌ای، طی فرایندهای زیستی باعث تبدیل مواد مغذی نامحلول خاک به مواد قابل

جذب می‌شوند (Babalola et al., 2012) و با پاسخ‌گویی به محیط‌های غیرزنده برای گیاهان بسیار حیاتی هستند در نتیجه باعث باروری خاک و پایداری محیط می‌شوند (Khan, 2016). کودهای بارور ۲ حاوی باکتری‌های مفید حل‌کننده فسفات است که با ترشح آنزیم‌های فسفاتاز و نیز اسیدی کردن خاک سبب رهاسازی یون فسفات از ترکیبات کم‌محلول فسفر می‌شود. این امر سبب افزایش قابلیت جذب فسفر توسط گیاهان می‌گردد (توحیدی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۲؛ ملبویی، ۱۳۸۶؛ Sharma et al., 2013).

مشاهدات بافت‌شناسی ساقه گیاه *راپیدوپسیس*، تراکم آوند چوبی در گیاهان تحت تیمار با کود زیستی و نمونه شاهد را نشان داد. که با گزارش کلاهی و همکاران (۱۳۹۶) در مورد بررسی ویژگی تشریحی گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) در پاسخ به نیترا پتاسیم که وسعت دستجات آوندی ساقه در نمونه‌های تیمار با پتاسیم ۱۵۰ کیلوگرم کود در هکتار کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد و نمونه تیمار با ۷۵ کیلوگرم کود در هکتار را داشته است هم‌خوانی دارد. به نظر می‌رسد در این پژوهش تغییرات تشریحی کاهش آوندی در گیاهان تیمار با فسفات پتاسیم بیانگر سازگاری تشریحی گیاه به افزایش فسفات خاک است. افزایش تراکم آوند چوبی در گیاهان تیمار شده با کود زیستی با توجه به فعالیت میکروارگانیسم‌ها و پایداری خاک، با یافته‌های Turk و همکار (Turk & Tawaha, 2002) بر روی گیاه *باقلا* در مورد افزایش سرعت نمو گیاهی به دلیل افزایش فسفر قابل دسترس هم‌سو است.

مطالعات، تاثیر فسفر در فرایندهای شیمیایی و واکنش‌های انتقال انرژی را نشان داده است (Miller et al., 2010; Ahmad et al., 2019; Mehra et al., 2019; Malhotra et al., 2018; et al., 2017). بخش مهمی از واحد انرژی (ATP) است که به رشد و بلوغ کمک می‌کند. رشد و افزایش لایه‌های تونیکا در مریستم رویشی گیاهان تیمار با فسفات پتاسیم 5mM با تحقیقات فوق هم‌سو است. زندگی گیاهان بین دو مرحله اسپوروفیتی (دیپلوئید) و گامتوفیتی (هاپلوئیدی) در چرخه است در آنژیوسپرم‌ها، اسپوروفیت گیاه گل‌دهنده و نسل برجسته‌تری نسبت به گامتوفیت‌ها است که تعداد سلول‌های محدود و محصور شده در بافت اسپوروفیتی می‌باشد (Pagnussat et al., 2005).

گیاهان گلدار دارای سلول‌های بنیادی تمایز نیافته در منطقه مریستمی است. بافت مریستمی قادر به رشد و تمایز تشکیل بافت‌ها و اندام‌های رویشی است و در نهایت باعث تولید اندام‌های تولیدمثلی حاوی سلول‌های اسپوروژن دیپلوئید می‌شوند (Hony, 2006). تجزیه و تحلیل نشان داده که هنگام مطالعه بساک گیاهان گلدار مجموعه‌ای از مشکلات جنین‌شناسی حل نشده، مربوط به شروع میکروسپورانژ و زمان تمایز آرکتوسپور است (Shamrov et al., 2020). مطالعه تکوین گل در گیاهان گلدار از اهمیت بسیاری برخوردار است چرا که، رویانزایی به دلیل ایجاد سازمان اولیه گیاه اسپوروفیت، یک مرحله مهم از زندگی گیاه محسوب می‌شود (Mayer et al., 1993). رحمانی و همکاران (۱۳۹۸) با مطالعه بر تاثیر فسفر بر گلدهی گل *آهار* (*Zinnia sp*) گزارش کردند کمبود

فسفر نه تنها به شدت در میزان رشد تاثیر دارد، بلکه روی تشکیل میوه و دانه و کیفیت آن‌ها نیز بسیار موثر است. فسفر می‌تواند بر کمیت و کیفیت دانه بسیار موثر واقع شود. نتایج پژوهش حاضر با گزارش رحمانی در رابطه با تاثیر فسفات بر تکوین گل، هم‌سو می‌باشد. تقسیم سلولی و رشد بیشتر پیش‌روی و سوسپانسون در گیاهان تحت تیمار با فسفات 5mM و گیاهان تحت تیمار با کود زیستی و نیز افزایش تقسیم سلولی در پرموردیم تخمکی در گیاهان تیمار شده با فسفات پتاسیم و کود زیستی و هم‌چنین افزایش ضخامت دیواره ویژه (کالوز) در اطراف تترامیکروسپورها در گیاهان تیمار شده با فسفات 5 mM ناشی از اثرات فسفات قابل دسترس برای گیاه است.

برخی محققین بیان داشته‌اند که تلقیح بذر با باکتری‌های حل‌کننده فسفر، می‌تواند فسفر تثبیت‌شده در خاک را حل کرده و به فرم فسفر قابل مصرف درآورد که در نتیجه، عملکرد محصول افزایش می‌یابد (Puente *et al.*, 2004; Tilak *et al.*, 2005;). به نظر می‌رسد افزایش رشد گیاه نه تنها به محلول‌سازی Pi بلکه به سایر صفات PGP، مانند تولید indole-3-acetic acid (IAA) نیز مربوط است (Pereira & Castro, 2014; Zahid, 2015). نتایج افزایش تعداد دانه در غلاف گیاهان تیمار با کود زیستی با نتایج افزایش تعداد دانه در گیاه آفتابگردان توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات توسط اکین (Ekin, 2010) مطابقت دارد.

پاسخ روزه‌ها به تغییرات محیطی و هدایت روزه‌ای آن‌ها به صفاتی همچون قطر روزه، تراکم روزه، شاخص روزه، اندازه سلول‌های محافظ و منافذ روزه و سطح برگ مربوط است. در میان این صفات تراکم روزه از مهمترین پارامترهای اکوفیزیولوژیکی است که بر تبادلات گازی بین گیاه و اتمسفر مؤثر است (Lake *et al.*, 2001; Uprety *et al.*, 2002). محققین نشان داده‌اند که صفات تشریحی گیاهان مانند تراکم روزه، تراکم سلول‌های اپیدرمی و طول روزه تحت تاثیر عوامل محیطی از جمله دما (Pandey *et al.*, 2007)، شدت نور (Lake *et al.*, 2001) کیفیت نور (Liu-Gitz *et al.*, 2000)، اشعه UV (Kakani *et al.*, 2003)، سیگنال‌های خشکی (مجد و همکاران، ۱۳۸۵)، سطوح مختلف CO₂ (Das, 2003) تغییر می‌کنند. مقایسه تعداد روزه در گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را در تعداد روزه در سطح برگ فسفات پتاسیم 1.2 mM و 5 mM نشان می‌دهد. بیشترین تراکم روزه مربوط به گیاهان تیمار شده با فسفات پتاسیم 5 mM است. نتایج این پژوهش با مطالعات Kohan و همکاران (2021) که افزایش معنی‌دار تراکم روزه های گیاهان کاهو در معرض آلودگی هوا (ناشی از دود آگروز ماشین) را گزارش دادند مطابقت دارد. پیشنهاد می‌شود ممکن است این تغییرات یک انطباق و سازگاری با غلظت بالای فسفات در خاک باشد.

اسدی و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند جذب عناصر مغذی در هریک از مراحل رشد گیاه متفاوت است از این رو مصرف کودهای شیمیایی چه کمتر و چه بیشتر از نیاز واقعی، هر دو منجر به کاهش عملکرد و آلوده نمودن محیط زیست می‌شوند. یکی از

مدیریت‌های صحیح مصرف کودهای شیمیایی تشخیص مراحل مختلف رشد گیاه و تعیین الگوی جذب آن مطابق با مراحل رشد است.

نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که یکی از روش‌های بهینه‌سازی مصرف کودهای فسفاته برای جبران محدودیت فسفر خاک، کودهای زیستی فسفاته است. کود زیستی بارور ۲ از طریق فرایندهایی حلالیت ترکیبات فسفر رسوب کرده در خاک را افزایش داده و بدین طریق بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه تامین می‌گردد. در این پژوهش کاربرد کود زیستی، باعث بهبود قابل ملاحظه رشد و نمو در گیاه *رایدوپسیس* در مقایسه با گیاهان شاهد گردید به طوری که بیشترین تعداد دانه و رشد و نمو در پیش رویان و پریموردیم تخمکی از این تیمار به دست آمده و با گیاهان تحت تیمار فسفات پتاسیم قابل مقایسه است. لذا می‌توان به عنوان کود مناسب برای کشت گیاه در جهت تولید ارگانیک و حفظ محیط زیست توصیه شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این پژوهش از بخش تحقیقات و فناوری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران و گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی جهت همکاری و پشتیبانی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- اسدی، ف. خادمی، ز. ۱۳۹۲. تغییرات غلظت عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم در اندام‌های مختلف گیاه ذرت طی مراحل مختلف رشد. مجله پژوهش‌های خاک. جلد ۲۷، شماره ۴
- باقری‌ایبانه، الف. مجد، الف. جعفری، سایه. ۱۳۹۶. بررسی ساختمان تشریحی تکوینی اندام‌های رویشی و زایشی در گیاه شاهی (*Lepidium sativum* L.). فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران. جلد ۱۲، شماره ۱. ۹-۱۵

توحیدی‌نیا، م. ع. د. مظاهری، س. م. ب. حسینی، و. مدنی، ح. ۱۳۹۲. اثر مصرف توام کود زیستی بارور-۲ و کود شیمیایی فسفر بر عملکرد دانه و اجزای عملکرد ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴. مجله علوم زراعی ایران جلد ۱۵، شماره ۴. صفحه ۳۱۲-۳۲۴

جعفری، س. شریف‌نیا، ف. پیوندی، م. نیکنام، ف. ۱۳۹۰. بررسی ساختار تشریحی اندام‌های رویشی گیاه عناب *Zizyphus jujuba*، فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی تکوینی، سال سوم، شماره ۱۰

رحمانی، ف. محمدی، الف. ع. مرادی، ح. ۱۳۹۸. مطالعه تاثیر فسفر بر گلدهی و برخی صفات رویشی گل آهار (*Zinnia sp*) در محیط حاوی ورمی کمپوست. نشریه علمی گل و گیاهان زینتی، جلد ۴، شماره ۱. صفحه ۱۳-۲۵

کلاهی، م. موسوی، س. حاج شریفی، ح. مساواتی، م. شیخ رضایی، م. ح. صفار، الف. کرد زنگنه، ع. ۱۳۹۶. بررسی ویژگی های تشریحی، عملکردی گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) و میزان پتاسیم خاک در پاسخ به نیترات پتاسیم. فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی تکوینی. سال نهم، شماره ۲

مجدد، الف. جعفری یزدی، الف. فلاحیان، ف. الف. خاوری نژاد، ر. ع. برنارد، ف. جاویدفر، ف. ۱۳۸۵. اثر تنش خشکی و آبسیزیک اسید بیرونی بر تکوین گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). ویژه نامه زیست شناسی. دوره ۱۶، شماره ۶۲. صفحه ۱-۱۱

مجیدیان، م. الف. فلاوند، ع. الف. کامکار حقیقی، ن. کریمیان. ۱۳۸۷. تاثیر تنش خشکی، کود نیتروژن و کود آلی بر قرائت کلروفیل، عملکرد دانه و اجزای عملکرد ذرت دانه‌ای رقم سنجل کراس ۷۰۴. مجله علوم زراعی ایران. جلد ۱۰، شماره ۳. صفحه ۳۳۰-۳۰۳

ملبویی، م. ع. ۱۳۸۶. ویژگیهای کود زیستی فسفات بارور ۲. جهاد دانشگاهی، زیست فناوری سبز، ۱۰۴ صفحه

Abbasi, M., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T., and Aslam, M. (2011). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*, 145(1), 159-168.

Afzal, A., Ashraf, M., Asad, S. A., and Farooq, M. (2005). Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) in rainfed area. *Int. J. Agric. Biol*, 7(2), 207-209.

- Ahmad, H., Sajjid, M., Hayat, S., Ullah, R., Ali, M., Jamal, A., Ali, J. (2017). Growth, Yield and Fruit Quality of Strawberry (*Fragaria ananasa* Dutch) under Different Phosphorus Levels. Research in Agriculture, 2.
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., and Abdelmoneim, T. S (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi journal of biological sciences, 20(1), 57-61.
- Amtmann, A., Hammond, J. P., Armengaud, P., and White, P. J. (2005). Nutrient sensing and signalling in plants: potassium and phosphorus. Advances in Botanical Research, 43, 209-257.
- Babalola, O. O., and Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. J. Food Agric. Environ, 10(3 and 4), 540-549.
- Betencourt, E., Duputel, M., Colomb, B., Desclaux, D., and Hinsinger, P. (2012). Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. Soil Biology and Biochemistry, 46, 181-190.
- Chapin I, F. S., and Wardlaw, I. F. (1988). Effect of phosphorus deficiency on source-sink interactions between the flag leaf and developing grain in barley. Journal of Experimental Botany, 39(2), 165-177.
- Ciereszko, I., Balwicka, H., and Żebrowska, E. (2017). Acid phosphatases activity and growth of barley, oat, rye and wheat plants as affected by Pi deficiency. The Open Plant Science Journal, 10(1)
- Cotter, M. (2005). Care of *Arabidopsis thaliana* at the Center for Plant Lipid Research. Denton: University of North Texas.
- Das, R. (2003). Characterization of responses of Brassica cultivars to elevated CO₂ under moisture stress condition (Doctoral dissertation, Indian Agricultural Research Institute; New Delhi).
- Ekin, Z. (2010). Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. African Journal of Biotechnology, 9(25), 3794-3800.

- El-Sayed, W. S., Akhkha, A., El-Naggar, M. Y., and Elbadry, M. (2014). In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers in microbiology*, 5, 651
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., and Etoa, F. X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5(24).
- Franzke, A., German, D., Al-Shehbaz, I. A., and Mummenhoff, K. (2009). *Arabidopsis* family ties: molecular phylogeny and age estimates in Brassicaceae. *Taxon*, 58(2), 425-437.
- Gitz III, D. C., Liu-Gitz, L., Britz, S. J., and Sullivan, J. H. (2005). Ultraviolet-B effects on stomatal density, water-use efficiency, and stable carbon isotope discrimination in four glasshouse-grown soybean (*Glycine max*) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 343-355.
- Hakeem, K. R., Rehman, R. U., and Tahir, I. (2014). *Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk*: Springer.
- Honys, D., Reňák, D., and Twell, D. (2006). Male gametophyte development and function. *Plant Biotechnol*, 1, 209-22. 4.
- Iqbal Hussain, M., Naeem Asghar, H., Javed Akhtar, M., and Arshad, M. (2013). Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil and Environment*, 32(1).
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Zhao, D., and Sailaja, K. (2003). Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and forest meteorology*, 120(1-4), 191-218.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*.
- Khan, Z., Rho, H., Firrincieli, A., Hung, S. H., Luna, V., Masciarelli, O., and Doty, S. L. (2016). Growth enhancement and drought tolerance of hybrid poplar upon inoculation with endophyte consortia. *Current Plant Biology*, 6, 38-47.

- Kohan, A., Haghighi, M., Mirghaffari, N., & Ehtemam, M. H. (2021). Effect of air pollution resulting from exhaust emission on the morphological, physiologic and biochemical responses of lettuce (*Lactuca sativa* var. *longifolia* Journal of Plant Process and Function, Vol. 9, No. 4.
- Kumar, A., Singh, V. K., Tripathi, V., Singh, P. P., and Singh, A. K. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): perspective in agriculture under biotic and abiotic stress. In *Crop improvement through microbial biotechnology*, 333-342: Elsevier.
- Lake, J. A., Quick, W., Beerling, D. J., and Woodward, F. I. (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411(6834), 154-154.
- Latati, M., Bargaz, A., Belarbi, B., Lazali, M., Benlahrech, S., Tellah, S., Ounane, S. M. (2016). The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *European journal of agronomy*, 72, 80-90.
- Liu-Gitz, L., Britz, S. J., & Wergin, W. P. (2000). Blue light inhibits stomatal development in soybean isolines containing kaempferol-3-O-2G-glycosyl-gentiobioside (K9), a unique flavonoid glycoside. *Plant, Cell & Environment*, 23(8), 883-891.
- Ma, X., Wang, Q., Rossi, L., and Zhang, W. (2016). Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental science and technology*, 50(13), 6793-6802.
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 250-258.
- Malhotra, H., Sharma, S., and Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In *Plant nutrients and abiotic stress tolerance* 171-190: Springer.
- Mayer, U., Buttner, G., and Jurgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development*, 117(1), 149-162.
- Mehra, P., Pandey, B. K., Verma, L., and Giri, J. (2019). A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase improves phosphate deficiency tolerance in rice. *Plant, cell and environment*, 42(4), 1167-1179.

- Mehta, P., Walia, A., Kulshrestha, S., Chauhan, A., and Shirkot, C. K. (2015). Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *Journal of basic microbiology*, 55(1), 33-44.
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., and O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology reports*, 2(3), 403-411.
- Minorsky, P. V. (2008). On the Inside. *Plant Physiology*, 148(2), 671.
- Mishra, N., and Sundari, S. K. (2013). Native PGPMs as bioinoculants to promote plant growth: response to PGPM inoculation in principal grain and pulse crops. *International Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 4(10), 1055-1064.
- Morgan, J., Bending, G., and White, P. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.
- Page, D. R., and Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 124-136.
- Pagnussat, G. C., Yu, H.-J., Ngo, Q. A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C. S., Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development*, 132(3), 603-614.
- Pandey, R., Chacko, P. M., Choudhary, M., Prasad, K., and Pal, M. (2007). Higher than optimum temperature under CO₂ enrichment influences stomata anatomical characters in rose (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae*, 113(1), 74-81.
- Panhwar, Q., Radziah, O., Zaharah, A., Sariah, M., and Razi, I. M. (2011). Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. *Journal of environmental biology*, 32(5), 607.
- Pereira, S. I., and Castro, P. M. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological engineering*, 73, 526-535.

- Péret, B., Clément, M., Nussaume, L., and Desnos, T. (2011). Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in plant science*, 16(8), 442-450.
- Puente, M., Bashan, Y., Li, C., and Lebsky, V. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(5), 629-642.
- Qureshi, M., Ahmad, Z., Akhtar, N., Iqbal, A., Mujeeb, F., and Shakir, M. (2012). Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *J. Anim. Plant Sci*, 22(1), 204-210.
- Scheible, W.-R., and Rojas-Triana, M. (2015). Sensing, Signalling, And Control Of Phosphate Starvation In Plants: Molecular Players And Applications. *Annual Plant Reviews, Phosphorus Metabolism in Plants*, 48, 25.
- Shamrov, I. I., Anisimova, G. M., and Babro, A. A. (2020). Early stages of anther development in flowering plants. *Botanica Pacifica: a Journal of Plant Science and Conservation*, 9(2), 3-12.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 1-14.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.
- Song, Y., Marschner, P., Li, L., Bao, X., Sun, J., and Zhang, F. (2007). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 44(2), 307-314.
- Sukriti, G., Srishti, D., Kriti, S., Nikhita, A., and Sundari, S. (2014). Investigating the role of PGPM in assisting plant growth under stress caused by organophosphate pesticide-phorate. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4. (3).

- Sun, Y. M., Zhang, N. N., Wang, E. T., Yuan, H. L., Yang, J. S., and Chen, W. X. (2009). Influence of intercropping and intercropping plus rhizobial inoculation on microbial activity and community composition in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Siberian wild rye (*Elymus sibiricus* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 70(2), 218-226.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, K., De, R., Saxena, A., Nautiyal, C. S., Johri, B. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 136-150.
- Turk, M. A., and Tawaha, A.-R. M. (2002). Impact of seeding rate, seeding date, rate and method of phosphorus application in faba bean (*Vicia faba* L. minor) in the absence of moisture stress. *BASE*.
- Upreti, D., Dwivedi, N., Jain, V., and Mohan, R. (2002). Effect of elevated carbon dioxide concentration on the stomatal parameters of rice cultivars. *Photosynthetica*, 40(2), 315-319.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.-H., Peix, A. (2017). The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In *Probiotics and plant health* 41-70: Springer.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Yadav, J., Verma, J. P., Jaiswal, D. K., and Kumar, A. (2014). Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological engineering*, 62, 123-128.
- Yeung, E. C. (1984). Histological and histochemical staining procedures. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 1, 689-697.
- Zahid, M. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in microbiology*, 6, 207.
- Zhang, Z., Liao, H., and Lucas, W. J. (2014) Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 192-220.

Zhu, H.-J., Sun, L.-F., Zhang, Y.-F., Zhang, X.-L., and Qiao, J.-J. (2012). Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7. *Bioresource Technology*, 111, 410-416.

The effect of fertile biofertilizer 2 and potassium phosphate on the development of vegetative and reproductive organs of *Arabidopsis thaliana* L.

E. Basiri¹, S. Jafari Marandi², S. Arbabian³, A. Majd⁴, M.A. Malboob⁵

Received: 2021.4.24

Accepted: 2021.7.19

Abstract

Phosphate fixation by chemical fertilizers, in addition to being costly, carries environmental risks. Today, fertile phosphate biofertilizer 2 contains two types of phosphate-solubilizing bacteria, decomposes insoluble phosphorus compounds and thus absorbable for the plant. The aim of this study was to evaluate the effect of fertile biofertilizers 2 *Pseudomonas putida* (Strain P13) and *Pantoea agglomerans* (Strain P5) (only once at the beginning of the growing season) and potassium phosphate in three concentrations (0, 1.2 mM, 5 mM) (Until the end of the growing season, once a week with irrigation) on some developmental characteristics of *Arabidopsis thaliana* in greenhouse conditions, 15 hours of light, temperature 25 ° C, light intensity of 6000 lux was done in a randomized design. After cell-histology, slides were observed under a light microscope. The results showed a significant reduction in wood vascular density in the stems of plants treated with 5 mM and 1.2 mM potassium phosphate compared to the other two treatments. Also, 5 mM potassium phosphate increased the tunica layers and the special wall thickness of the tetrads. Cell proliferation of ovule primordium, pre-embryo, and suspensor was observed in plants treated with biofertilizer and 5 mM phosphate. Treatment with biofertilizer showed the highest average number of seeds produced. The application of fertile biofertilizer 2 in this experiment, with effects similar to potassium phosphate, increased the quantitative and qualitative yield of *Arabidopsis*. Biofertilizer can be effective as a safe alternative to increase soil productivity and plant growth in sustainable agriculture and minimize environmental pollution.

Keywords: anatomical structure, microbacteria, ovule primordium, pre-embryo, vegetative meristem.

¹. PhD student, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

². Associate professors: Iran, Tehran, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Faculty of Life Sciences. *Corresponding Author's Email: (s.jafari@iau-tnb.ac.ir)

³. Associate Professor, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

⁴. Professor, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Branch of Tehran, Iran

⁵. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.

کاربرد اسید هیومیک روی بهبود رشد رویشی و زایشی پسته رقم اکبری

(*Pistacia vera* var. Akbari)

زهرا پاک‌کیش^۱، هادی اصغری^۲، سهیلا محمدرضاخانی^{۳*}

چکیده

در این تحقیق تاثیر اسید هیومیک با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت اسپری برگ، در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از تمام گل (۱۲ فروردین ماه و ۲۷ فروردین ماه)، روی درختان پسته رقم اکبری بررسی شد. نتایج نشان دادند که بیشترین میزان سطح برگ، طول و قطر شاخه مربوط به درختان پسته که با اسید هیومیک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۳۰ روز بعد از مرحله تمام گل، مشاهده گردیده است. کمترین درصد پوکی در میوه‌های تیمار شده با اسید هیومیک ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شده است. بطوریکه بیشترین وزن خوشه و تعداد میوه در خوشه در درختان تیمار شده با اسید هیومیک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دیده شده است. افزایش میزان عملکرد و وزن میوه در هر دو زمان تیماردهی، با زیاد شدن غلظت اسید هیومیک تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده است. درصد میوه بدشکل در میوه‌های شاهد در هر دو مرحله از محلولپاشی، نسبت به میوه‌های تیمار شده با اسید هیومیک افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: اسید هیومیک، پسته، عملکرد،

۱. دانشیار، بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان، کرمان، ایران

۳. دانشجوی سابق دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، آذربایجان شرقی، ایران نویسنده مسئول: * Smohammadrezakhani@yahoo.com

مقدمه

پسته گیاهی نیمه‌گرمسیری از خانواده آناکاردیاسه است که دارای ویژگی‌های بالقوه‌ای از نظر سازگاری با شرایط نامساعد محیطی است (Panahi et al., 2001).

استفاده از انواع کودهای طبیعی، از جمله اسید هیومیک، بدون اثر مخرب زیست محیطی جهت بالا بردن عملکرد می‌تواند مثمر ثمر واقع شود. از اسید هیومیک به عنوان کود آلی دوست‌دار طبیعت نیز نام برده می‌شود (Samavat & Malakuti, 2005). مواد هیومیکی شامل مخلوطی از ترکیبات آلی مختلف هستند که از باقیمانده گیاهان و حیوانات حاصل می‌شوند (Liu & Cooper, 2000).

هیومیک اسید یک محصول تجاری است که بسیاری از مواد مغذی شامل ۴۴-۵۸ درصد کربن، ۴۲-۴۶ درصد اکسیژن، ۶-۸ درصد هیدروژن و ۴-۰/۵ درصد نیتروژن و همچنین بسیاری از عناصر دیگر جهت بهبودی رشد گیاه را داراست (El-Bassiony et al., 2010).

اسید هیومیک ترکیب پلیمری طبیعی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره بوجود می‌آید که ممکن است برای افزایش محصول و کیفیت آن به کار گرفته شود. از مزایای مهم اسید هیومیک کلات‌کنندگی عناصر غذایی مختلف مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، روی، کلسیم، آهن و مس برای غلبه بر کمبود عناصر غذایی است که افزایش طول، وزن ریشه و ایجاد ریشه‌های جانبی را سبب می‌شود (Abedi & Pakniat, 2010).

اثر غیر مستقیم اسید هیومیک به اثر آن بر افزایش جذب عناصر غذایی از راه ویژگی کلات‌کنندگی و احیاکنندگی و حفظ نفوذپذیری غشاء برمی‌گردد (Chen & Aviad, 1990). تحقیقات نشان می‌دهند که مواد هیومیکی از طریق اثرات بیوشیمیایی و شبه هورمونی که دارند عامل افزایش جذب عناصر توسط گیاهان می‌شوند (Dursun et al., 2002).

کودهای آلی علاوه بر نقش مثبتی که در اصلاح فیزیکی خاک از جمله افزایش خلل و فرج خاک، افزایش قدرت نگهداری آب توسط خاک و تنظیم رطوبت، افزایش رشد ریشه، افزایش عوامل ماکرو و میکرو بیولوژی خاک و در نتیجه بهبود خواص بیولوژی و بیوشیمیایی خاک به دلیل فعالیت موجودات زنده در قشر زراعی خاک بازی می‌کنند، بر بهبود شیمیایی خاک هم اثرگذار هستند و باعث افزایش مواد آلی و معدنی خاک می‌شوند و موجبات بهبود وضعیت تغذیه گیاه و ازدیاد محصول را فراهم می‌سازند (Castagno et al., 2008).

کاربرد برگی اسید هیومیک منجر می‌شود که مولکول‌های اسید هیومیک با مولکول‌های آب پیوندی تشکیل می‌دهند که تا حدود زیادی مانع تبخیر آب می‌شود. همچنین مولکول‌های فولیک اسید (بخش ریز مولکول اسید هیومیک) به درون بافت‌های گیاهی نفوذ می‌کند و با پیوند شدن به مولکول‌های آب تعریق گیاه را کاهش داده و به حفظ آب درون گیاه کمک می‌کند (Tourfi & Shokuhfar, 2019).

کاربرد برگی و خاکی اسید هیومیک با غلظت ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر در گیاه فلفل با افزایش میانگین وزن میوه، عملکرد کل را افزایش داد (Karakurt et al., 2009).

اسید هیومیک قابلیت تولید گیاه و حاصل‌خیزی خاک را با افزایش جذب عناصر غذایی مورد نیاز از طریق تشکیل کلات‌های عناصر کم‌مصرف و در نتیجه افزایش قابلیت دسترسی زیستی آن‌ها و افزایش رشد گیاه و به دنبال آن افزایش سیستم ریشه و ترشحات آن، افزایش می‌دهد. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که در ترکیبات هیومیکی خصوصیت تحریک‌کننده رشد وجود دارد (Khaled & Fawy, 2011). اسید هیومیک بطور مستقیم روی رشد گیاه، تنفس، فتوسنتز و طول شدن سلول‌ها تاثیر دارد (Nardi et al., 2002). اسید هیومیک منبع مهمی از نیتروژن، فسفر و پتاسیم در گیاهان است (Panuccio et al., 2001).

اسید هیومیک باعث افزایش پایداری در غشای سلولی، جذب اکسیژن و طول شدن ریشه‌ها در گیاهان می‌شود. اسید هیومیک باعث اثرات تحریکی روی سنتز سایتوکینین و اکسیژن یا شبه‌جیبرلین‌ها (Zhang & Ervin, 2004) و بطور غیرمستقیم روی متابولیسم گیاهان تاثیر دارد (Pizzeghello et al., 2001).

اسید هیومیک نه تنها رشد رویشی بلکه عملکرد و کیفیت گیاهان را افزایش داده است. کاربرد اسید هیومیک در انگور بصورت محلول‌پاشی با میزان ۰،۲۰، ۱۰ و ۳۰ کیلوگرم در هکتار بطور معنی‌داری عملکرد را افزایش داده است (Cangi et al., 2006).

در توت فرنگی رقم کاماروسا وزن خشک و تر در ریشه و شاخساره‌ها، تعداد گل، طول شاخه‌ها، سطح برگ و تعداد میوه را افزایش داده است (Rafeii & Pakkish, 2014). همچنین بررسی کاربرد کود آلی و محلول‌پاشی اسید هیومیک بر عملکرد کمی و کیفی گیاه همیشه بهار نشان داد که کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک سبب افزایش ارتفاع، عملکرد تازه گل، تعداد گل در بوته، عملکرد دانه، عملکرد گلبرگ، وزن هزار دانه نسبت به شاهد گردید (Abedini et al., 2015).

هدف اصلی باغداران از کشت و پرورش درختان میوه، تولید میوه‌ای با کیفیت همراه با افزایش میزان تولید و عملکرد با حداقل هزینه است. پسته به دلیل ارزش تغذیه‌ای و جایگاه جهانی که دارد، به میزان چشمگیری باغداران در صدد افزایش عملکرد و کیفیت محصول آن هستند. بنابراین با توجه به سطح زیر کشت و افزایش تولید پسته، هدف از انجام این پژوهش، استفاده از مواد آلی مانند اسید هیومیک به منظور افزایش ویژگی‌های رویشی و زایشی پسته رقم اکبری بوده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۸-۱۳۹۷ در یک باغ تجاری، واقع در ۷۰ کیلومتری مرکز استان کرمان در حومه شهرستان رباط به مرحله اجرا در آمد. پژوهش بر روی درختان ۲۰ ساله پسته رقم اکبری انجام گردید. درختان در سال پربار بودند. نوع خاک در این باغ، شنی لومی و آبیاری هر ۱۰ روز یکبار صورت گرفته است.

معرفی تیمارها

تیمارها شامل اسید هیومیک جامد (CAS NO: 1415-93-6, EC NO: 215-809-6) (Humic acid- technical- Sigma-Aldrich) با غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و محلول‌پاشی در دو مرحله زمانی (۱-۳۰ روز بعد از تمام گل (۱۲ فروردین) و ۲-۴۵ روز بعد از تمام گل (۲۷ فروردین) صورت گرفت. به منظور دقت بیشتر و به حداقل رساندن خطا، حتی الامکان درختانی که از نظر قدرت رشد و اندازه یکنواخت بودند، انتخاب شدند. سپس ویژگی‌هایی نظیر سطح برگ، شاخص کلروفیل، طول و قطر شاخه سال جاری، درصد پوکی، خندانی، درصد میوه‌های بدشکل، وزن میوه، تعداد میوه در خوشه، وزن خوشه و عملکرد بررسی شدند.

سطح برگ: بدین منظور از هر تکرار در هر تیمار به طور تصادفی ۱۰ برگ از ارتفاع وسط درخت و اطراف آن جمع‌آوری و سطح برگ‌ها توسط دستگاه سطح برگ‌سنج دیجیتالی (Leaf Area Meter Digitali) اندازه‌گیری و میانگین برای هر نمونه محاسبه شد.

شاخص کلروفیل برگ: بدین منظور از هر تکرار در هر تیمار به طور تصادفی ۱۰ برگ از ارتفاع وسط درخت و اطراف آن جمع‌آوری شد و میزان شاخص کلروفیل برگ‌ها توسط دستگاه SPAD اندازه‌گیری و میانگین برای هر نمونه محاسبه شد.

طول و قطر شاخه سال جاری: در اواسط پاییز که کل برگ‌های درختان ریزش کرده بودند و درخت هیچ رشدی نداشت با استفاده از دستگاه کولیس دیجیتال طول و قطر شاخه سال جاری اندازه‌گیری شد.

تعیین درصد خندانی: برای اندازه گیری درصد خندانی در زمان اپتیمم برداشت محصول، از هر تکرار در هر تیمار ۴ خوشه انتخاب و تعداد یکصد عدد پسته با پوست تازه و به صورت کاملاً تصادفی جمع‌آوری شد سپس پوست سبز رویی جدا گردید. از میان یکصد عدد پسته تعداد میوه‌هایی که دهانشان باز بود شمارش و درصد خندانی یادداشت برداری شد.

تعیین درصد پوکی: برای اندازه گیری درصد پوکی در زمان اپتیمم برداشت محصول، از هر تکرار در هر تیمار چهار خوشه انتخاب و تعداد یکصد عدد پسته با پوست تازه و به صورت کاملاً تصادفی جمع‌آوری شد سپس پوست سبز رویی جدا گردید. از میان یکصد عدد پسته تعداد میوه‌هایی که فاقد مغز بودند، شمارش و درصد پوکی محاسبه شد.

تعیین درصد میوه‌های بدشکل: برای اندازه‌گیری درصد میوه‌های بدشکل در زمان اپتیمم برداشت محصول، از هر تکرار در هر تیمار ۴ خوشه انتخاب و تعداد یکصد عدد پسته با پوست تازه و به صورت کاملاً تصادفی جمع‌آوری شد سپس پوست سبز رویی جدا گردید. از میان یکصد عدد پسته تعداد میوه‌هایی که بدشکل بودند، شمارش و درصد میوه‌های بدشکل گزارش گردید.

وزن میوه: بدین منظور در زمان اپتیمم برداشت از هر تکرار در هر تیمار به طور تصادفی ۱۰۰ عدد میوه پسته با پوست از شاخه‌های شمالی و ۱۰۰ عدد میوه پسته با پوست از شاخه جنوبی جمع‌آوری شد وزن تر نمونه‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و میانگین وزن آن‌ها بر حسب گرم گزارش گردید.

تعیین وزن تر کل خوشه: بدین منظور از هر تکرار در هر تیمار به طور تصادفی ۳ عدد خوشه از شاخه‌های شمالی و ۳ عدد خوشه از شاخه جنوبی جمع‌آوری شد وزن تر نمونه‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها بر حسب گرم گزارش گردید.

تعداد میوه در خوشه: بدین منظور از هر تکرار در هر تیمار تعداد دانه‌ها در هر خوشه در شاخه شمالی و جنوبی شمارش شد و میانگین آن‌ها بر حسب تعداد گزارش گردید.

عملکرد: در زمان اپتیمم برداشت، میوه‌ها از درخت جمع‌آوری شده و سپس وزن تر آن‌ها با ترازو اندازه‌گیری و بر حسب کیلوگرم در هر درخت گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

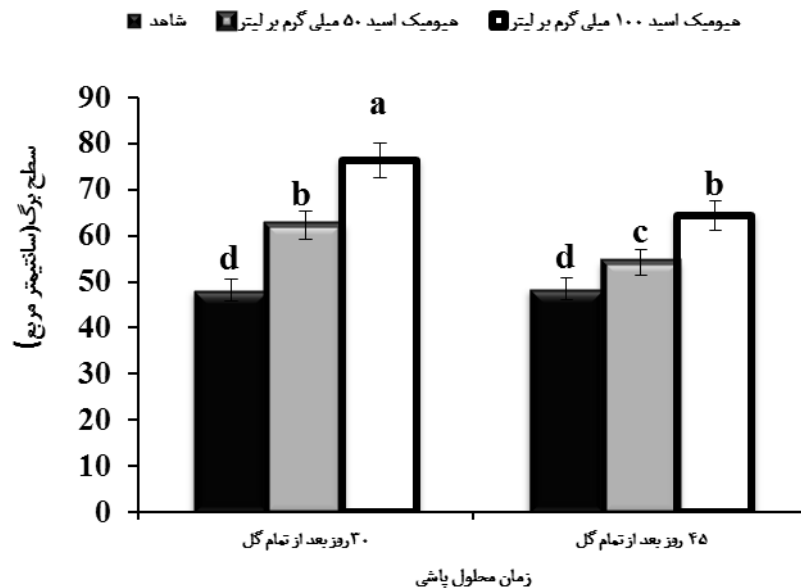
پژوهش حاضر، به صورت آزمایش اسپلیت-فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تیمار و ۴ تکرار در دو زمان اجرا شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح

احتمال ۵ درصد و مقایسه میانگین اثرات متقابل توسط نرم افزار MSTATC انجام گرفت. نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج

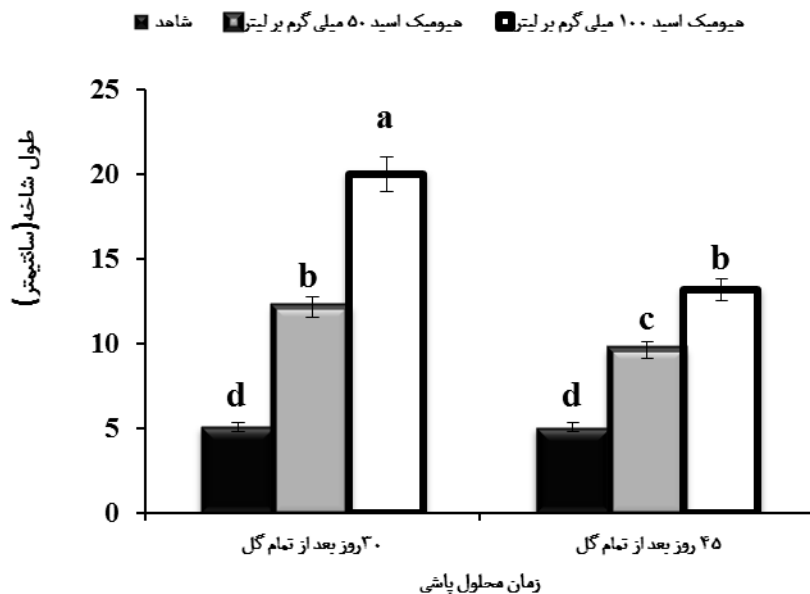
تاثیر تیمار اسید هیومیک روی ویژگی‌های رویشی

نتایج تحقیق نشان می‌دهد که تاثیر اسید هیومیک باعث افزایش در میزان سطح برگ در درختان پسته رقم اکبری در هر دو زمان کاربرد اسید هیومیک نسبت به درختان شاهد شد (شکل ۱). بطوریکه بیشترین میزان سطح برگ مربوط به درختان پسته که با اسید هیومیک ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در ۳۰ روز بعد از مرحله تمام گل تیمار شده بودند، مشاهده گردید (شکل ۱).

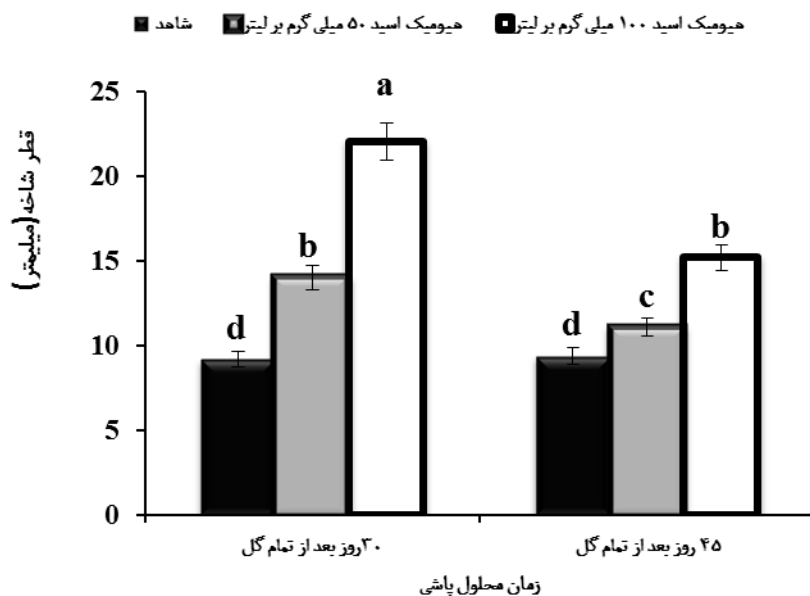


شکل ۱: تاثیر اسید هیومیک روی سطح برگ در درختان پسته در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

رشد طولی شاخه (شکل ۲) و رشد قطری شاخه (شکل ۳) درختان پسته رقم اکبری که با اسید هیومیک در هر دو مرحله (۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل) تیمار شده اند، نسبت به نمونه های شاهد بیشترین میزان را دارا بودند. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، هر دو زمان محلولپاشی تاثیر معنی داری روی رشد طولی و قطری شاخه داشتند که با شاهد تفاوت معنی داری داشتند. (شکل ۲ و ۳). طول و قطر شاخه بین ۸۹ تا ۹۲ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش داشته است (شکل ۲ و ۳).



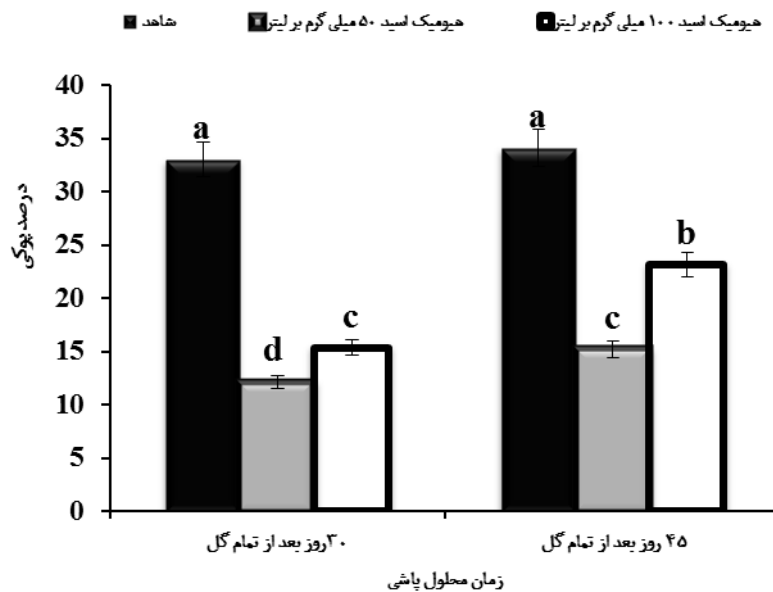
شکل ۲: تاثیر اسید هیومیک روی طول شاخه در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.



شکل ۳: تاثیر اسید هیومیک روی قطر شاخه در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

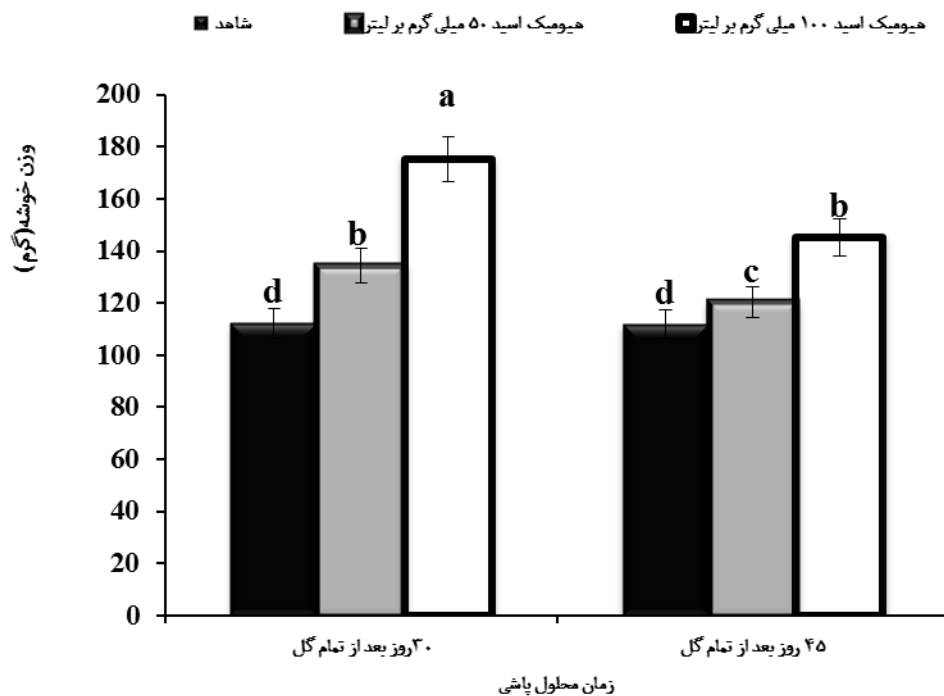
تأثیر تیمار اسید هیومیک روی ویژگی‌های زایشی

نتایج این تحقیق نشان دادند که بیشترین درصد پوکی در میوه‌های شاهد در هر دو مرحله تیماردهی و کمترین میزان در میوه‌های تیمار شده با اسید هیومیک ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شده است (شکل ۴). بطوریکه پوکی در میوه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش ۳۶ تا ۷۰ درصدی داشته است.

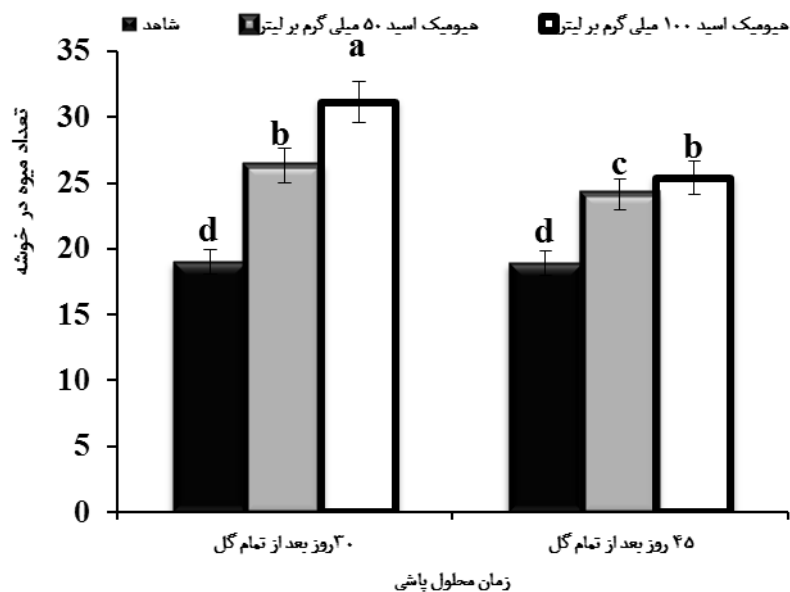


شکل ۴: تأثیر اسید هیومیک روی درصد پوکی در درختان پسته در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

وزن خوشه (شکل ۵) و تعداد میوه در هر خوشه (شکل ۶) در درختان پسته رقم اکبری با افزایش غلظت اسید هیومیک در هر دو مرحله محلولپاشی، نسبت به میوه‌های شاهد افزایش یافته است. بطوریکه بیشترین وزن خوشه و تعداد میوه در خوشه در درختان تیمار شده با اسید هیومیک ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر دیده شده است و افزایش ۲۶ تا ۶۳ درصدی نسبت به شاهد داشته است (شکل ۵ و ۶).

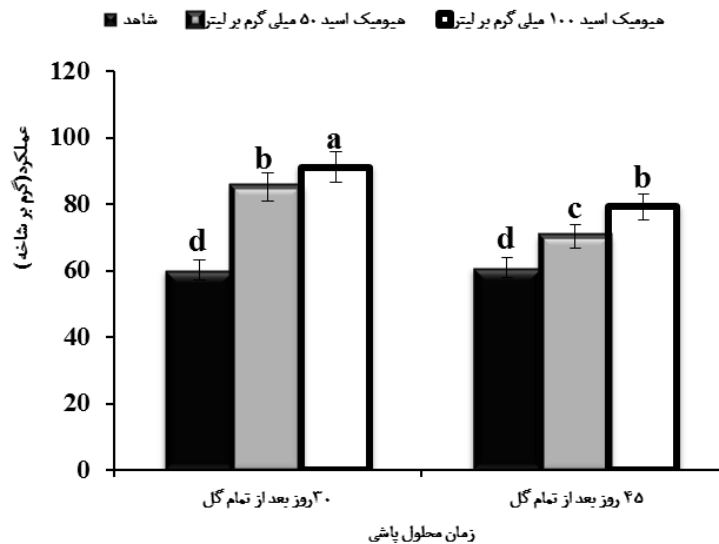


شکل ۵: تاثیر اسید هیومیک روی وزن خوشه در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

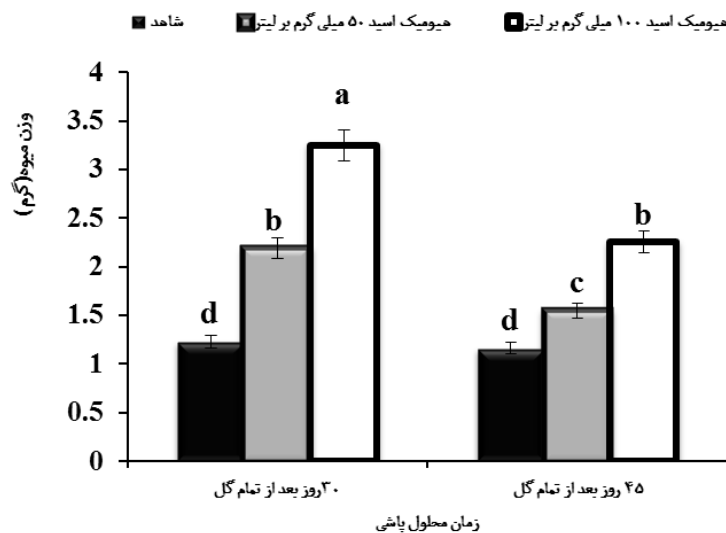


شکل ۶: تاثیر اسید هیومیک روی تعداد میوه در خوشه در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

میزان وزن میوه (شکل ۷) و در نتیجه عملکرد (شکل ۸) در درختان پسته رقم اکبری در میوه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافته است. افزایش میزان عملکرد و وزن میوه در هر دو زمان تیماردهی، با زیاد شدن غلظت اسید هیومیک تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شده است. اگرچه افزایش ۱۶ تا ۵۰ درصدی در میوه‌های تیمار شده مشاهده گردیده است (شکل ۷ و ۸).

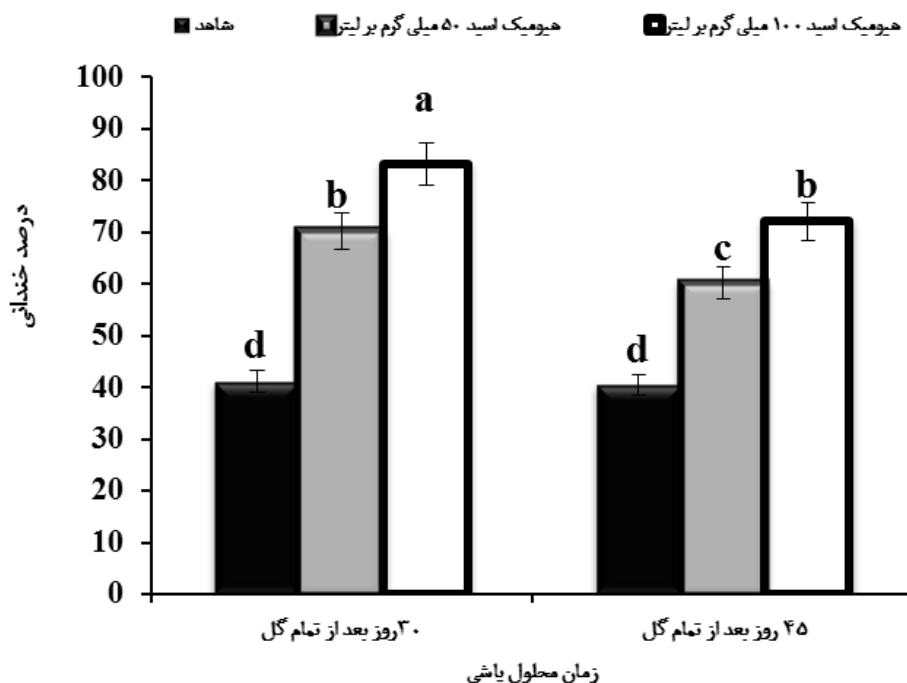


شکل ۷: تاثیر اسید هیومیک روی عملکرد در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.



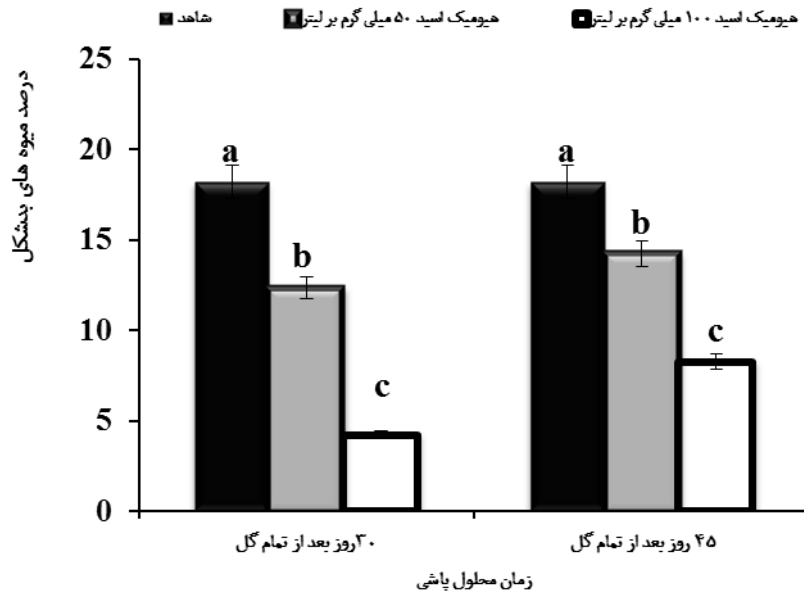
شکل ۸: تاثیر اسید هیومیک روی وزن میوه در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

درصد خندانی (شکل ۹) در میوه‌های پسته تیمار شده با اسید هیومیک در هر دو زمان محلولپاشی نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافته است. درصد خندانی بین ۴۶ تا ۱۰۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است. بطوریکه بیشترین میزان در هر دو مرحله مربوط به میوه‌های تیمار شده با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید هیومیک است.



شکل ۹: تاثیر اسید هیومیک روی درصد خندانی در درختان پسته در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

درصد میوه بدشکل در میوه‌های شاهد در هر دو مرحله از محلولپاشی، نسبت به میوه‌های تیمار شده با اسید هیومیک افزایش یافته است (شکل ۱۰). بطوریکه کمترین میزان در میوه‌های تیمار شده با اسید هیومیک ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر است و کاهشی بین ۲۳ تا ۷۸ درصد نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: تاثیر اسید هیومیک روی عملکرد در درختان پسته در دومرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل.

بحث

توجه به رشد رویشی و در نتیجه کیفیت محصولات کشاورزی اهمیت زیادی دارد و باعث افزایش عملکرد و برگشت سریع سرمایه می‌شود. در سال‌های اخیر توجه به ترکیبات شیمیایی به منظور حفظ و بهبود رشد رویشی و زایشی در گیاهان مد نظر قرار گرفته شده است. در این تحقیق استفاده از اسید هیومیک با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از مرحله تمام گل، باعث افزایش در میزان سطح برگ، شاخص کلروفیل، طول و قطر شاخه سال جاری، درصد پوکی، خندانی، درصد میوه‌های بدشکل، وزن میوه، تعداد میوه در خوشه، وزن خوشه و عملکرد شده است.

تشکیل کمپلکس بین اسید هیومیک و یون‌های معدنی، کاتالیز اسید هیومیک توسط آنزیم‌ها در گیاه، تحریک متابولیسم اسید نوکلئیک و فعالیت‌های هورمونی در گیاه دلیل اصلی اثرات مثبت اسید هیومیک روی صفات کمی و کیفی است (Ozdamarullu *et al.*, 2011) و احتمالاً به همین دلایل، ویژگی‌های کمی و کیفی میوه پسته رقم اکبری تحت تیمار هیومیک اسید در تحقیق حاضر بهبود یافته است.

هیومیک اسید، نفوذ پذیری غشاهای سلولی را افزایش داده و بدین طریق ورود پتاسیم را تسهیل می‌کند که نتیجه آن افزایش فشار داخل سلولی و تقسیم سلول است. از طرف دیگر افزایش انرژی در داخل سلول منجر به افزایش تولید کلروفیل و میزان فتوسنتز

خواهد شد. به دنبال آن یک عامل مهم در رشد یعنی جذب نیتروژن به درون سلول تشدید می‌گردد و تولید نیترات کاهش می‌یابد که در نهایت این اثرات منجر به افزایش رشد می‌شود (Gitasuddin *et al.*, 2007) و بنابراین، افزایش رشد طولی و قطری و سطح برگ پسته رقم اکبری تحت تیمار هیومیک اسید در تحقیق حاضر، مربوط به این مکانیسم هیومیک اسید است.

اسید هیومیک اثر شبه هورمونی، مثل اکسین و ایندول استیک اسید بر گیاهان دارد و این اثر اولیه به عنوان مهمترین فاکتور بیولوژیکی موثر در گیاهان است که سبب افزایش سطح برگ و میزان کلروفیل گیاه تحت تیمار می‌گردد که نتایج حاصل از این پژوهش مبنی بر افزایش سطح و میزان کلروفیل درختان پسته تحت تیمار را تایید می‌نمایند (Nardi *et al.*, 2006).

همینطور در تحقیق دیگری، محلول‌پاشی با اسید هیومیک با غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر بر ارتفاع، شاخص سطح برگ، وزن خشک، تعداد شاخه فرعی، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، وزن دانه در بوته، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیکی، میزان و عملکرد اسانس گیاه دارویی سیاه‌دانه تاثیر معنی‌داری داشت (Azizi & Safaei, 2017) که این نشان می‌دهد، افزایش سطح برگ و میزان کلروفیل آن سبب افزایش راندمان فتوسنتز شده و مواد هیدرات کربن بیشتری توسط برگ ساخته می‌شود و به منبع مصرف که میوه و قسمت‌های رویشی گیاه هست منتقل می‌شود و به دنبال این تغییرات عملکرد، خندانی و ویژگی‌های کمی و کیفی میوه پسته افزایش می‌یابد که یکی از دلایل افزایش عملکرد و بهبود رشد رویشی و زایشی پسته با کاربرد هیومیک اسید در این پژوهش دلایل ذکر شده بوده است (Ferguson *et al.*, 2005; Taghizadeh-Alisaraei *et al.*, 2017). علاوه بر این کاربرد هیومیک اسید، بعنوان کود آلی، هیچ آسیب زیست محیطی و یا تغذیه‌ای ندارند به نظر می‌رسد امکان مصرف توأم این کودها یک راه حل مناسب جهت دستیابی به حداکثر عملکرد پایدار باشد (Shahbazi *et al.*, 2015). محلول‌پاشی اسید هیومیک در لوبیا موجب افزایش ۱۶ درصدی عملکرد دانه نسبت به تیمار شاهد شد که علت آن، افزایش فراهمی عناصر غذایی برای گیاه در تیمارهای اسید هیومیک بیان گردیده است (Jahan *et al.*, 2013) که نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تایید می‌نمایند.

اسید هیومیک جذب نیترات و فعالیت آنزیم ATP آزا را در غشاء پلاسمایی سلول‌ها افزایش داد و همچنین به سبب افزایش فتوسنتز و جذب عناصر غذایی بر میزان عملکرد دانه در ذرت افزوده شد (Pinton *et al.*, 1999). اسید هیومیک از طریق افزایش محتوای نیتروژن برگ‌ها و حفظ ماندگاری برگ‌ها سبب بهبود رشد، افزایش زیست توده تولیدی و ارتفاع بوته می‌شود (Ayas & Gulser, 2005). اسید هیومیک به علت خواص سایتوکینینی موجب به تاخیر انداختن تجزیه کلروفیل و پروتئین‌ها در برگ و پیری در گل‌ها می‌شود و این ترکیبات نیز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و انتقال آنها به جوانه‌های در حال رشد نقش اساسی دارند و از این طریق موجب افزایش میزان ماده خشک در گل‌ها و افزایش طول عمر آنها می‌شوند (Arteca, 1996)، که در پژوهش انجام شده روی پسته در این تحقیق نیز چنین نتایجی بدست آمده است.

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که درصد خندانی با افزایش میزان اسید هیومیک افزایش و با افزایش مقدار اسید هیومیک درصد پوکی و درصد میوه‌های بدشکل کاهش یافت. در بررسی اثر انواع مختلف اسید هیومیک بر خصوصیات کیفی و کمی پسته دریافتند که اسید هیومیک به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد جوانه، سطح برگ، سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، مقاومت روزنه‌ای، فلورسانس کلروفیل و همچنین باعث کاهش معنی‌دار درصد پسته‌های پوک و تعداد پسته‌های ناخندان گردید (2015 Afshari *et al.*). اسید هیومیک از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله افزایش متابولیسم درون سلول‌ها و همچنین بالا بردن میزان کلروفیل در برگ‌ها، سبب ماندگاری بیشتر برگ‌ها شده، در نتیجه بر میزان عملکرد تولیدی و زیست توده تولیدی در گیاهان آلی افزوده می‌شود (Nardi *et al.*, 2002). در آزمایش مشابه، اسید هیومیک عملکرد بیولوژیک بادام‌زمینی را افزایش داد (Moraditochae, 2012) زیرا، سطح برگ، به عنوان دریافت‌کننده نور خورشید و عضو فتوسنتز کننده، عاملی تأثیرگذار در سرعت رشد و عملکرد گیاهی محسوب می‌شود (Singer *et al.*, 2004) که این نیز یکی دیگر از دلایل افزایش عملکرد پسته با کاربرد هیومیک اسید طی این آزمایش است. استفاده از اسید هیومیک باعث رشد اندام هوایی و افزایش تولید محصولات زراعی و باغی می‌شود، که دلیل آن افزایش جذب عناصری نظیر نیتروژن، کلسیم، فسفر، پتاسیم، منگنز، آهن، روی و مس است (Harper *et al.*, 2000). کاربرد برگی و خاکی اسید هیومیک با غلظت ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر در گیاه فلفل با افزایش میانگین وزن میوه، عملکرد کل را افزایش داد (Karakurt *et al.*, 2009). کاربرد برگی اسید هیومیک با غلظت سه گرم در لیتر منجر به افزایش رشد گیاه، میوه بستن و بهبود تولید میوه خیار گردید (El-Nemr *et al.*, 2012). نتایج تحقیقات نشان داد که تیمار ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر اسید هیومیک بر رشد رویشی، تعداد گل و میوه گوجه‌فرنگی تأثیر مثبت داشته و عملکرد را افزایش داد (Yildirim, 2007). عشقی و گاراژیان در رقم پارس توت‌فرنگی نشان دادند که کاربرد اسید هیومیک به صورت محلول‌پاشی (در غلظت‌های ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش وزن خشک شاخساره و ریشه شد (Eshghi & Gharazhian, 2015) که با نتایج این پژوهش همسو است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی محلولپاشی با اسید هیومیک در دو مرحله ۳۰ و ۴۵ روز بعد از تمام گل، سبب بهبود ویژگی‌های زایشی، رویشی و کیفی میوه پسته رقم اکبری شدند. زیرا کاربرد اسید هیومیک با افزایش سطح برگ، رشد رویشی و زایشی را بهبود می‌بخشد. افزایش میزان عملکرد و وزن میوه در هر دو زمان تیماردهی، با زیاد شدن غلظت اسید هیومیک تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده است

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، اسید هیومیک به صورت تجاری به جهت افزایش عملکرد و وزن میوه، در بسیاری از محصولات باغبانی، می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- Abedini, T., Moradi, P. and Hani, A. (2015). 'Effect of organic fertilizer and foliar application of humic acid on some quantitative and qualitative yield of Pot marigold'. Journal of Novel Applied Sciences, 4 (10): 1100-1103.
- Abedi, T., and Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46(1): 27-34.
- Arteca, R. N. (1996). Plant Growth Substances: Principle and Applications. Chapman and Hall. New Yourk.
- Afshari, H., PourAli, M., Sajedi, S., and HokmAbadi, H. (2015). The effect of different types of humic acid on quantitative and qualitative characteristics Pistachio AbbasAli variety. Journal of Plant Physiology Environment, 37: 83-72.
- Azizi, M., and Safaei, Z. (2017). The effect of foliar application of humic acid and nano fertilizer (Pharmks®) on morphological traits, yield, essential oil content and yield of Black Cumin (*Nigella sativa* L.). Journal of Horticulture Science, 30(4): 671-680.
- Ayas, H., and Gulser, F. (2005). The effect of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach. Journal of Biological Sciences, 5(6): 801-804.
- Chen, Y., and Aviad, T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In P. MacCarthy et al. (ed). Humic substances in substances in soil and crop science. P. 161- 186.
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Grassano, A., and Ruiz, O. A. (2008). Biochemical and molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria and evaluation of its efficiency promoting the growth of Lotus tenuis. Lotus Newsletter, 38(2):53- 56.
- Cangi, R., Tarakcioglu, C., and Yasar, H. (2006). Effect of humic acid applications on yield, fruit characteristics and nutrient uptake in Ercis grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. Asian Journal of Chemistry, 18: 1493-1499.
- Dursun, A., Guvenc, I., and Turan, M. 2002. Effect of different levels of humic acid on seedling growth and macro and micronutrient contents of tomato and eggplant. ACTA Agrobotanica, 56: 81-88.
- Eshghi, S., and Gharazhian, M. (2015). Improving growth, yield and fruit quality of strawberry of foliar and soil drench applications of humic acid. Iran Agricultural Research, 34(1): 14–20

- El-Nemr, M. A., El-Desuki, M., El-Bassiony, A. M., and Fawzy, Z. F. (2012) Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to different foliar applications of humic acid and bio-stimulators. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 6: 630-637.
- El-Bassiony, A.M., Fawzy, Z. F., Abd El-Baky, M. M. H., and Mahmoud, A. R. (2010). Response of snap bean plants to mineral fertilizers and humic acid application. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 6(2): 169-175.
- Ferguson, L., Beede, R. H., Freeman, M. W., Haviland, D. R., Holtz, B. A., and Kallsen, C. E. (2005). Pistachio Production Manual, 4th ed. Fruit and Nut Research and Information Center, University of California. P: 480.
- Giasuddin, A. B. M., Kanel, S., and Choi, H. (2007). Adsorption of humic acid onto nanoscale zerovalent iron and its effect on arsenic removal. Journal Environment Science Technology, 41(6): 2022-2027.
- Harper, S. M., Kerven, G. L., Edwards, D. G., and Ostatek-Boczynski, Z. (2000) Characterisation of fulvic and humic acids from leaves of Eucalyptus camal-dulensis and from decomposed hay. Soil Biology and Biochemistry, 32: 1331-1336.
- Jahan, M., Sohrabi, R., Doayee, F., and Amiri, M. B. (2013). Effect of super absorbent water application in soil and humic acid foliar application on some agroecological characteristics of bean *phaseolus vulgaris* L. in mashhad. Journal of Agroecology, 3(2):71-90.
- Khaled, H., and Fawy, H. A. (2011). Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth and soil properties under conditions of salinity. Soil and Water Research, 6: 21-29.
- Karakurt, Y., Unlu, H., Unlu, H., and Padem, H. (2009) The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science, 59: 233-237.
- Liu, C. and Cooper, R.J. (2000) Humic Substances Influence Creeping Bentgrass Growth. Golf Course Management, 49-53.
- Moraditochae, M. (2012). Effects of humic acid foliar spraying and nitrogen fertilizer management on yield of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Iran. ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science, 7(4): 289-293.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biology Biochemistry, 34: 1527–1536.
- Ozdamar ullu, H., Unlu, H., Karakurt, Y. and Padem H. 2011.Changes in fruit yield and quality in response to foliar and soil humic acid application in cucumber. Scientific Research and Essays, 6(13): 2800-2803.

- Panuccio, M. R., Muscolo, A., and Nardi, S. (2001). Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of pinus. *Journal Plant Nutrition*, 24:693–704.
- Panahi, B., Esmailpour, A., Farbod, F., Moazzenpour Kermani, M., and Farivar Mahin, H. (2001). Pistachio guideline. Agriculture Education Publication, Karaj, Iran, pp: 147.
- Pinton, R., Cesco, S., Lacoletti, G., Astolfi, S. and Varanini, Z. (1999). Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ ATPase. *Plant Soil*, 215: 155-161.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., and Nardi, S. (2001). Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests. *New Phytologist*, 51:647-657.
- Rafei, S. and Pakkish, Z. (2014). Improvement of Vegetative and Reproductive Growth of ‘Camarosa’ Strawberry: Role of Humic Acid, Zn, and B. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 79: 239-244.
- Samavat, S. and Malakuti, M. (2005). Important use of organic acid (humic and fulvic) for increase quantity and quality of agriculture productions. *Water and Soil Research*, 463: 1-13
- Singer, J. W., Kohler, K. A., Liebman, M., Richard, T. L., Cambardella, C. A., and Buhler, D. D. (2004). Tillage and compost affect yield of corn, soybean, and wheat and soil fertility. *Agriculture Journal*, 96: 531-53.
- Shahbazi, S.H., Fateh, E., and Aynehband, A. (2015). Evaluation of the effect of humic acid and vermicompost on yield and yield components of three wheat cultivars in tropical regions. *Journal of Plant Production*, 38(2): 99-110.
- Tourfi, F. and Shokuhfar, A. (2019). Effect of humic acid on yield, yield components and physiological parameters of wheat in deficit irrigation conditions. *Journal of Plant Production Science*, 9:121-132.
- Taghizadeh-Alisaraei, A., Alizadeh Assar, H., Ghobadian, B., and Motevali, A. 2017. Potential of biofuel production from pistachio waste in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72: 510–522.
- Zhang, X. Z., and E. H. Ervin. (2004). Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science*, 5:1737-17.
- Yildirim, E. (2007) Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 57: 182-186.

Application of humic acid on improving the vegetative and reproductive growth of pistachio cultivar Akbari

Z. Pakkish¹, H. Asghari², s. Mohammadrezakhani^{3*}

Received: 2020.12.6

Accepted: 2021.4.24

Abstract

In this study, the effect of humic acid with concentrations of 50 and 100 mg/L in two stages 30 and 45 days after flowering, were sprayed on pistachio trees of Akbari cultivar. The results showed that the highest leaf area, length and branch diameter were related to pistachio trees with 100mg/L humic acid in 30 days after full flowering stage. The lowest percentage of hollow was observed in fruits treated with humic acid 50 mg /L. The highest cluster weight and number of fruits per cluster was observed in trees treated with humic acid 100 mg /L. The highest cluster weight and number of fruits per cluster was observed in trees treated with humic acid 100 mg /L. Increased yield and fruit weight in both treatments were observed with increasing humic acid concentration up to 100 mg/L. The percentage of deformed fruits in control fruits increased in both stages of foliar application compared to fruits treated with humic acid.

Key words: Humic acid, Pistachio, Yeild

1 Associate Professor Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2Master Sciences, Kerman Agriculture and Natural Resources Research Center, Kerman, Iran

3Former Ph.D. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, East Azerbaijan, Iran (*Smohammadrezakhani@yahoo.com)

بررسی عوامل موثر بر بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات (PHBV) به روش

پلاکت-برمن و بهینه‌سازی بهره‌وری تولید با تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا

ندا سینائی^۱، داود زارع^{۲*}، مهرداد آذین^۳

چکیده

PHAs پلیمرهایی زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار هستند که توسط طیف گسترده‌ای از باکتریها تولید می‌شوند. در پژوهش حاضر، از سویه طبیعی *Bacillus cereus* تولیدکننده کوپلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات (PHBV) با بهره‌وری تولید بالا جداسازی شده از پساب نشاسته استفاده گردید. به منظور تولید، پساب نشاسته بعنوان یک محیط کشت ارزان‌قیمت بررسی و در ادامه، ترکیب بهینه محیط کشت و بمنظور دستیابی به بهره‌وری بالاتر، روش کشت با تراکم بالای سلولی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که میانگین حداکثر تولید PHBV با استفاده از طراحی آزمایش پلاکت-برمن، حدود ۵/۵٪ وزن خشک سلول است. در ادامه با بهینه‌سازی کشت با تراکم بالای سلولی، تولید به بیش از ۷۲٪ وزن خشک سلول افزایش یافت. بنابراین روش کشت سلولی با تراکم بالا تاثیر معناداری بر بالا بردن بهره‌وری تولید PHBV دارد. با توجه به بکارگیری محیط کشت ارزان‌قیمت پساب، اهمیت این نتایج دوچندان بوده و پتانسیل تولید در مقیاس صنعتی را نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: پساب نشاسته، پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات، روش پلاکت-برمن، *Bacillus PHBV cereus*

۱. دکتر پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

۲. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران * نویسنده مسئول: zare@irost.ir

۳. استاد، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

مقدمه

پلاستیک‌های زیستی، پلیمرهای زیستی صنعتی مهمی هستند که تحت هر شرایط محیطی توسط فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌شوند. در حال حاضر بیوپلیمرهایی مانند پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها، پلی‌ساکاریدها، پلی‌لاکتیک‌ها و پلی‌استرهای آلیفاتیک گزینه‌هایی مناسب جهت جایگزینی پلاستیک‌های پتروشیمیایی هستند. در میان این بیوپلیمرها، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) به دلیل دارا بودن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بسیار مشابه با پلاستیک‌های سنتزی و قابلیت تجزیه پذیری کامل در محیط، توجه بسیاری از محققان جهان را به خود جلب کرده‌اند (Guillet, 2004). پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها، پلی‌استرهای هیدروکسی‌آلکانوات‌ها هستند و وزن مولکولی آن‌ها بر حسب نوع میکروارگانیسم و شرایط رشد در محدوده $10^5 \times 2$ تا $10^6 \times 3$ دالتون قرار دارد (Lenz & Marchessault, 2005).

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها توسط دامنه وسیعی از باکتری‌ها در شرایط خاص تولید می‌شوند. تقریباً ۳۰۰ نوع ریزسازواره، شامل انواع گرم مثبت و منفی شناسایی شده است که قادر به ذخیره سازی انواعی از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از جمله PHB و PHBV به عنوان منبع ذخیره کربن در داخل سلول خود هستند (Akaraonye *et al.*, 2010). از ویژگی‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها می‌توان به خاصیت زیست تخریب پذیری، سازگاری با سیستم‌های حیاتی، طبیعت پلی‌استری و خاصیت ترمو پلاستیکی اشاره کرد. این ویژگی‌ها سبب کاربردهای فراوان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به عنوان پوشش به منظور رهایش کنترل شده داروها و حشره کش‌ها، استفاده به عنوان جایگزین‌های استخوانی (پروتزها)، نخ و دستکش‌های جراحی، بکارگیری به عنوان جایگزین عروق خون و در نهایت بسته‌بندی شده است (Mohan *et al.*, 2016).

با وجود فواید و ویژگی‌های منحصر به فرد بیوپلاستیک‌ها، تولید این مواد به صورت صنعتی با چالش‌های جدی روبروست. یکی از بزرگترین مشکلاتی که مانع از تجاری شدن این بیوپلیمرها می‌گردد هزینه‌ی بالای تولید آن‌ها می‌باشد (Aragão *et al.*, 2009). قیمت منبع کربن یک فاکتور اساسی در قیمت تمام شده پلاستیک‌زیستی است و بیشترین نقش را در کل هزینه‌ی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها داراست. به این ترتیب کاهش قیمت سوپسترا و استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت و دستیابی به سویه‌هایی که توانایی مصرف این نوع منابع کربن را داشته باشند استراتژی‌هایی هستند که در حال بررسی هستند. استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت به منظور تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها می‌تواند منجر به افزایش ارزش تجاری این پلیمرها گردد (Dalcanton *et al.*, 2010., Batcha *et al.*, 2014).

نشاسته، پلیمری از مولکول‌های گلوکز است که بر اساس منبع تولید آن (ذرت، گندم، سیب زمینی، برنج و تاپیوکا) از پر مصرف‌ترین افزودنی‌ها در محصولات غذایی مختلف است. طی فرایند تولید نشاسته از گندم و انجام مراحل تهیه خمیر و هموژن

کردن آن، جدا سازی گلوتن و همچنین شستشو و آبگیری و خشک کردن نشاسته، پسابی تولید می‌شود که از طرفی دارای اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) و اکسیژن خواهی زیستی (BOD) بالایی بوده و رهاسازی آن در طبیعت مشکلات زیست‌محیطی فراوانی به دنبال دارد و از طرف دیگر دارای مقادیر قابل توجهی قند و نشاسته قابل مصرف توسط باکتری است. بنابراین این پساب می‌تواند به عنوان یکی از بهترین منابع کربنی ارزان قیمت جهت تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

در راستای بررسی موارد مذکور، تحقیق حاضر پیرو مطالعه پیشین که به غربالگری جدایه‌ها با قابلیت رشد و بهره‌وری تولید بالا با استفاده از منبع کربن ارزان قیمت پساب نشاسته‌ای پرداخته بود، با بررسی عامل‌های مؤثر، ترکیب بهینه محیط کشت برای سویه برتر مورد بررسی را ارزیابی و به منظور دستیابی به بهره‌وری بالاتر تولید، روش کشت با تراکم بالای سلولی را مورد سنجش قرار می‌دهد.

مواد و روش ها

سویه باکتری مورد مطالعه: در این پژوهش باکتری وحشی *Bacillus cereus* غربال شده از پساب نشاسته طی تحقیقات قبلی به عنوان سویه تولید کننده کوپلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات مورد بررسی قرار گرفت (Sinaei et al., 2021).

تهیه محیط پیش کشت

محیط پیش کشت Nutrient broth در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر تهیه و پس از تنظیم pH بر روی ۷، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو و پس از تلقیح با باکتری جداسازی شده در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شد. جذب نوری نمونه‌ها (OD) هر ۳ ساعت یکبار با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. هنگامی که غلظت سلولی در محیط Nutrient broth برابر ۱ مک فارلند (3×10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) گردید، ۲/۵ میلی‌لیتر از محیط پیش کشت به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید انتقال یافت که غلظتی معادل ۵٪ (حجمی/حجمی) ایجاد گردد.

تهیه محیط کشت صنعتی تولید

پساب نشاسته‌ای شرکت آردینه (واقع در اصفهان) جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲ تا ۴ درجه سلسیوس ذخیره شد. بر اساس نتایج آنالیزهای انجام گرفته، پساب موردنظر حاوی ۲۱/۳ گرم در لیتر قند احیاشده و ۱۹/۱ گرم در لیتر نیتروژن کل بود.

نتایج حاصل از آزمایشات طراحی شده به روش پلاکت-برمن (جدول ۱) نشان داد که فقط عامل رسوب‌گذاری دارای تاثیر معنی‌داری بر مقدار PHBV تولید شده است. به همین دلیل و به منظور یافتن عامل موثری که بتوان تولید پلیمرزیستی را افزایش داد و به دلیل اینکه محیط کشت صنعتی مورد استفاده محیط پیچیده پساب نشاسته‌ای است، عامل‌ها بصورت تک عاملی بررسی و نتایج قبلی نیز صحت سنجی گردید.

بررسی تاثیر نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت صنعتی

نسبت کربن به نیتروژن عامل مهمی در تولید پلیمرهای ذخیره‌ای محسوب می‌شود. آنالیز اولیه پساب نشاسته نشان داد که حاوی ۲۱/۳ گرم بر لیتر قند و ۱۹/۱ گرم بر لیتر نیتروژن کل است. از آنجاییکه محیط کشت صنعتی مورد استفاده (پساب نشاسته) حاوی مقدار بالایی نیتروژن است، به‌منظور کاهش میزان نیتروژن و دستیابی به نسبت بهینه کربن به نیتروژن، نمونه‌های محیط کشت پساب نشاسته‌ای در سه حالت بدون رسوب‌گذاری، رسوب‌گذاری جزئی و رسوب‌گذاری کامل بررسی و میزان کربن و نیتروژن آن‌ها اندازه‌گیری شد. جهت دستیابی به محیط کشت صنعتی با رسوب‌گذاری جزئی، پساب نشاسته‌ای به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید و محیط کشت پساب نشاسته با رسوب‌گذاری کامل، از سانتریفوژ محیط کشت صنعتی مذکور با سرعت ۵۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه حاصل گردید. پس از رسوب‌گذاری مقدار کربن و نیتروژن محلول رویی بررسی شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مذکور به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیده و پس از تنظیم pH بر روی ۷، اتوکلاو و از محیط پیش کشت تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و چرخش ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. در نهایت میزان ماده خشک سلولی و پلیمر زیستی تولید شده در فازهای مختلف رشد در مدت زمان ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

بررسی تاثیر غلظت قند محیط کشت صنعتی

از آنجاییکه پساب نشاسته دارای گرانیوی بالایی بوده و درصد قند بالایی دارا است و به‌منظور بررسی محدوده وسیعی از میزان کربن، دو رقت ۲۵٪ و ۵۰٪ و نمونه رقیق نشده این محیط کشت مورد مقایسه قرار گرفت. در این مرحله، شرایط بهینه مرحله قبل اعمال گردید و بقیه عامل‌ها ثابت باقی ماند. سپس با توجه به میزان پلیمر زیستی تولید شده و بهره‌وری مربوطه، بهترین میزان غلظت محیط کشت پساب نشاسته‌ای برای مراحل بعدی بدست آمد.

بررسی تاثیر تغییر نسبت حجم محیط کشت به حجم کل ظرف

نسبت حجم محیط کشت به حجم کل می‌تواند بر میزان هوادهی محیط کشت و سرعت تکثیر سلولی تاثیر گذار باشد. در این پژوهش به منظور ارزیابی اثر این عامل بر بهره‌وری تولید پلیمر زیستی، سه حجم ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری مقایسه گردید.

بررسی تاثیر درصد تلقیح محیط پیش کشت به محیط کشت صنعتی

در این قسمت از پژوهش، میزان درصدهای مختلف تلقیح از محیط پیش کشت تهیه شده به محیط کشت تولید (پساب نشاسته‌ای)، مورد بررسی قرار گرفت. هنگامی که غلظت سلولی در محیط پیش کشت برابر یک مگافارلند (3×10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) گردید، بر اساس مقالات، مقادیر ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌لیتر محیط پیش کشت به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید انتقال یافت که به ترتیب غلظتی معادل ۱/۱٪، ۵/۱٪ و ۱۰٪ (حجمی/حجمی) ایجاد نمود. سپس میزان پلیمر زیستی تولید شده و بهره‌وری تولید اندازه‌گیری و ارزیابی گردید.

بررسی تاثیر افزودن ترکیبات محرک تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات به محیط کشت تولید

بررسی منابع نشان می‌دهد که افزودن ترکیباتی چون استات سدیم و اتانول به ترکیب محیط کشت، باعث افزایش تولید پلیمر زیستی می‌شود. علت تئوری مطرح شده این است که وجود اتانول در محیط کشت می‌تواند رشد باکتری را متوقف ساخته و مسیر بیوشیمیایی تولید پلیمر زیستی با سرعت بیشتری پیش رود. سدیم استات نیز مهار کننده چرخه TCA در سلول است. با توجه به مسیر سنتز PHA در باکتری‌ها، در استفاده از استیل کوآ بین چرخه کربس و مسیر تولید پلیمر رقابت وجود دارد. بنابراین هنگام وجود سدیم استات اضافی در محیط کشت، چرخه کربس مهار می‌شود و تولید PHA افزایش می‌یابد. لذا تاثیر این دو ماده بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. استات سدیم در غلظتهای ۰/۱ و ۲ گرم بر لیتر و اتانول در غلظتهای ۱ و ۱۰ میلی‌لیتر بر لیتر به محیط‌های کشت افزوده و میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات حاصل با نمونه بلانک که فاقد ماده مورد بررسی بود مقایسه آماری گردید.

بررسی اثر میزان هوادهی بر بهره‌وری تولید پلیمر در محیط کشت صنعتی

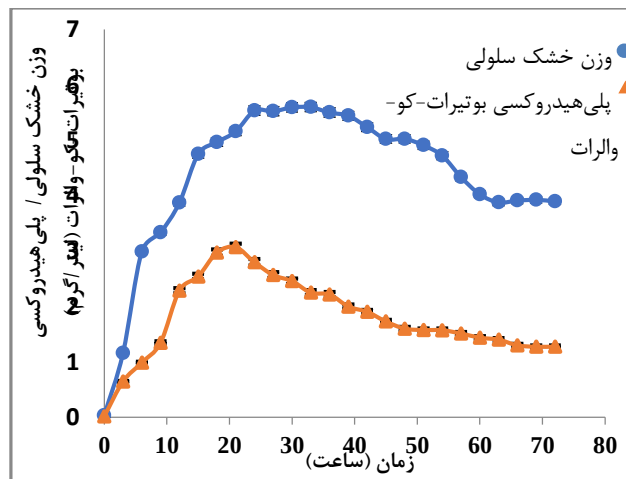
ارلن‌های حاوی محیط کشت صنعتی در انکوباتور شیکردار با دوره‌های متفاوت ۱۲۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند و میزان پلیمر زیستی تولید شده مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی با روش کشت با تراکم سلولی بالا

در این مرحله از تحقیق، تاثیر کشت با تراکم سلولی بالا بر بهره‌وری تولید مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل انجام آزمایشات در ارلن، امکان ایجاد شرایط خوراک‌دهی مداوم جهت ارزیابی تکنیک کشت با تراکم سلولی بالا میسر نبود. بنابراین در کلیه مراحل، از محیط کشت بهینه‌سازی شده طی مراحل قبل استفاده گردید و سپس با انتقال توده سلولی به شرایط کشت جدید، میزان تاثیر این روش بر بهره‌وری تولید PHBV سنجیده شد.

بررسی تاثیر زمان انتقال توده سلولی به محیط کشت صنعتی تازه

با توجه به منحنی رشد باکتری و تولید پلیمر زیستی در فازهای مختلف رشد در محیط کشت ساختگی DM9 (شکل ۱)، بهترین زمان انتقال توده سلولی حاصل به محیط کشت صنعتی تازه بررسی شد. به این منظور، کل توده سلولی رشد یافته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پساب نشاسته‌ای در سه زمان ابتدای فاز لگاریتمی (۶ ساعت)، انتهای فاز لگاریتمی (۱۲ ساعت) و اواسط فاز سکون (۲۷ ساعت)، با سانتریفیوژ رسوب‌گذاری شد و در شرایط استریل به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت صنعتی مشابه ولی تازه افزوده شد و تاثیر آن بر میزان بهره‌وری تولید پلاستیک‌زیستی مقایسه گردید.



شکل ۱: نمودار رشد و تولید پلیمر زیستی توسط سویه *B. cereus* مورد بررسی در محیط کشت ساختگی DM9

بررسی تاثیر نوع محیط پیش کشت بر میزان بهره‌وری تولید

به منظور بررسی میزان تاثیر نوع محیط پیش کشت، دو نوع محیط پیش کشت جهت فعال نمودن سلول‌ها قبل از مرحله تولید در محیط کشت صنعتی مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از آن‌ها محیط Nutrient broth، و دیگری محیط پساب نشاسته‌ای مشابه با محیط کشت تولید است. سپس درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید محاسبه و نتایج مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

بررسی تاثیر غلظت توده سلولی منتقل شده بر میزان بهره‌وری تولید

در این مرحله، توده سلولی با ۳ نسبت متفاوت ۱:۱/۲، ۱:۱ و ۱:۲ به محیط کشت صنعتی تولید اضافه و با اندازه‌گیری میزان تولید پلیمر زیستی در فواصل زمانی ۳ ساعت یکبار، بهترین غلظت سلولی محاسبه گردید. برای نسبت ۱:۱ کل توده سلولی رشد یافته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه، رسوب‌گذاری و به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پساب نشاسته‌ای تازه اضافه شد و برای نسبت‌های ۱/۲ و ۲ به ترتیب نصف و دو برابر حجم محیط کشت، رسوب‌گذاری و توده سلولی آن‌ها در شرایط آسپتیک به محیط کشت صنعتی مشابه ولی تازه افزوده و اثر آن بر افزایش بهره‌وری تولید پلاستیک‌زیستی محاسبه گردید.

روش استخراج پلی‌هیدروکسی آلکانوات

ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی نمونه در سانتریفیوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب‌گذاری شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم (۵٪ کلر فعال با pH برابر با ۱۰) به رسوب باکتری اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس محلول حاصل با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتری به ترتیب با ۳۰ میلی‌لیتر آب جوش، ۲۰ میلی‌لیتر استون و ۲۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق شسته و در پایان هر مرحله سانتریفیوژ شدند (Law & Slepecky, 1961). در ادامه رسوبات حاصل در محلولی با نسبت ۷:۳:۱ از کلروفرم: متانول: آب حل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت گرماگذاری شد (Hahn et al., 1993). پس از سانتریفیوژ، یک محلول سه لایه (تری فازیک) با لایه بالایی آب، لایه مرکزی بقایای سلولی و لایه زیرین محلول کلروفرم به دست آمد (شکل ۲). قسمت کلروفرم جدا و در آون با دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از تبخیر کامل کلروفرم، یک فیلم سفید رنگ از پلی‌هیدروکسی آلکانوات به دست آمد که برای تعیین غلظت پلیمر زیستی تولید شده با روش سنجش اسید کروتونونیک مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲: تشکیل محلول سه لایه (تری فازیک) طی فرآیند استخراج پلیمر. a: لایه بالایی آب، b: لایه مرکزی بقایای سلولی و c: لایه زیرین محلول کلروفرم است

اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

برای تخمین وزن خشک سلولی، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید با سانتریفیوژ ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب‌گذاری شد. پس از سه بار شستشو با آب مقطر، رسوب باکتریایی در دمای ۵۵ درجه سلسیوس در آون خشک شد تا وزن ثابت حاصل شود (Pal et al., 2002).

اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی آلکانوات با استفاده از روش اسید کروتونونیک

غلظت پایین پلی‌هیدروکسی آلکانوات در نمونه‌ها را می‌توان با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری نمود. اساس این روش بر پایه تبدیل پلی‌هیدروکسی آلکانوات به اسید کروتونونیک با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ و حرارت است. جذب نوری اسید کروتونیک حاصل به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌های استخراج شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس در یک حمام آب گرم قرار داده شد تا تبدیل پلی‌هیدروکسی آلکانوات به اسید کروتونیک انجام گیرد. سپس جذب محلول در ۲۳۵ نانومتر در برابر محلول بلانک که اسید سولفوریک جوشیده بود اندازه‌گیری شد (Law & Slepecky, 1961).

هم‌چنین منحنی استاندارد سنجش با استفاده از پلی‌هیدروکسی بوتیرات خالص شرکت سیگما ترسیم شد. به این منظور مقادیر مختلف (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم) پلی‌هیدروکسی بوتیرات استاندارد در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و داغ حل، جذب نمونه‌ها در ۲۳۵ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد رسم گردید (شکل ۳).



شکل ۳: منحنی استاندارد و جذب نوری کروتونیک اسید حاصل از مقادیر مشخص پلی‌هیدروکسی بوتیرات که توسط اسید

سولفوریک غلیظ هیدرولیز شده‌اند

اندازه‌گیری درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات

برای سنجش کمی توانایی تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات، پلیمرهای استخراج شده از تک تک جدایه‌های جداسازی شده توسط روش کروتونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و و درصد تجمع پلی‌هیدروکسی آلکانوات بر اساس نسبت پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولیدی در وزن خشک سلولی طبق رابطه (۱) محاسبه شد. میزان بهره‌وری نیز با محاسبه نسبت تجمع پلی‌هیدروکسی آلکانوات در هر ساعت مطابق رابطه (۲) به دست آمد.

$$\text{رابطه (۱)} \quad 100 \times \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{وزن خشک سلولی (گرم)}} = \text{درصد تجمع پلیمر}$$

$$\text{رابطه (۲)} \quad \text{بهره‌وری} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{زمان (ساعت)}}$$

تجزیه و تحلیل نتایج آنالیزها

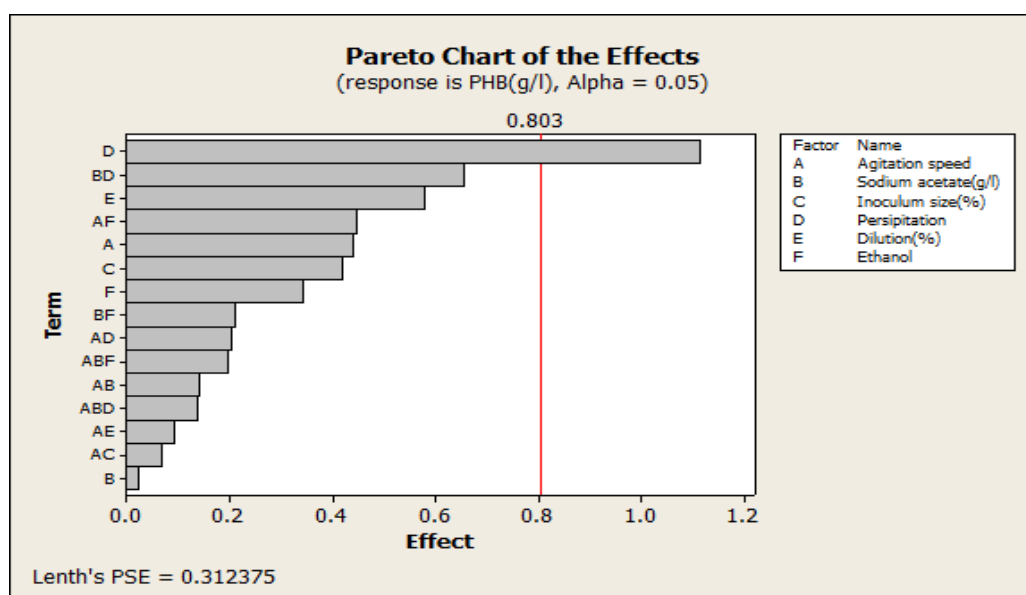
به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. کلیه آزمایشات مورد بررسی با سه تکرار، با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین، برای انجام مقایسه زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری $p > 0.05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

در تمامی آزمایشات، سویه *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از پساب نشاسته‌ای که در تحقیقات قبلی غربالگری شده بود، به عنوان سویه مورد بررسی انتخاب شد. پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده نیز به عنوان کوپلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات شناسایی شده بود (Sinaei et al., 2021). از آنجاییکه به دلیل هزینه بالای فرایند تولید پلیمر زیستی، جایگزینی وسیع این دسته از پلیمرها با پلاستیک‌های تولید شده بر پایه ترکیبات نفتی تاکنون امکان‌پذیر نشده است و تلاش برای یافتن منبع کربن ارزان‌قیمت که مهم‌ترین عامل بالا بودن هزینه تمام شده پلاستیک‌های زیستی است همچنان ادامه دارد، در این پژوهش از پساب نشاسته بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده شده است. این پساب‌ها از یک طرف بسیار ارزان بوده و از طرف دیگر به دلیل دارا بودن مواد آلی فراوان، مشکلات زیست محیطی فراوانی ایجاد می‌کنند ولی باکتری‌ها به راحتی می‌توانند این مواد آلی را به ترکیبات مفیدی چون پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها تبدیل نمایند. تحقیقات Ahn و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ثابت نمود که نسبت بالای کربن به نیتروژن در پسماندها و فاضلاب‌ها شرایط مناسبی برای تولید و ذخیره‌سازی پلیمر زیستی توسط باکتری *میها* می‌کند (Ahn et al., 2015). پیش از آن، Goff و همکاران در سال ۲۰۰۷ با رشد باکتری *Pseudomonas putida* بر روی پساب صنایع پلاستیک‌های نفتی و بهینه‌سازی خوراک‌دهی توانستند به میزان ۴۲٪ ماده خشک سلولی، پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید کنند (Goff et al., 2007). نتایج Bosco و Chiampo در سال ۲۰۱۰ نشان داد که غلظت پلیمر زیستی تولیدی در پساب صنایع لبنی و با کمک باکتری‌های لجن فعال کمتر از ۰/۵ گرم بر لیتر است (Bosco & Chiampo, 2010). Yuan در سال ۲۰۲۰ با رشد باکتری‌های لجن فعال در پساب شهری به تولید پلیمر زیستی با میزان ۱۵٪ وزن خشک سلول‌ها دست یافت (Yuan et al., 2020). این در حالی است که غلظت کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات تولید شده توسط سویه *B.cereus* مورد بررسی در محیط کشت پساب نشاسته‌ای بدون اعمال شرایط بهینه‌سازی، برابر با ۳/۰۷ گرم در لیتر (۵۹٪/۵ وزن خشک سلولی) است (Sinaei et al., 2021). بنابراین سویه غربال شده دارای توانایی بالایی جهت تولید پلیمر زیستی در محیط ارزان‌قیمت پساب دارا است.

عوامل موثر بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی با روش پلاکت-برمن

به منظور دستیابی به محیط کشت بهینه، عوامل موثر با روش پلاکت برمن مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانگونه که در شکل ۴ قابل مشاهده است فقط عامل رسوب گذاری محیط کشت عامل موثر است. این نتایج نشان می‌دهد که با روش RSM نمی‌توان به میزان تولید بالاتری نسبت به شرایط محاسبه شده محیط کشت صنعتی مورد استفاده دست یافت. به همین منظور و به دلیل اینکه محیط کشت مورد استفاده محیطی کمپلکس بوده و احتمال برهم کنش بین عامل‌ها وجود دارد، تمامی عوامل مورد بررسی به روش تک عاملی نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۴: نمودار پرتو و عوامل تاثیرگذار بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی

بررسی تاثیر نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت صنعتی

از آنجایی که تولید و ذخیره سازی پلیمر زیستی در شرایط محدودیت نیتروژن و وجود مقدار کافی کربن القا می‌گردد، نسبت بالای کربن به نیتروژن می‌تواند بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی موثر باشد. نتایج آنالیز پساب نشاسته‌ای در مراحل مختلف رسوب گذاری نشان می‌دهد که جداسازی رسوب تاثیر بسزایی بر کاهش میزان نیتروژن موجود در محیط کشت دارد. این نتایج در جدول ۲ نمایش داده شده است. در مرحله بعد میزان رشد و تولید سویه *B. cereus* در محیط‌های کشت مذکور مقایسه گردید. نتایج نشان داد بهترین شرایط تولید در محیط کشت با نسبت ۶ به ۱ کربن به نیتروژن حاصل می‌شود که حاصل رسوب گذاری کامل پساب نشاسته‌ای است. نتایج حاصل در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲: ارزیابی میزان کربن و نیتروژن محیط کشت صنعتی در شرایط مختلف رسوب‌گذاری

پساب نشاسته‌ای	نیتروژن کل (گرم در لیتر)	قند کل (گرم در لیتر)
بدون رسوب‌گذاری	۲۱/۳±۰/۶	۱۹/۱±۰/۳
رسوب‌گذاری جزئی	۱۱/۷±۰/۳	۱۸/۴±۰/۴
رسوب‌گذاری کامل	۲/۹±۰/۴	۱۸/۱±۰/۳

جدول ۳: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در محیط کشت صنعتی

پساب نشاسته‌ای	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی آلکانوات		درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
		تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)		
بدون رسوب‌گذاری	۰/۹۰۲±۰/۰۶۰ ^a	۰/۲۶۸±۰/۰۲۲ ^a	۳۹	۲۹/۷۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰۱ ^a
رسوب‌گذاری جزئی	۵/۲۲۶±۰/۰۷۱ ^b	۱/۱۸۹±۰/۰۴۱ ^b	۳۰	۲۰/۸۴	۰/۰۳۹۶±۰/۰۰۰۰۷ ^b
رسوب‌گذاری کامل	۵/۱۵۲±۰/۰۶۳ ^b	۳/۰۶۵±۰/۰۳۳ ^c	۲۱	۵۹/۴۹	۰/۱۴۵۹±۰/۰۰۰۱ ^c

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بر اساس نتایج جدول ۳، رسوب‌گذاری تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارا است. نکته جالب توجه اینجاست که در شرایط رسوب‌گذاری جزئی نیز میزان رشد سلولی با شرایط رسوب‌گذاری کامل مشابه است درحالی‌که بین میزان تولید پلیمر زیستی در این دو شرایط اختلاف معنی‌داری وجود دارد. این نتایج می‌تواند موید این مساله باشد که شرایط مناسب برای تکثیر سلول و تولید پلیمر زیستی توسط سویه مورد بررسی یکسان ناست. از آنجایی‌که عامل مورد مقایسه در صنایع میزان بهره‌وری

تولید یعنی مقدار پلیمر زیستی تولید شده در واحد زمان است، بنابراین شرایط رسوب‌گذاری کامل به عنوان بهترین محیط برای مراحل بعدی انتخاب می‌گردد. قابل توضیح است که در تمام موارد ذکر شده، آزمون دانکن اختلاف معنی داری را در سطح معنی داری ۵ درصد ($P \text{ value} < 0.05$) بین میانگین بهره‌وری‌ها نشان داد.

با توجه به نتایج می‌توان چنین استنباط نمود که یکی از علت‌های مناسب بودن محیط کشت پساب نشاسته جهت رشد باکتری *Bacillus cereus*، نسبت C/N این محیط کشت است. عامل C/N، یکی از عوامل مهم موثر بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات است. در این تحقیق، بر اساس نتایج جدول ۲ پساب نشاسته‌ای تیمار شده دارای C/N با نسبت در حدود ۶ به ۱ بود که نزدیک به بهترین نسبت برای تولید PHB در جنس باکتریایی باسیلوس بود که توسط محققان پیشنهاد شده است (Mohapatra et al., 2015). علاوه بر این پساب نشاسته حاوی مقادیر بالایی مواد آلی است که توسط باکتری‌ها تجزیه زیستی شده و به PHA تبدیل می‌شوند. همانطور که قبلاً توضیح داده شد، پساب نشاسته حاوی مقادیر زیادی قندهای کاهش یافته است که این ماده را به محیطی با ارزش برای فرایندهای تخمیر تبدیل می‌کند. همچنین، پساب رسوب‌گذاری شده دارای نسبت COD / BOD مناسب (۴/۵۷) برای رشد میکروبی بود. نتایج تحقیقات Bhuwal و همکارانش نشان داد که *Bacillus sp. NG220* در فاضلاب صنعت مقوا با نسبت COD / BOD بین ۳/۹ تا ۵ در ۷۲ ساعت، می‌تواند ۳/۹۵۱ گرم در لیتر PHB تولید کند (Bhuwal et al., 2014). در مطالعه حاضر، حداکثر میزان PHA تولیدی، (حدود ۶۰٪ وزن خشک سلولی و غلظت ۳/۰۷ گرم در لیتر) در ۲۱ ساعت با استفاده از پساب نشاسته‌ای رسوب‌گذاری شده بدست آمد (جدول ۳). بنابراین، بهره‌وری سویه *B. cereus* غربال شده در محیط کشت صنعتی مورد بررسی، تقریباً ۳ برابر بیشتر از گزارشات Bhuwal و همکاران است.

بررسی تاثیر رقت محیط کشت صنعتی

از آنجایی که میزان دسترسی باکتری به ترکیبات محیط کشت تاثیر مستقیمی بر رشد سلولی و تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارد، به منظور دستیابی به غلظت بهینه محیط کشت جهت تولید پلاستیک‌زیستی مربوطه، سه غلظت مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج در جدول ۴ نمایش داده می‌شود.

جدول ۴: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در غلظت‌های مختلف محیط کشت صنعتی

پساب نشاسته‌ای	وزن خشک	پلی‌هیدروکسی آلکانوات	زمان	تجمع	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
	سلول (گرم در لیتر)	ت تولید شده (گرم در لیتر)	(ساعت)	پلیمر	زیستی
بدون رقیق سازی	0.9 ± 0.31^a ۴/۸	$2/123 \pm 0.32^a$	۲۴	۵۱/۸۰	0.885 ± 0.001^a
رقت ۵۰٪	17 ± 0.71^b ۵/۶	$3/0.5 \pm 0.51^b$	۲۱	۵۸/۰۵	0.143 ± 0.001^b
رقت ۲۵٪	16 ± 0.63^b ۵/۲	$3/0.72 \pm 0.44^b$	۲۱	۵۹/۵۱	$1/1462 \pm 0.0009^b$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

همان‌گونه که مقایسه نتایج نمونه‌های رقیق شده پساب نشاسته‌ای (۵۰٪ و ۲۵٪) با نمونه اولیه رقیق نشده نشان می‌دهد، رقیق‌سازی تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارا است. احتمالا وجود ترکیبات خاص در پساب نشاسته و حتی غلظت بالای قند در محیط کشت پساب نشاسته بدون رقیق‌سازی مانعی برای رشد سلولی و تولید حداکثری پلی‌هیدروکسی آلکانوات است که با رقیق‌سازی به میزان ۵۰٪ این ممانعت برطرف می‌گردد. نکته مورد توجه این است که اختلاف معنی‌داری بین رقت‌های ۵۰٪ و ۲۵٪ مشاهده نمی‌شود و از آنجاییکه جهت تولید در مقیاس صنعتی، غلظت پایین‌تر محیط کشت ویژگی به حساب می‌آید، بنابراین رقت ۲۵٪ به عنوان بهترین رقت برای مراحل بعدی انتخاب گردید.

بررسی تاثیر نسبت حجم محیط کشت صنعتی به حجم کل ظرف

در این مرحله سه حجم مختلف ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر جهت دستیابی به بهترین نسبت حجم محیط کشت به حجم ارلن مورد بررسی قرار گرفت. این عامل تاثیر مستقیمی بر میزان هوادهی نمونه‌ها دارا است. نتایج این بررسی در جدول ۵ توضیح داده شده است.

جدول ۵: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در نسبت‌های مختلف محیط کشت صنعتی

نسبت حجم	وزن خشک	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات	زمان (ساعت)	تجمع	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
پساب	سلول (گرم در لیتر)	تولید شده (گرم در لیتر)		پلیمر	
نشاسته‌ای به					
حجم ارلن				زیستی	
۱ به ۲/۵	۳/۱۵۱±۰/۰۴۲ ^a	۱/۷۵۴±۰/۰۳۲ ^a	۲۴	۵۵/۶۶	۰/۰۷۳۱±۰/۰۰۰۲ ^a
۱ به ۵	۵/۱۶۲±۰/۰۳۱ ^b	۳/۰۹±۰/۰۵۱ ^b	۲۱	۵۹/۸۶	۰/۱۴۷۱±۰/۰۰۰۱ ^b
۱ به ۱۰	۵/۲۳۵±۰/۰۵۰ ^b	۳/۰۷۹±۰/۰۴۵ ^b	۲۱	۵۹/۴۹	۰/۱۴۶۷±۰/۰۰۰۲ ^b

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

همانگونه که جدول ۵ نشان می‌دهد بهره‌وری در نسبت‌های ۱ به ۵ و ۱ به ۱۰ حجم محیط کشت پساب نشاسته‌ای به حجم ارلن اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد. دلیل این امر می‌تواند هوادهی کافی جهت تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در نسبت ۱ به ۵ باشد. هوادهی بالاتر سرعت رشد سلولی را افزایش داده است ولی روی میزان تولید پلیمر تأثیری نداشته است. از طرف دیگر، مقایسه نتایج میزان بهره‌وری این نسبت‌ها با نسبت ۱ به ۲/۵ اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. بررسی داده‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که نسبت ۱ به ۲/۵ برای حجم محیط کشت پساب نشاسته‌ای به حجم ارلن، نسبت پایینی بوده که منجر به هوادهی ناکافی و در نتیجه پایین آمدن نرخ رشد سلولی و هم‌چنین کاهش میزان تولید پلیمر زیستی شده است. بنابراین با توجه به اینکه نسبت ۱ به ۱۰، منجر به کاهش حجم محیط کشت موثر و بالارفتن هزینه‌های جانبی تولید می‌گردد و بصرفه اقتصادی ناست، در این پژوهش نسبت ۵ برابری ظرف به محیط کشت به عنوان نسبت بهینه تعیین گردید.

بررسی تأثیر درصد تلقیح محیط پیش کشت به محیط کشت صنعتی

در این قسمت از پژوهش تأثیر میزان مایه تلقیح بر بهره‌وری تولید سنجیده شد. به همین منظور در مرحله انتقال سلول‌های در حال تقسیم از محیط پیش کشت به محیط کشت تولید، درصدهای مختلف حجمی ۱، ۵ و ۱۰ درصد از این محیط به محیط کشت صنعتی تلقیح گردید. نتایج این بررسی در جدول ۵ نمایش داده شده است.

جدول ۶: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در درصدهای مختلف تلقیح از محیط پیش

کشت به محیط کشت صنعتی

درصد تلقیح از					
محیط پیش کشت به محیط کشت تولید	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱	167 ± 0.42^a	3.085 ± 0.062^a	۲۱	۵۹/۷۰	1469 ± 0.0002^a
۵	۵				۰
۵	176 ± 0.35^a	3.067 ± 0.053^a	۲۱	۵۹/۲۵	0.146 ± 0.0001^a
۵	۵				
۱۰	161 ± 0.54^a	3.078 ± 0.043^a	۲۱	۵۹/۶۳	1466 ± 0.0002^a
۵	۵				۰

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۶ نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین درصدهای مختلف تلقیح محیط پیش کشت وجود نداشته و این عامل نمی‌تواند بعنوان عامل موثر مورد توجه قرار گیرد. دلیل این مساله سرعت بالای رشد و پایین بودن زمان تکثیر سلولی باکتری *Bacillus cereus* است. تعداد این باکتری در مدت زمان حدود ۱۸ دقیقه دو برابر می‌شود. بنابراین این اختلاف غلظت در مدت کوتاهی جبران شده و در روند تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات آن تاثیر قابل توجهی ایجاد نمی‌کند.

بررسی تاثیر تولید پلیمر زیستی با افزودن ترکیبات محرک تولید به محیط کشت

در این مرحله تاثیر افزودن ترکیباتی که در سایر مقالات بعنوان ترکیبات موثر بر افزایش تولید اشاره شده است، مورد بررسی قرار گرفت. اتانول و استات سدیم با نسبت‌های مختلف به محیط کشت تولید اضافه شده و اثر آن بر میزان تولید و بهره‌وری مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۷: بررسی اثر افزودن ترکیبات اضافی به محیط کشت صنعتی بر میزان تولید پلیمر زیستی

وزن خشک	ماده افزودنی	مقدار	سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
استات سدیم	۱	۵	1868 ± 0.42^a	310.8 ± 0.33^a	۲۱	۵۲/۴۹	146 ± 0.0003^a
(گرم بر لیتر)	۰	۵					۰/۶
استات سدیم	۲	۶	204 ± 0.33^b	310.77 ± 0.43^a	۲۱	۴۹/۶	146 ± 0.0001^a
(گرم بر لیتر)							۰/۵
اتانول (میلی لیتر)	۱	۵	171 ± 0.35^c	310.65 ± 0.34^a	۲۱	۵۹/۲۷	145 ± 0.0003^a
یتر بر لیتر)							۰/۹
اتانول (میلی لیتر)	۱۰	۵	163 ± 0.54^c	310.72 ± 0.45^a	۲۱	۵۹/۵۰	146 ± 0.0003^a
یتر بر لیتر)							۰/۲

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۷ نشان می‌دهد افزودن ترکیبات افزودنی تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید یا بهره‌وری تولید پلیمر زیستی مورد بررسی نداشته است. البته افزودن استات سدیم تا حدی بر میزان تکثیر سلول باکتری موثر بوده و میزان وزن خشک سلولی را افزایش داده است ولی تاثیر مثبتی بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی والرات مورد بررسی نداشته است. این مشاهدات با نتایج تحقیقات Mothes و همکاران همخوانی ندارد که دلیل آن می‌تواند به این دلیل باشد که محیط کشت مورد بررسی کمپلکس بوده و دارای ترکیبات زیادی است (Mothes et al., 1997). بنابراین این نتایج موید این موضوع است که این محیط کشت صنعتی ارزان‌قیمت نیاز به این مواد افزودنی نداشته و احتمالا ترکیبات مشابهی در محیط مورد بررسی وجود دارد که از مزایای این محیط کشت صنعتی به‌شمار می‌آید. از طرف دیگر نتایج Anderson و همکاران و Mothes نشان داد که ترکیباتی چون اتانول که با اعمال اثر مهارتی خود بر تکثیر سلولی، مسیر سنتز پلی‌هیدروکسی آلکانوات را تقویت می‌کنند فقط زمانی می‌توانند موثر باشند که تولید پلیمر همراه رشد سلولی اتفاق نیافتد. با توجه به منحنی‌های رشد و تولید سویه مذکور، سنتز پلی‌هیدروکسی آلکانوات وابسته به رشد بوده و با توجه به غنی بودن محیط کشت نتایج حاصل قابل انتظار است (Anderson & Dawes, 1990., Mothes et al., 1998).

بررسی تاثیر میزان هوادهی بر بهره‌وری تولید پلیمر در محیط کشت صنعتی

به منظور افزایش میزان بهره‌وری تولید پلیمر زیستی، هوادهی بالاتر بعنوان عامل موثر احتمالی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج در جدول ۸ نمایش داده شده است.

جدول ۸: بررسی اثر هوادهی بر میزان تولید پلیمر زیستی

دور بر	وزن خشک	پلی‌هیدروکسی آلکانوات	زمان (ساعت)	درصد	بهره‌وری (گرم بر
دقیقه	سلول (گرم در	تولید شده (گرم در لیتر)	تجمع	لیتر در ساعت)	
	لیتر)		پلیمر		
			زیستی		
۱۲۰	۵/۱۷۱±۰/۰۴۲ ^a	۳/۰۷۲±۰/۰۴۳ ^a	۲۱	۵۹/۴۱	۰/۱۴۶۳±۰/۰۰۰۳ ^a
۲۰۰	۵/۵۶۸±۰/۰۵۳ ^b	۳/۰۸۳±۰/۰۵۱ ^a	۲۱	۵۵/۳۷	۰/۱۴۶۸±۰/۰۰۰۴ ^a
	۵				

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۸ نشان می‌دهد که افزایش هوادهی تاثیر معنی‌داری بر افزایش سرعت تکثیر سلولی دارا است ولی بر افزایش

درصد تولید و بهره‌وری آن اثر معنی‌داری ندارد. بنابراین با توجه به سویه منتخب و محیط کشت صنعتی مورد استفاده، عامل هوادهی

نمی‌تواند بعنوان عامل موثر انتخاب گردد.

بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی در سویه برتر با روش کشت با تراکم سلولی بالا

بررسی تاثیر زمان انتقال توده سلولی به محیط کشت صنعتی تازه

در این بخش از تحقیق حاضر، به کمک منحنی رشد باکتری *B. cereus* و تولید پلیمر زیستی در فازهای مختلف رشد،

بهترین زمان انتقال توده سلولی حاصل به محیط کشت صنعتی تازه بررسی شد. به این منظور، انتقال توده سلولی در سه زمان ابتدای

فاز لگاریتمی، اواسط فاز لگاریتمی و فاز سکون رسوب‌گذاری و در شرایط آسپتیک به محیط کشت تازه منتقل و اثر آن بر افزایش

بهره‌وری تولید پلاستیک زیستی، مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نمودار رشد باکتری، ساعت‌های ۶، ۱۲ و ۲۷ جهت بررسی انتخاب گردید و نتایج حاصل از انتقال سلول‌ها به محیط کشت صنعتی تازه در جدول ۹ نمایش داده شده است.

جدول ۹: تاثیر زمان اعمال روش کشت با تراکم سلولی بالا بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمر زیستی در سویه *B. cereus*

وزن خشک	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات	زمان	درصد	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
زمان	سلول (گرم در لیتر)	تولید شده (گرم در لیتر)	تجمع پلیمر زیستی	لیتر در ساعت)
ابتدای فاز				
لگاریتمی	۵/۳۷۱±۰/۰۳۳ ^a	۳/۱۷۷±۰/۰۴۳ ^a	۲۱	۵۹/۱۵
(ساعت)				
(۶				
اواسط فاز				
لگاریتمی	۶/۱۶۸±۰/۰۴۵ ^b	۴/۴۴۳±۰/۰۴۴ ^b	۲۴	۷۲/۰۳
(ساعت)				
(۱۲				
فاز				
سکون	۵/۵۳۸±۰/۰۳۷ ^c	۲/۷۷۸±۰/۰۴۰ ^c	۲۷	۵۰/۱۶
(ساعت)				
(۲۷				

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۹ نشان می‌دهد که اولاً روش انتقال سلول‌های جوان (قبل از ورود به فاز سکون) به محیط کشت تازه بسیار موثر است و باعث افزایش وزن خشک سلولی و میزان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده می‌شود. این نتایج با مشاهدات Bourque و همکارانش کاملاً منطبق است (Bourque et al., 1995). مقایسه سایر نتایج نشان می‌دهد که این تاثیر بر سلول‌های فاز لگاریتمی بسیار بیشتر بوده و انتقال سلول‌ها در این فاز که دقیقاً زمان تولید و ذخیره سازی پلیمر زیستی در سویه مورد نظر نیز است، اثر افزایشی

موثری بر میزان تولید پلاستیک‌زیستی و بهره‌وری آن داشته است. تا جایی که بیش از ۷۰٪ وزن خشک سلولی را پلیمرزیستی تولید شده تشکیل داده است. بنابراین بهترین زمان انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی به محیط کشت صنعتی تازه، فاز لگاریتمی رشد است.

بررسی تاثیر غلظت توده سلولی منتقل شده بر میزان بهره‌وری تولید

در این مرحله، محدوده وسیعی از توده سلولی با ۳ نسبت متفاوت ۱:۱/۲، ۱:۱ و ۱:۲ به محیط کشت صنعتی تولید اضافه و با اندازه‌گیری میزان تولید پلیمر زیستی در فواصل زمانی و محاسبه بهره‌وری، بهترین غلظت سلولی محاسبه گردید.

جدول ۱۰: تاثیر نسبت توده سلولی منتقل شده بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمرزیستی در سویه *B. cereus*

نسبت توده سلولی	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱:۱/۲	۵/۶۱۱±۰/۰۴۲ ^a	۳/۸۴۲±۰/۰۳۱ ^a	۳۲	۶۸/۴۷	۰/۱۲۰±۰/۰۰۰۳ ^a
۱:۱	۶/۱۵۴±۰/۰۵۳ ^b	۴/۴۵۸±۰/۰۴۳ ^b	۲۴	۷۲/۴۴	۰/۱۸۵۷±۰/۰۰۰۲ ^b
۱:۲	۶/۷۳۳±۰/۰۴۰ ^c	۳/۳۸۴±۰/۰۴۱ ^c	۲۱	۵۰/۲۵	۰/۱۶۱۱±۰/۰۰۰۳ ^c

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۱۰ نشان می‌دهد که نسبت توده سلولی انتقال یافته از محیط کشت تولید اولیه به محیط کشت تازه، تاثیر معنی‌داری بر روی میزان بهره‌وری تولید دارد. در شرایط انتقال نیمی از سلول‌های محیط کشت اولیه، به دلیل پایین بودن غلظت سلولی، سلول‌ها در محیط کشت تازه شروع به تکثیر نموده و این مساله باعث تاخیر در زمان تولید حداکثری پلیمر می‌گردد (ساعت ۳۲). این در حالی است که هنگامی که نسبت ۱:۱ اعمال می‌گردد، سلول‌های باکتری در مدت ۲۴ ساعت به حداکثر تولید و بهره‌وری که اختلاف معنی‌داری با نسبت‌های دیگر دارا است، می‌رسد. نکته جالب توجه این است که در نسبت تلقیح بالاتر (۱:۲)، زمان تولید حداکثری پایین آمده که دلیل آن می‌تواند غلظت بالای سلولی باشد. از طرف دیگر، نتایج نشان می‌دهد که با وجود وزن خشک بالاتر، درصد تجمع پلیمر پایین‌تری حاصل شده است. این نتایج نشان می‌دهد باکتری‌ها پس از نامساعد شدن شرایط رشد محیط کشت، از پلیمر ذخیره شده بعنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. بنابراین در نسبت ۱:۲، غلظت بالای سلولی باعث شده است که سلول‌ها

سریع‌تر وارد فاز سکون تولید شده و همزمانی تولید و مصرف پلیمر باعث کاهش میانگین تولید و درصد تجمع پلیمر گردد. بنابراین بهترین غلظت انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی به محیط کشت صنعتی تازه، نسبت ۱:۱ است.

بررسی تاثیر نوع محیط پیش کشت بر میزان بهره‌وری تولید

به منظور ارزیابی تاثیر نوع محیط پیش کشت، یک مرحله عقب‌تر رفته و دو نوع محیط پیش کشت جهت فعال نمودن سلول‌ها قبل از ورود به مرحله تولید مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از آن‌ها محیط Nutrient broth، و دیگری محیط پساب نشاسته‌ای مشابه با محیط کشت تولید است. نتایج درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید در جدول ۱۰ نمایش داده شده است.

جدول ۱۱: تاثیر نوع محیط پیش کشت بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمر زیستی در سویه *B. cereus*

نوع محیط	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
Nutrient broth	۶/۱۸۴±۰/۰۴۳ ^a	۴/۴۷۲±۰/۰۵۴ ^a	۲۴	۷۲/۳۱	۰/۱۸۶۳±۰/۰۰۰۲ ^a
پساب نشاسته‌ای	۵/۷۴۶±۰/۰۵۲ ^b	۳/۶۶۲±۰/۰۴۱ ^b	۲۴	۶۳/۷۳	۰/۱۵۲۶±۰/۰۰۰۳ ^b

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های رشد یافته در محیط پیش کشت Nutrient broth دارای توانایی تولید بالاتری نسبت به باکتری‌های تکثیر یافته در محیط مشابه تولید یعنی پساب نشاسته‌ای هستند. این نتایج موید این نکته است که شرایط رشد سلول‌ها قبل از ورود به محیط کشت تولید بر میزان تولید آن‌ها موثر است.

نتایج فوق نشان می‌دهد اولاً روش انتقال سلول‌ها به محیط کشت تازه بسیار موثر است و دیگر اینکه بهترین زمان انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی، فاز لگاریتمی بوده و محیط پیش کشت انتخابی، محیط Nutrient broth است. مقایسه نتایج

مؤید این مطلب است که حتی با وجود افزایش زمان تخمیر به مدت ۳ ساعت در شرایط کشت با تراکم سلولی بالا نسبت به شرایط بهینه قبلی، چون میزان تولید پلی‌هیدروکسی والرات به میزان قابل ملاحظه‌ای (حدود ۴۵ درصد) افزایش یافته‌است، اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که روش کشت با تراکم سلولی بالا در تولید پلی‌هیدروکسی والرات بوسیله سویه *B. cereus* بسیار اثربخش بوده و بهره‌وری تولید را به میزان چشمگیری افزایش می‌دهد که با نتایج تحقیقات Yamane و همکارانش کاملاً هم خوانی دارد (Yamane & Shimizu, 1984). ایشان نشان دادند که این روش برای سویه‌هایی که تولید پلیمر زیستی با رشد و تکثیر سلولی همراه است، مؤثر بوده و تأثیر بسزایی بر بالابردن میزان بهره‌وری تولید داراست. در سال ۲۰۱۳ نیز Kanjanachumpol و همکارانش نشان دادند که با استفاده از این روش، درصد تجمع پلی‌هیدروکسی بوتیرات در باکتری *B. megaterium* حدود ۲ برابر افزایش یافته‌است (Kanjanachumpol et al., 2013). نتایج مشابهی توسط Nygaard و همکارانش در سال ۲۰۲۱ به چاپ رسید که نشان می‌دهد استفاده از این روش، باعث افزایش بیش از دوبرابری میزان تجمع پلی‌هیدروکسی بوتیرات در سلول‌های *Cupriavidus necator* شده است (Nygaard et al., 2021). با در نظر گرفتن مجموع نتایج، تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا جهت بهینه‌سازی تولید و بهره‌وری کوپلیمر ارزشمند پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات توسط سویه *B. cereus* مورد بررسی، بسیار کارآمد بوده و میزان تولید را از حدود ۳/۰۷ g/l (معادل ۵۹/۵٪ وزن خشک سلول) به مقدار ۴/۴۵ g/l (بیش از ۷۲٪ وزن خشک سلول) افزایش داده است. این نتایج به همراه اهمیت بالای این نوع پلیمرزیستی از یک سو و بکارگیری پساب به‌عنوان محیط کشت مورد استفاده از سوی دیگر بر این مهم اشاره دارد که سویه غربال‌شده پتانسیل تولید صنعتی پلیمرزیستی پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات را دارا است.

منابع

- Ahn, J., Jho, E.H. and Nam, K. (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Env Eng Res*, 20(3): 246-253.
- Akaraonye, E., Keshavarz, T. and Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol*, 85: 732-743.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*, 54: 450-472.
- Aragão, G. M.F., Schmidell, W., Ienczak J. L. and Fischer S.A. (2009). Preparation of polyhydroxyalkanoates from a citric residue. *PCT - WO2009/149529 A1*.

- Batcha, A.F.M., Prasad, D.M.R., Khan, M.R. and Abdullah, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37: 943–951.
- Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V. and Yadav, A. (2014). Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. *Bioresour. Bioprocess*, 1, 9.
- Bosco, F. and Chiampo, F. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge Production of bioplastics using dairy residues. *J. Biosci. Bioeng*, 109: 418–421.
- Bourque, D., Pomerleau, Y. and Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44: 367–376.
- Dalcanton, F., Ienczak, J.L., Fiorese, M.L., Aragão, G.M.F. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in hydrolyzed rice starch medium with soybean oil supplementation at different temperatures. *Química Nova*, 3, n. 33, 552-556.
- Goff, M., Ward, P.G., and O'Connor, K.E. (2007). Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: a nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. *J Biotechnol*, 132: 283–286.
- Guillet, J. (2004). *Plastics and environment*. In: Scott G (ed) *Degradable polymers: principles and applications*. 2nd edn. Kluwer, New York, pp 1254–1263.
- Hahn, SK, Chang, YK, Kim, BS, Lee, KM, Chang, H.N. (1993) The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology Techniques*, 7(3): 209-212.
- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36 (10): 1463-1474.
- Law, J, Slepecky, R.A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1):33–36.
- Lenz, R.W. and Marchessault, R.H. (2005). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*, 61:1–8.
- Mohan, S., Oluwafemi, O.S., Kalarikkal, N., Thomas, S. and Songca, S.P. (2016). Biopolymers–application in nanoscience and nanotechnology. *Recent Adv. Biopolymers*, 47.
- Mohapatra, S., Mohanta, P.R., Sarkar, B., Daware, A., Kumar, C. and Samantaray, D.P. (2015). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* Strain isolated from waste water

- and its biochemical characterization. Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci, 87(2): 459–466.
- Mothes, G., Rivera, H.S., and Babel, B. (1997). Competition between β Ketothiolase and Citrate Synthase during Poly(β -hydroxybutyrate) Synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*, Arch. Microbiol., 166: 405-410.
- Mothes, G., Ackermann, J.U., and Babel, W. (1998). Regulation of Poly(β -hydroxybutyrate) Synthesis in *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 Growing on Methanol or Fructose, Arch. Microbiol., 169: 360-363.
- Nygaard, D., Yashchuk, O., Nosedá, D.G., Araoz, B. and Hermida, E.B. (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. J.heliyon 7, e05979.
- Pal, A., Parbhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Pannamma, V. and Shivakumar, S. (2002). Optimization of Process Parameters for Maximum Poly (β) hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. Polish Journal of Microbiology, 2: 149-154.
- Sinaei, N., Zare, D. and Azin, M. (2021). Production and characterization of poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in wheat starch wastewater and its potential for nanoparticle synthesis. Brazilian Journal of Microbiology: 52(2): 561-573. DOI: 10.1007/s42770-021-00430-5.
- Yuan, Q., Sparling, R. and Oleszkiewicz, J. (2020). Polyhydroxybutyrate Production from Municipal Wastewater Activated Sludge with Different Carbon Sources. J. Air, Soil and Water Research, 8(1).
- Yamane, T. and Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. Adv Biochem Eng Biot, 30: 147–194.

Investigation of effective factors on optimization of biopolymer production of polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) by Plackett–Burman method and optimization of productivity by high cell density technique

N. Sinaei¹, D. Zare*, M. Azin³

Received: 2020.5.27

Accepted: 2021.7.19

Abstract

PHAs are biodegradable and biocompatible polymers produced by a wide range of bacteria. In the present study, the wild strain of *Bacillus cereus* producing polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) copolymer with high productivity, isolated from starch effluent was used. To produce, starch effluent was studied as a cheap medium. Then, the optimal composition of the culture medium was evaluated and in order to achieve higher productivity, the high cell density method was evaluated. The results showed the maximum production of PHBV using Plackett–Burman test design was about 59.5% of CDW. Subsequently, by optimizing culture with high cell density, the production rate increased to more than 72% of CDW. Therefore, the high cell density has a significant effect on increasing the productivity of PHBV production by *B. cereus*. Due to the use of cheap culture medium, the importance of these results is twofold and shows the potential for production on an industrial scale.

Keywords: *Bacillus cereus*, polyhydroxybutyrate-co-valerate, Plackett–Burman method, PHBV, starch wastewater,

¹PhD Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

(* Corresponding author: zare@irost.ir)

³Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

بررسی تأثیر آللوپاتی عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) بر مؤلفه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی چچم (*Lolium rigidum*)

عبدا... عطایی^۱؛ ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری^{۲*}؛ زینب اورسجی^۲؛ علی راحمی کاریزکی^۲

چکیده

هدف از این تحقیق، ارزیابی پتانسیل آللوپاتیک عصاره آبی اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل علف‌هرز شاتره بر مؤلفه‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاهچه چچم در شرایط کشت هیدروپونیک بود. ابتدا سوسپانسیون ۵ درصد به تفکیک از اندام‌ها با کمک آب مقطر تهیه شد و سپس محلول سوسپانسیون حاصل (عصاره) بر گیاهچه‌های ۷ روزه چچم اعمال شد. مطابق نتایج، عصاره اندام‌های مختلف شاتره اثر بازدارندگی معنی‌داری بر شاخص‌های رشد طول ریشه و وزن خشک گیاهچه، مقدار کلروفیل *b* کل و کاروتنوئیدهای چچم داشتند. در اکثر موارد، بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره برگ و گل بود. مقدار پرولین، قندهای محلول و ترکیبات فنلی در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. بیشترین افزایش این ترکیبات در عصاره برگ و گل شاتره به دست آمد. بنابراین با شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده متابولیت‌های ثانویه شاتره و آزمایش بر سایر گونه‌ها شاید بتوان کاندیدی برای تولید علفکش طبیعی و یا مدلی برای سنتز علفکش‌ها پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: چچم، شاتره، شاخص‌های رشد، مقدار پرولین، مقدار کلروفیل.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته شناسایی و مبارزه با علف‌های هرز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۲. استادیاران گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس *نویسنده مسئول: eg.alamdari@gonbad.ac.ir

مقدمه

علف‌های هرز بر اثر رقابت با گیاهان زراعی، خسارت اقتصادی فراوانی به نظام‌های زراعی وارد می‌کنند و به‌طور کلی موجب کاهش ۴۵ تا ۹۵ درصدی تولید گیاهان زراعی در سطح جهانی می‌شوند (Jabran *et al.*, 2015). استفاده گسترده و وابستگی شدید به علفکش‌های شیمیایی باعث بروز مشکلاتی مانند مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها و اثرات سوء این علف‌کش‌ها بر سلامتی انسان و محیط زیست شده‌است (Hassannejad & Porheidar Ghafarbi, 2013; Rassaeifar *et al.*, 2013). در این راستا استفاده از ویژگی آللوپاتی گیاهان (آلوکمیکال‌ها) می‌تواند نقش مهمی در مدیریت و کنترل علف‌های هرز ایفا کند. این گیاهان از طریق تولید و ترشح متابولیت‌هایی که به محیط اطراف خود رها می‌کنند، تأثیر منفی بر جوانه‌زنی و رشد علف‌های هرز مجاور گذاشته و از این طریق رشد و تراکم آن‌ها را محدود می‌کنند. لذا استفاده از این گیاهان و یا بقایای آن‌ها می‌تواند موجب کاهش مصرف علفکش‌ها شود (قرنجیک و همکاران، ۱۳۹۲؛ Peerzada *et al.*, 2016; Gholamalipour Aalamdari & Deokule, 2009). تراوشات آلوکمیکال‌ها بعضی از گیاهان به محیط اطراف، از آن رو که بر رشد گیاهان مجاورشان اثرگذار است (آلوپاتی) به‌عنوان آلوکمیکال شناخته می‌شود. این مواد به‌صورت محلول، در اثر شستشو از گیاه، ترشحات ریشه‌ای، به‌صورت گاز از سطح گیاه و تجزیه بقایای باقی‌مانده در سطح خاک در محیط آزاد می‌گردند (Tigre *et al.*, 2012). اثرگذاری آلوکمیکال‌ها بر رشد گیاهان می‌تواند شامل هر دو اثر تحریک‌کننده و یا بازدارنده باشد (Ma *et al.*, 2011; Makoi & Nadakidemi, 2012). متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئید تام دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد هستند که در تمام قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (Sottero *et al.*, 2019). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضدالتهاب هستند (فاضلی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۶). از سوی دیگر غلظت بالای ترکیبات فنلی سبب مهار جوانه‌زنی بذر، ممانعت از رویش گیاهان و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود (عسگرانی و براتی، ۱۳۹۷). چچم با نام علمی *Lolium rigidum* Guad از خانوادهٔ گندمیان است و در حال حاضر به‌طور گسترده در سراسر مناطق جهان پراکنده شده‌است. این گیاه یکی از مهم‌ترین علف‌هرز کشیده برگ مزارع گندم ایران محسوب می‌شوند. ماس و همکاران (Moss *et al.*, 2019) گزارش نمودند که علف‌های هرز چچم، تاج‌خروس، علف‌اسب و کیسه‌کشیش از مشکل‌سازترین گونه‌های مقاوم به علف‌کش در دنیا هستند. گزارش‌های محققین نشان می‌دهد که تحقیقات در رابطه با اثر آللوپاتیک علف‌های هرز بر سایر گیاهان زیاد است، اما تحقیقات در مورد اثر آللوپاتیک شاتره بسیار ناچیز است. در این زمینه الا و همکاران (Ullah *et al.*, 2013) با بررسی اثر عصاره آبی اندام‌های ریشه، ساقه، برگ، میوه و کل اندام‌های علف‌هرز شاتره هندی (*Fumaria indica* L.) بر خصوصیات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای گندم، نخود، عدس و کلزا گزارش نمودند که عصاره آبی اندام برگ شاتره هندی بیشترین اثر بازدارندگی بر خصوصیات

جوانه‌زنی و رشدی گیاهان مورد بررسی داشتند. جوبین و احمد (Jabeen & Ahmed, 2009) گزارش نمودند که بقایای علف‌هرز شاتره هندی دارای پتانسیل دگرآسیبی بر ظهور و رشد گیاهچه‌ای ذرت است. شاتره از علف‌های هرز مهم و رایج مزارع خانواده‌های غلات، بقولات و خردل در استان گلستان به‌ویژه شرق استان است. لذا کشاورزان هر ساله به‌دلیل هجوم این علف‌هرز مجبور به استفاده زیاد از سموم شیمیایی می‌باشند که این امر موجب شکل‌گیری بیوتیپ‌های مقاوم و آلودگی شدید محیط زیست می‌گردد. از سوی دیگر اصولاً در شرایط مزرعه این گیاه اجازه رشد به گیاهان مجاور خود را نمی‌دهد. بنابراین با توجه به زیست توده بالای علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) در مزرعه و عدم بهره‌برداری از آن، هدف از این تحقیق، ارزیابی توان آللوپاتیک اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مؤلفه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه چچم (*Lolium rigidum*) در مرحله گل‌دهی بود.

مواد و روش‌ها

مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری علف‌هرز شاتره

برای آزمایش، علف‌هرز شاتره در مرحله گل‌دهی از حومه شهرستان گنبدکاوس، با مختصات جغرافیایی ۵۵ درجه و ۱۵ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه عرض شمالی و ۴۵ متر ارتفاع از سطح دریا، متوسط بارندگی ده ساله در حدود ۴۱۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شد.

شناسایی و آماده‌سازی علف‌هرز شاتره برای آزمایش آللوپاتی

در ابتدا نمونه علف‌هرز شاتره با کمک فلور رنگی ایران (قهرمان، ۱۳۷۵) شناسایی شد و سپس به‌تفکیک، اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل از یکدیگر جدا گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ ثانیه با آب مقطر شسته شدند. پس از نیمه پژمرده شدن، نمونه‌ها تا رسیدن به وزن ثابت در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک گردیدند (Caceres, 2000). سپس نمونه‌ها توسط آسیاب با مش ۸ (تعداد مربع و یا ذرات الک در یک اینچ) پودر شدند. سپس اثر آللوپاتیک اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مؤلفه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی علف‌هرز چچم مورد آزمایش قرار گرفت. این آزمایش در محیط کشت هیدروپونیک در آزمایشگاه علوم علف‌های هرز دانشگاه گنبدکاوس به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۶ انجام شد.

تهیه عصاره آبی علف‌هرز شاتره، نحوه آماده‌سازی و کشت هیدروپونیک چچم

علف‌هرز شاتره به دلیل دارا بودن عامل هیدروکسی دارای حلالیت بالا در آب است، لذا از حلال آب برای عصاره‌گیری استفاده شد. ابتدا ۵ گرم از هر یک از اندام‌ها شامل ریشه، ساقه، برگ و گل به تفکیک با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و بر روی دستگاه لرزاننده به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ (مدل NF 200) گردید. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. نحوه آماده‌سازی و کشت هیدروپونیک چچم بدین صورت بود که ابتدا بذره‌ای گواهی شده چچم از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد ضدعفونی شد. سپس برای چندین مرتبه با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفت. بذره‌ای ضدعفونی شده این گیاه در پتری جوانه‌زده و ریشه گیاهچه‌های ۷ روزه از داخل توری‌های تعبیه شده در دهانه هر تشت حاوی چهار لیتر محلول غذایی یوشیدا (Yoshida et al., 1976) که شامل ۹۱/۴ گرم نیترات آمونیم، ۳۵/۶۰ گرم فسفات سدیم، ۷۱/۴۰ گرم سولفات پتاسیم، ۱۱۷/۳۵ گرم کلرید کلسیم و ۳۲۴ گرم سولفات منیزیم به عنوان عناصر درشت مغذی و ۱/۵۰ گرم کلرید منگنز، ۰/۰۷ گرم مولیبدات آمونیم، ۰/۰۴ گرم سولفات روی، ۰/۹۳ گرم اسید بوریک، ۰/۰۳ گرم سولفات مس، ۷/۷۰ گرم کلرید آهن و ۱۱/۹۰ گرم اسید سیتریک به عنوان عناصر ریز مغذی به محیط کشت با pH ۵/۵ منتقل شدند. پس از اعمال عصاره اندام‌ها (۶۰ میلی‌لیتر عصاره در چهار لیتر محلول غذایی)، گیاهچه‌ها به مدت دو هفته در این شرایط نگهداری شدند. گیاهچه‌های چچم در دمای محیط 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، اتافک رشد با روشنایی ۱۴۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگهداری شدند (سلیمی و قربانلی، ۱۳۸۰؛ Cadho & Rajender, 1995). محلول یوشیدا به فاصله هر ۷ روز یک‌بار تعویض و تیمارها مجدداً با غلظت قبلی اعمال شدند (Enteshari & Ahrabi, 2011). میزان pH هر دو روز یک‌بار تنظیم (pH 5.5) شد (شکل ۱). در انتهای آزمایش (مصادف با ۲۱ زادوکس) طول ریشه و وزن خشک گیاهچه‌ها با انتخاب ۲۷ نمونه از هر تشت به‌طور تصادفی اندازه‌گیری شد. مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل و کارتنوئیدها، آمینواسید پرولین، قندهای محلول و ترکیبات فنلی نیز اندازه‌گیری شدند.



شکل ۱: تصاویر علف‌های هرز، محلول غذایی یوشیدا و نحوه کشت هیدروپونیک علف‌هرز چچم روش اندازه‌گیری مقدار

رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها

بدین منظور مقدار ۵/۰ گرم از اندام‌های هوایی تازه چچم در هاون چینی ریخته، سپس با استفاده از نیتروژن مایع آن را خرد نموده و به خوبی له شد. ۲۰ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰ درصد به نمونه اضافه، سپس در دستگاه سانتریفیوژ (مدل NF 200) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به بالن شیشه‌ای منتقل گردید. سپس مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت ریخته و نهایتاً مقدار جذب به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئیدها توسط اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera- S22 قرائت شد. مقدار رنگیزه کلروفیل a، b، کل (a + b) و کاروتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه تازه به روش فرمول تغییر یافته آرنون برآورد شد (حسینی، ۱۳۸۶).

$$\text{Chlorophyll a} = [(19.3 \times A_{663}) - (0.86 \times A_{645})] \times V / 100W \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\text{Chlorophyll b} = [(19.3 \times A_{645}) - (3.6 \times A_{663})] \times V / 100W \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$\text{Carotenoids} = [100 (A_{470}) - 3.27 (\text{mg chl a}) - 104 (\text{mg chl b})] / 227 \quad \text{رابطه (۳)}$$

V = حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، W = وزن تر نمونه بر حسب گرم، A = جذب نور در طول موج‌های

۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

روش اندازه‌گیری مقدار پرولین

ابتدا ۵۰۰ میلی گرم اندام تازه گیاه چچم با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد مخلوط و سپس مخلوط حاصل با سانتریفیوژ مدل NF 200 با سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه صاف گردید. ۲ میلی لیتر از محلول حاصل را در لوله آزمایش ریخته و سپس ۲ میلی لیتر اسید ناین هیدرین اضافه گردید. در ادامه ۴ میلی لیتر تولوئن به محلول حاصل افزوده و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه به خوبی تکان داده شد به طوری که لایه رویی زرد رنگ تولوئن نمایان گردید. سپس این لایه جدا و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera- S22 در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تازه تعیین شد (Bates et al., 1973).

اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول

مقدار ۰/۱ گرم از ماده خشک گیاه چچم برداشته و سپس ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری تا قندهای محلول آن جدا شود. پس از یک هفته، از محلول رویی نمونه‌ها یک میلی لیتر برداشته شد و حجم آن با آب مقطر به دو میلی لیتر رسانده شد. پس از اضافه کردن یک میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، مقدار جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S 22 در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. محتوای قندهای محلول هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد (Kochert, 1978).

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی بر اساس روش فولین سیوکالتو

بدین ترتیب که مقدار ۰/۱ گرم از پودر خشک علف‌هرز چچم با ۱۰ میلی لیتر اتانول داغ ۸۰ درصد در هاون چینی در دمای اتاق ساییده شد و سپس مخلوط حاصل با دور کم ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل NF 200) گردید. پس از آن مخلوط رویی در حمام آب جوش قرار گرفت تا غلیظ شده و حدود دو میلی لیتر از آن برای ادامه آزمایش باقی بماند. سپس یک میلی لیتر از محلول تغلیظ شده با کمک آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. در مرحله بعد، مجدداً نیم میلی لیتر از محلول حاصل با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر به حجم سه میلی لیتر رسانده شد، سپس روی محلول به دست آمده نیم میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد اضافه شد. بعد از سه دقیقه، دو میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن افزوده گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S 22 در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه خشک محاسبه شد (Malick & Singh, 1980).

درصد تحریک‌کنندگی یا بازدارندگی (PLI) با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد (Amoo et al., 2008).

$$PLI = [(R_2 - R_1) / R_1] \times 100$$

رابطه

که در آن، R_1 شاهد و R_2 تیمار است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش کشت هیدروپونیک پس از آزمون نرمال سنجی، توسط نرم‌افزار SAS با نسخه ۹/۱ مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون کم‌ترین اختلاف معنی‌دار^۱ در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره بیانگر اختلاف معنی‌دار طول ریشه، وزن خشک گیاهچه، مقدار رنگیزه کاروتنوئیدها، مقدار قندهای محلول، آمینواسید پرولین و ترکیبات فنلی چچم در سطح احتمال یک درصد بود. هم‌چنین اثر عصاره آبی اندام‌ها بر مقدار رنگیزه کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اما مقدار کلروفیل a تحت تأثیر عصاره هیچ‌یک از اندام‌ها قرار نگرفت (جدول ۱).

طول ریشه و وزن خشک گیاهچه

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که طول ریشه چچم تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره کاهش نشان داد. بیشترین کاهش طول ریشه مربوط به عصاره آبی برگ شاتره در مقایسه با شاهد به مقدار ۵۲/۴۰ درصد بود که از لحاظ آماری با اندام ساقه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، لذا در گروه یکسانی قرار گرفتند. کمترین اثر معنی‌دار مربوط به دو اندام ریشه و گل به‌ترتیب به‌مقدار ۳۶/۸۰ و ۳۹/۰۲ درصد بود (شکل ۲).

^۱ Least significant difference

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه چچم تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف

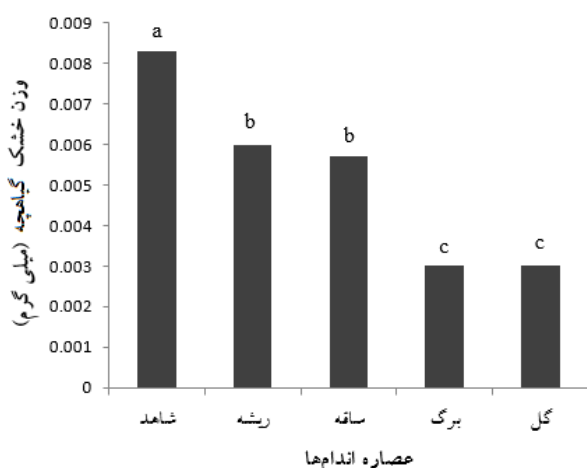
علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

منبع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	وزن خشک گیاهچه	مقدار کلروفیل a	مقدار کلروفیل b	مقدار کلروفیل کل	مقدار کارتنوئیدها	مقدار قندهای محلول	مقدار پرولین	مقدار ترکیبات فنلی
تیمار	۴	۳۸/۶۵**	۰/۰۰۰۰۲**	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۸*	۰/۰۵*	۰/۰۲۹**	۱۵۲/۹۱**	۲۵۸۵/۰۶**	۲/۲۱**
خطا	۱۰	۱/۱۱	۰/۰۰۰۰۰۰۳	۰/۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۵	۲۸/۶۴	۳۹/۳۵	۰/۰۷
ضریب تغییرات (رصد)	-	۹/۲۶	۱۱/۱۰	۱۱/۸۵	۱۵/۳۳	۹/۴۴	۱۳/۵۸	۹/۶۶	۱۴/۳۳	۱۶/۲۳

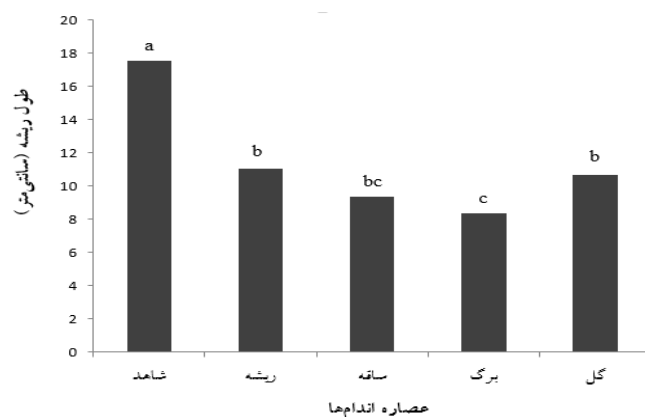
**، *، ^{ns}: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد، ^{ns}: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار

چون ریشه اولین اندامی است که در معرض ترکیبات دگرآسیب است، این امر دور از انتظار نیست. دگرآسیبی بیشتر عصاره گل احتمالاً به این دلیل است که گل‌ها مخزن قوی‌تری از آللوشیمیایی‌ها محسوب می‌شوند و بیشتر آللوشیمیایی‌ها از ریشه به سمت بالا یعنی برگ‌ها و گل‌ها انتقال می‌یابند. بنابراین غلظت متابولیت‌های ثانوی در ریشه کاهش می‌یابد. کاهش طول ریشه‌چه ممکن است بیانگر این امر باشد که طولی شدن سلول‌ها از طریق ممانعت عمل جیبرلین و ایندول اسید استیک به‌وسیله عوامل آللوپاتیک تحت تأثیر قرار گرفته است (Khalili Mahalleh *et al.*, 2014). بوگاتک و همکاران (Bogatek *et al.*, 2005) گزارش کردند که کاهش و تأخیر جوانه‌زنی دانه، جلوگیری از رشد ریشه‌چه و اندام هوایی، اولین نشانه‌های قابل رویت تنش دگرآسیبی است. مطابق شکل ۳، عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره اثر دگرآسیبی بر وزن خشک گیاهچه چچم نشان داد. بیشترین اثر کاهشی معنی‌دار به دو اندام گل و برگ اختصاص داشت. با توجه به تأثیرپذیری منفی مشخصه‌های طول ریشه و وزن خشک گیاهچه چچم تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در اوایل رشد به‌دلیل ضعیف بودن گیاه هدف، ترکیبات آللوپاتیک عصاره روی فرآورده‌های تقسیم سلولی، رشد و نمو تأثیر و آن را مختل نمودند. این امر احتمالاً به‌واسطه حضور آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی، گلیکوزیدها، تری‌ترپنوئیدها در اندام‌های مختلف شاتره است (Gupta *et al.*, 2012). یوانگ و همکاران (Young *et al.*, 2014) گزارش نمودند که ترکیبات آللوپاتیک رشد و نمو گیاهان را از طریق تداخل در فرآورده‌های مهم فیزیولوژیک مثل تغییر ساختار دیواره سلولی، نفوذپذیری و عمل غشاء، جلوگیری از تقسیم سلولی و سنتز پروتئین‌ها و برهم زدن تعادل هورمونی گیاه و روش‌های مختلف دیگر مختل می‌سازند. الشورا و عبدالجواد (El-Shora & Abd El- Gawad, 2014) و میشر (Mishra, 2014) اظهار داشتند که تأثیرات شناخته شده آللوکمیکال‌ها شامل ناهنجاری‌های آناتومیکی، کاهش جذب مواد معدنی، کاهش جوانه‌زنی، کاهش رشد و کلروزه شدن

گیاهچه‌ها است. میزان بازدارندگی این مواد به غلظت عصاره آبی گیاه مورد آزمایش بستگی دارد. در گزارشی بیان شد که مریستم انتهایی در ریشه به شدت تحت تأثیر مواد دگرآسیب قرار می‌گیرد و تقریباً رشد آن متوقف می‌شود که نتیجه آن کاهش رشد طولی و وزن خشک ریشه است. در حقیقت، ایجاد اختلال در فعالیت هورمون‌های رشد نظیر اکسین و یا جیبرلین موجب بازداشتن رشد سلولی می‌گردد (امیدپناه و همکاران، ۱۳۹۰). ضرایب همبستگی پیرسون داده‌ها نشان داد که بین وزن خشک گیاهچه با مقدار کلروفیل *a*، کل و کاروتنوئیدها همبستگی مثبت و معنی‌داری برقرار بود. بیشترین ضریب همبستگی مربوط به رنگیزه کلروفیل کل بود ($r=0.73^{**}$). در مقابل وزن خشک گیاهچه همبستگی منفی و معنی‌داری را با مقدار قندهای محلول، آمینو اسید پرولین و ترکیبات فنلی نشان داد (جدول ۲).



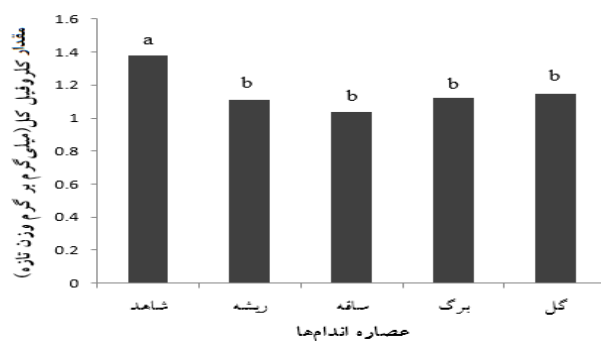
شکل ۳: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر وزن خشک گیاهچه چچم



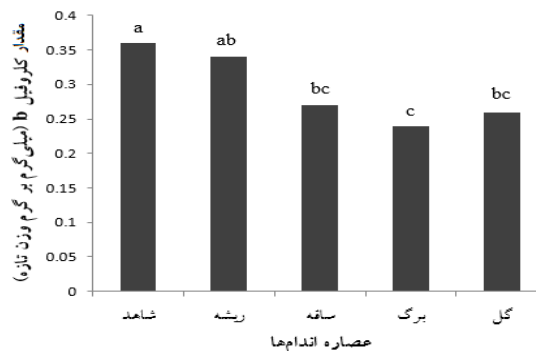
شکل ۲: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر طول ریشه گیاهچه چچم مقدار رنگیزه‌های کلروفیل *a*، کل و کاروتنوئیدها

مطابق نتایج، بیشترین مقدار کلروفیل *b* چچم مربوط به شاهد معادل ۰/۳۶ میلی گرم بر گرم وزن تازه بود، که اختلاف آن با اثر عصاره آبی ریشه شاتره معنی‌دار نبود. هم‌چنین سه اندام ساقه، برگ و گل اثر کاهشی معنی‌دار یکسانی بر مقدار رنگیزه کلروفیل *b* در مقایسه با شاهد داشتند (شکل ۴). در مجموع مقدار رنگیزه کلروفیل کل چچم تحت تأثیر ترکیبات دگرآسیب حاصل از عصاره آبی شاتره نسبت به شاهد، به‌طور یکسانی کاهش یافت (شکل ۵). نتایج در مورد مقدار رنگیزه کاروتنوئیدهای چچم مشابه کلروفیل *b* بود (شکل ۶). مطابق نتایج، رنگیزه کلروفیل *b* و کاروتنوئیدها برخلاف کلروفیل *a* چچم به شدت تحت تأثیر ترکیبات دگرآسیب اندام‌های شاتره قرار گرفتند. ژو و همکاران (Zuo *et al.*, 2014) گزارش نمودند که احتمالاً کاهش میزان کلروفیل به دلیل تشدید فعالیت آنزیم کلروفیل‌از در شرایط تنش است. در هنگام بروز تنش غلظت مواد تنظیم کننده رشد از جمله اسید آبسزیک و اتیلن افزایش می‌یابند و این مواد سبب تحریک فعالیت کلروفیل‌از می‌شوند. آنزیم کلروفیل‌از با جدا کردن فیتول از

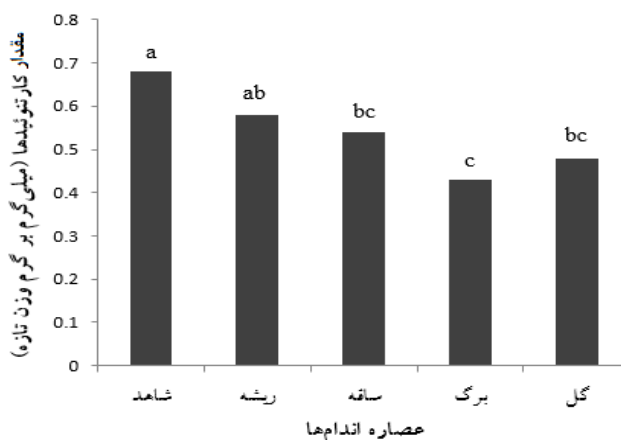
کلروفیل و جدا کردن منیزیم از کلروفیلید و تشکیل فتوفوربید و در نهایت انهدام حلقه تتراپیرولی، موجب تجزیه کلروفیل می‌گردد. کاهش مقدار کارتنوئیدها می‌تواند به دلیل اکسیده شدن آن‌ها توسط اکسیژن‌های فعالی نظیر اکسیژن یکتایی، آب اکسیژنه و غیره و به مراتب تخریب ساختار آن‌ها باشد. بنابراین کاهش کارتنوئیدها به دلیل تنش می‌تواند کاهش کلروفیل را در پی داشته باشد. در گزارشی تغییر در غلظت کلروفیل‌ها به عنوان شاخصی برای دگرآسیبی معرفی شده است (Elisante *et al.*, 2013). حسن سلطان و همکاران (۱۳۹۵) بیان داشتند که کارتنوئیدها مانند کلروفیل b، گروهی از رنگدانه‌ها هستند که علاوه بر نقشی که در تشکیل رنگدانه‌ها بر عهده دارند، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز برای آن‌ها گزارش شده است. ضرایب همبستگی صفات نشان دادند که بین مقدار کلروفیل کل با وزن خشک گیاهچه، مقدار کلروفیل a و b همبستگی مثبتی برقرار بود. بیشترین ضریب همبستگی مربوط به کلروفیل a ($r=0.91^{**}$) بود. همبستگی کلروفیل کل با پرولین، قندهای محلول و ترکیبات فنلی منفی و معنی‌دار بود (جدول ۲).



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار کلروفیل کل گیاهچه چچم



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار کلروفیل b گیاهچه چچم

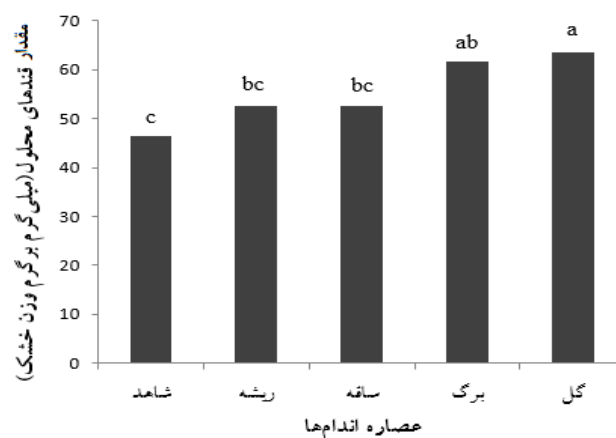


شکل ۶: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار کارتنوئیدهای گیاهچه چچم

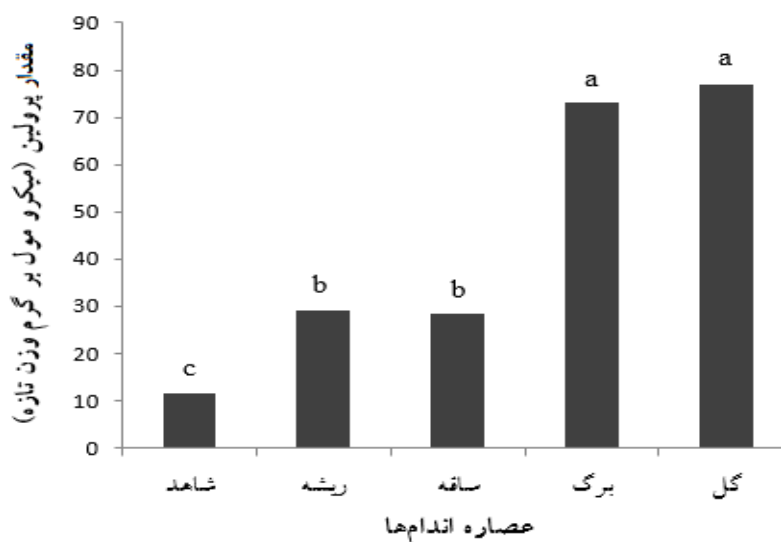
مقدار قندهای محلول و آمینواسید پرولین

همان‌طوری که از شکل ۷ مشاهده می‌شود، مقدار قندهای محلول علف‌هرز چچم تحت عصاره آبی اندام‌های برگ و گل شاتره به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. افزایش قندهای محلول در برگ و ریشه گیاهان تحت تنش آللوپاتی احتمالا به‌علت مهار آنزیم‌های تنفسی، مهار تجزیه قندهای محلول و کاهش سطح انرژی سلول است (Ivan *et al.*, 2006; Aasifa & Badruzzaman, 2014). تحقیقات نشان داده است در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (چاپارزاده و همکاران، ۱۳۹۴).

مقدار آمینواسید پرولین چچم نیز تحت تنش آللوپاتیک شاتره از روند افزایشی معنی‌دار برخوردار بود. ترتیب اثر افزایشی به‌صورت گل = برگ < ریشه = ساقه < شاهد بود (شکل ۸). پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون سلولی گیاه نقش به‌سزایی دارد (Bundig *et al.*, 2016) و در تعدادی از گونه‌ها همبستگی بالایی با تحمل به تنش‌ها ایفا می‌کند (Azarpanah *et al.*, 2013). رابطه قندهای محلول با وزن خشک گیاهچه و مقدار رنگیزه کلروفیل کل منفی و معنی‌دار بود. در مقابل، رابطه قندهای محلول با ترکیبات فنلی مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۲). از دلایل احتمالی در رابطه با کاهش مقدار کلروفیل کل در گیاهان تحت تنش با آللوپاتی، تغییر متابولیسم نیتروژن است. تنش‌های زیستی و غیرزیستی موجب می‌شود که گلوتامات که پیش‌ساز مشترک ساخت کلروفیل و پرولین است، کمتر در مسیر سنتز کلروفیل وارد شود (Singh *et al.*, 2009). قربانی و همکاران (Ghorbani *et al.*, 2018) گزارش نمودند که شرایط محیطی استرس‌زا می‌تواند باعث تجمع ترکیبات محلول سازگاری مانند پرولین، قندها و گلايسين بتائين در گیاهان شود که افزایش این ترکیبات یکی از استراتژی‌های مهم گیاهان برای سازگاری و تحمل در شرایط تنش‌زا است.



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار قندهای محلول گیاهچه چچم

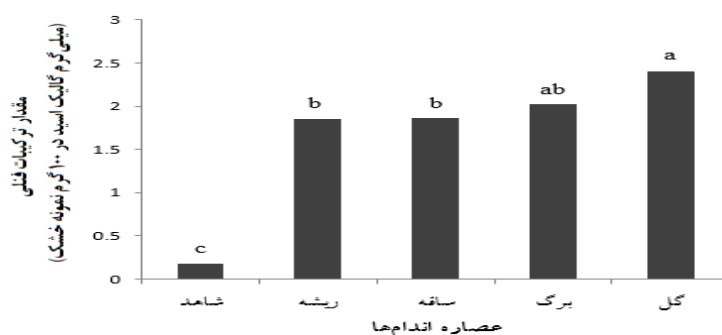


شکل ۸: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار پروتئین گیاهچه چچم

مقدار ترکیبات فنلی

مقدار تغییرات ترکیبات فنلی در دامنه‌ای بین ۰/۱۸ و ۲/۴۰ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه خشک بود. بیشترین ترکیبات فنلی چچم مربوط به اندام گل بود که اختلاف آن با اندام برگ معنی‌دار نبود. در مقابل، شاهد از کمترین مقدار ترکیبات فنلی (۰/۱۸ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه خشک) برخوردار بود (شکل ۹). عطایی و همکاران (۱۳۹۹) در تحقیقی گزارش نمودند که اندام‌های شاتره دارای مقادیر مناسبی از آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی است. بازدارندگی بیشتر عصاره آبی گل و برگ شاتره

بر مولفه‌های رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی چچم می‌تواند احتمالا به دلیل مقادیر بیشتر متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی و سمیت ناشی از آن‌ها در اندام‌های ذکر شده باشد که رشته‌های دوک میتوزی را از فرم طبیعی خارج می‌نمایند و در نتیجه موجب برهم‌زدن استقرار ریزلوله‌های سانترومری و به دنبال آن مانع جدا شدن هسته‌های دختری از یکدیگر خواهند شد. گزارشات متعدد حاکی از آن است که متابولیت‌های ثانویه گیاهی هیچگاه در اندام‌ها ثابت نبوده و متناسب با رشد گیاه و عوامل محیطی، شرایط رویشگاه، زمان برداشت عوامل ژنتیکی و نیز فنولوژی دستخوش تغییر می‌شود (Dambolena *et al.*, 2010). در این راستا جرجانی و همکاران (۱۳۹۷) با ارزیابی میزان تغییرات ترکیبات فنلی اندام‌های هوایی و زیرزمینی مامیران (*Chelidonium majus* L.) در مراحل مختلف فنولوژیکی اظهار داشتند که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به اندام ریشه در مرحله گل‌دهی اختصاص داشت. در مقابل اندام‌های در مرحله میوه‌دهی از کمترین مقدار برخوردار بود که اختلاف آن با اندام‌های در مرحله گل‌دهی و رویشی معنی‌دار نبود. افشار محمدیان و همکاران (Afshar Mohammadian *et al.*, 2015) نیز گزارش کردند که میزان ترکیبات فنلی در اندام‌های مختلف گیاه عطر پاییزی شامل ریشه، ساقه، برگ و گل در مرحله گل‌دهی متفاوت بود. در این مطالعه، رابطه ترکیبات فنلی با مقدار قندهای محلول و آمینو اسید پرولین مثبت و بسیار معنی‌دار بود. در مقابل بین مقدار ترکیبات فنلی با وزن خشک گیاهچه، رنگیزه کلروفیل b، کل و کاروتنوئیدها رابطه منفی و معنی‌داری برقرار بود. (جدول ۲).



شکل ۹: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر مقدار ترکیبات فنلی گیاهچه چچم

در مجموع ضرایب همبستگی صفات نشان داد که رابطه رنگیزه‌های فتوسنتزی با ترکیبات فنلی و اسمولیت‌های سازشی چچم منفی و معنی‌دار بود. بنابراین کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی و به دنبال آن وزن خشک گیاهچه چچم بیانگر پتانسیل بالقوه ترکیبات دگرآسیب موجود در اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره است.

جدول ۲: ضرایب همبستگی صفات مورد بررسی چچم تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره

صفات	وزن خشک گیاهچه	مقدار کلروفیل a	مقدار کلروفیل b	مقدار کلروفیل کل	مقدار کارتنوئیدها	مقدار قندهای محلول	مقدار پرولین	مقدار ترکیبات فنلی
وزن خشک گیاهچه	۱							
مقدار کلروفیل a	۰/۶۴**	۱						
مقدار کلروفیل b	۰/۴۳ ns	۰/۱۲ ns	۱					
مقدار کلروفیل کل	۰/۷۳**	۰/۹۱۳**	۰/۵۱*	۱				
مقدار کارتنوئیدها	۰/۵۸*	۰/۴۹ ns	۰/۱۸ ns	۰/۵۰ ns	۱			
مقدار قندهای محلول	۰/۶۴*	۰/۴۸ ns	۰/۲۵ ns	۰/۵۲*	۰/۴۱ ns	۱		
مقدار پرولین	۰/۶۴*	۰/۳۱ ns	۰/۷۸**	۰/۵۹*	۰/۲۱ ns	۰/۳۳ ns	۱	۰/۷۲**
مقدار ترکیبات فنلی	۰/۷۷**	۰/۵۰ ns	۰/۵۹*	۰/۶۸**	۰/۶۶**	۰/۷۰**	۰/۷۲**	۱

**،* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد. ns: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده نشان داد که یکی از عوامل تاثیرگذار اثرات دگرآسیبی علف‌هرز شاتره بر علف‌هرز چچم، اندام‌ها هستند. به‌طوری‌که در اکثر موارد اندام‌های برگ و گل، بیشترین تأثیر دگرآسیبی بر مشخصه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ترکیبات فنلی مورد بررسی را نشان دادند. این امر می‌تواند به‌دلیل تفاوت در کمیت و کیفیت ترکیبات دگرآسیب موجود در اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره باشد. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که همبستگی منفی و معنی‌داری بین آمینواسید پرولین و قندهای محلول با مولفه‌های وزن خشک گیاهچه‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی چچم برقرار بود که نشان‌دهنده شدت تنش آللوپاتیک عصاره حاصل از اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره است. افزایش میزان ترکیبات فنلی و کاهش مولفه‌های مورد بررسی احتمالاً می‌تواند گواهی بر اثر سمیت سلولی ناشی از این ترکیبات بر روی واکنش‌های گیاهان باشد. با توجه به اثبات اثر دگرآسیبی شاتره بر روی علف‌هرز چچم، نیازمند آزمایشات بعدی بر روی سایر گونه‌ها به‌همراه تجزیه فیتوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه و شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها است. در مجموع در صورت اثبات اثر دگرآسیبی شاتره روی سایر گونه‌ها، شاید بتوان از زیست‌توده تولیدی بالای آن به‌عنوان کاندیدی برای تولید علفکش با منشاء طبیعی و یا مدلی برای سنتز علفکش استفاده نمود.

منابع

- امیدپناه، ن.، اسرار، ز. و مرادشاهی، ع. ۱۳۹۰. بررسی پتانسیل آللوپاتیک گیاه دارویی مورخوش (*Zhumeria majdae*) بر رقم طلایه کلزا (*Brassica napus*). مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۳(۷): ۱-۱۰.
- چاپارزاده، ن.، نجارخدابخش، آ.، پازنگ، م. و زرنندی میاندوآب، ل. (۱۳۹۴). تأثیر شوری و آسکوربیک اسید بر رشد، روابط آبی و روابط اسمزی در گیاه شاهی (*Lepidium sativum*). زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۷(۲۴): ۳۹-۵۲.
- حسن سلطان، ط.، نوروزی، م. و آموزگار، م.ع. (۱۳۹۵). بررسی میزان کلروفیل a و b و توتال کاروتنوئید و هم چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار گونه جلبک سبز جداشده از سواحل گلستان دریای خزر. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی، ۶(۲۴): ۳۶-۳۱.
- حسینی، پ. (۱۳۸۶). بررسی فیزیولوژیکی اثر تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف برنج. رساله دکتری تخصصی. دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۴۵ صفحه.
- جرجانی، آ.، نیاکان، م. و غلامعلی‌پور علمداری، ا. (۱۳۹۷). بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سنجش محتوای متابولیت‌های ثانویه و اسمولیت‌های اندام‌های هوایی و زیرزمینی گیاه دارویی مامیران (*Chelidonium majus* L.) در مراحل مختلف فنولوژیکی. نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۳(۵۱): ۵۰-۶۵.
- سلیمی، ح. و قربانلی، م. (۱۳۸۰). بررسی جوانه زنی بذور یولاف‌وحشی در شرایط متفاوت و تأثیر برخی عوامل موثر در شکست خفگی بذر. رستنی‌ها، جلد ۲.
- عسگرانی، ع. و براتی، ف. (۱۳۹۷). مروری بر روش‌های بازاریابی و حذف ترکیبات فنلی از پساب واحدهای استحصال روغن زیتون. مجله آب و توسعه پایدار، ۵(۲): ۳۷-۴۸.
- عطایی، ع.، غلامعلی‌پور علمداری، ا.، اورسجی، ز. و راحمی کاریزکی، ر. (۱۳۹۹). بررسی محتوای برخی از متابولیت‌های ثانویه و اثر آللوپاتیک اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) بر یولاف‌وحشی (*Avena ludoviciana*). مجله علمی-پژوهشی دانشگاه الزهرا (س) / زیست‌شناسی کاربردی، ۳۲(۴): ۷۶-۹۶.
- فاضلی‌نسب، ب.، رهنما، م. و مزارعی، ا. (۱۳۹۶). ارزیابی ارتباط بین خواص آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی عصاره های ۹ گیاه دارویی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲۷(۱۴۹): ۶۳-۷۸.
- قرنجیک، ا.، غلامعلی‌پور علمداری، ا.، بیابانی، ع. و حقیقی، ع. (۱۳۹۲). ارزیابی پتانسیل آللوپاتیک علف هرز پیچک‌بند (*Polygonum convolvulus* L.) بر گندم (*Triticum aestivum* L.). مجله تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهان. ۱(۱): ۸۳-۹۵.

قهرمان، ا. (۱۳۷۵). کد خانواده‌ها و جنس‌های گیاهی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۲۲۲ صفحه.

- Aasifa, G. and Badruzzaman, S.M. (2014). Evaluation of allelopathic effect of *Eclipta alba* (L.) Hassk. on biochemical activity of *Amaranthus spinosus* L., *Cassia tora* L. and *Cassia sophera* L. African Journal of Environment Science Technology, 8 (1): 1-5.
- Afshar Mohammadian, M., Sharifi, S.N., Abolghasemi, V. and Mohammadi, N. (2015). Study of some Drug secondary Metabolites and antioxidant activity of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter. Nova Biologica Reperta, 2(2): 140-150.
- Amoo, S.O., Ojo, A.U. and Van Staden, J. (2008). Allelopathic potential of *Tetrapleura tetraptera* leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. South African Journal of Botany, 74: 149-152.
- Azarpanah, A., Alizadeh, O. and Dehghanzadeh, H. (2013). Investigation on proline and carbohydrates accumulation in *Zea mays* L. under water stress condition. Extreme life, biospeology and asterobiology. International Journal of the Bioflux Society, 5 (1): 47-54.
- Bates, L.S., Walderen, R.D. and Taere, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.
- Bogatek, R., Gniazdowka, A., Stepień, J., and Kupidłowska, E. (2005). Convolvulus arvensis Allelochemicals modeofactionin germination wheat seeds. Proceedings of the 4th world Congress on Allelopathy, (August 11-14), Wagga, 263-266.
- Bundig, C., Vu, T.H., Meise, P., Seddig, S., Schum, A. and Winkelmann, T. (2016). Variability in Osmotic Stress Tolerance of Starch Potato Genotypes (*Solanum tuberosum* L.) as Revealed by an In Vitro Screening: Role of Proline, Osmotic Adjustment and Drought Response in Pot Trials. Joynal of Agronomy and Crop Science, 203: 206-218.
- Caceres, A. (2000). Calidad de la material prima para la elaboracion de productos fitofarma ceuticas. Primer Congreso International FITO 2000 Por la investigacion, conservacion y diffusion del conocimiento de las plantas medicinals 27-30 de septiembre, Lima, Peru.
- Cadho, K.L. and Rajender, G. (1995). Advances in horticulture medicinal and aromatic plants. Vol. 11, Maldorta Publication. New Delhi.
- Dambolena, J.S., Zunino, M.P., Lucini, E.I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P.J. and Zygodlo, J.A. (2010). Total phenolic content radic alscaevenging properties and essential oil composition of *Origanum* species from populations. Journal of Agriculture Food Chemistry, 58: 1115-1120.

- Elisante, F., Tarimo, M.T. and Ndakidemi, P.A. (2013). Allelopathic Effect of Seed and Leaf Aqueous Extracts of *Datura stramonium* on Leaf Chlorophyll Content, Shoot and Root Elongation of *Cenchrus ciliaris* and *Neonotonia wightii*. American Journal of Plant Sciences, 4: 2332-2339.
- El-Shora, H.M. and Abd El- Gawad, A.M. (2014). Evaluation of allelopathic potential of Rumex dentatus root extract and allelochemicals on *Cicer arietinum*. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 10: 167-180.
- Enteshari, Sh. and Ahrabi, F. (2011) . Effect of the coumarin on some physiological and biochemical indexes of Conola- Hiola variety. Journal of Plant Biology, 3(10): 23-26.
- Gholamalipour Alamdari, E. and Deokule, S.S. (2009). Allelopathic effects of some weeds on growth and yield of paddy rice (Tarom variety) in northern Iran. Pakistan Journal of Weed Science Research, 15(2-3): 123-12.
- Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. (2018). Piriformospora indica inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant Biology, 20(4): 729-736.
- Gupta, P.C., Sharma, N. and Rao, C.V. (2012) A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Fumaria indica* (Fumitory). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(8): 665-669.
- Hassannejad, S. and Porheidar Ghafarbi, S. (2013). Allelopathic effects of allspice, eucalyptus, jujube, and Persian walnut on field dodder (*Cuscuta campestris* Yunck.) seed germination and seedling growth. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4 (3): 442-449.
- Ivan, C., Sulmon, C., Gwenola, G. and Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 57 (3): 449-459.
- Jabeen, N. and Ahmed, M. (2009). Possible allelopathic effects of three different weeds germination and growth of maize (*Zea mays*) cultivars. Pakistan Journal of Botany, 41(4): 1677-1683.
- Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V. and Chauhan, B.S. (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. Crop Protection, 72: 57-65.
- Khalili Mahalleh, J., Jalili, F. and Hosseini, N. (2014). Effect of four kind of allelopathic weed on the germination and growth of forage sorghum. Journal of Research in Crop Science. 5(20): 107-122.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: Helebust, J. A., Craigie J. S(Ed): Hand book of physiological methods. Cambridge University. Press, Cambridge, Pp: 96-97.
- Ma, L., Wu, H., Bai, R., Zhou, L., Yuan, X. and Hou, D. (2011). Phytotoxic effects of *Stellera chamaejasme* extract. African Journal of Agricultural Research, 6: 1170-1176.

- Makoi, J.H. and Ndakidemi, P.A. (2012). Allelopathy as protectant, defense and growth stimulants in legume cereal mixed culture systems. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40: 161-186.
- Malick, C.P. and Singh, M.B. (1980). In plant enzymology and histo enzymology. Kalyani Publishers, New Dehli, 286 p.
- Mishra, A. (2014). Allelopathic properties of *Lantana camara*: A review article. *International Journal of Innovative Research and Review*, 2(4): 32-52.
- Moss, S., Ulber, L. and Ingrid den, H. (2019). A herbicide resistance risk matrix. *Crop Protec.*, 115,
- Rassaeifar, M., Hosseini, N., Haji Hasani Asl, N., Zandi, P. and Moradi Aghdam, A. (2013). Allelopathic effect of *Eucalyptus globulus* essential oil on seed germination and seedling establishment of *Amaranthus blitoides* and *Cynodon dactylon*. *Trakia Journal of Sciences*, 1: 73-81.
- Peerzada, A. M., Bajwa, A.A., Ali, H.H. and Chauhan, B.S. (2016). Biology, impact, and management of *Echinochloa colona* (L.) Link. *Crop Protection*, 83: 56-66.
- Singh, A., Singh, D. and Singh, N.B. (2009). Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana glauca* Viv. *Plant Growth Regulation*, 58: 163-171.
- Sottero, B., Leonarduzzi, G., Testa, G., Gargiulo, S., Poli, G. and Biasi, F. (2019). Lipid oxidation derived aldehydes and oxysterols between health and disease. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(1): 1700047.
- Tigre, R.C., Silva, N.H., Santos, M.G., Honda, N.K., Falcao, E.P.S. and Pereira, E.C. (2012). Allopathic and bio herbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 84: 125– 132.
- Ullah, R., Tanveer, A., Khaliq, A. and Hussain, S. (2013). Comparative allelopathic potential of *Fumaria indica* L. and *Polygonum plebejum* L. against field crops. *Weed Science Research*, 19(1): 15-29.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd Edition. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Young, S.L., Pierce, F.J. and Nowak, P. (2014). Introduction: Scope of the problem—rising costs and demand for environmental safety for weed control, in: *Automation: The future of weed control in cropping systems*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1-8.
- Zuo, S., Li, X., Ma, Y. and Yang, S. (2014). Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant and Soil*, 378: 49-58.

Study of allelopathic effect of aqueous extract of various organs of *Fumaria parviflora* on morphological, physiological and biochemical characteristics of *Lolium rigidum*

A. Ataei¹, E. Gholamalipour Alamdari^{2*}, Z. Avarseji², A. Rahemi Karizaki²

Received: 2019.05.04

Accepted: 2020.12.26

Abstract

The purpose of this study, allelopathic potential assessment of aqueous extract of root, stem, leaf and flower organ of *Fumaria parviflora* weed on morpho-physiological and biochemical characteristics of *Lolium rigidum* seedling in hydroponic culture. First, 5% suspension was prepared separately from the organs with help of distilled water and then the resulting suspension solution (extract) was applied on 7 day old of seedlings of *Lolium rigidum*. Based on the results, various organs of *Fumaria parviflora* had significant inhibitory effect on growth indices of root length and seedling dry weight, content of chlorophyll b and carotenoids of *Lolium rigidum*. In most cases, the most inhibitory effect was related to leaf and flower organ extract. But content of prolin, soluble sugar and phenolic compounds were increased compared to control. The greatest increase in these compounds were obtained under leaf and flower organs of *Fumaria parviflora*. Therefore, by identifying the components of *Fumaria parviflora* and experiment on other species, maybe be a candidate for production of natural herbicide or proposed a model for the synthesis of herbicides.

Key words: Chlorophyll content, *Fumaria parviflora*, Growth indices, *Lolium rigidum*, Prolin content.

1.MSc in Identification and Weeds Control, Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous

2.Assistance Professor of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous *(Corresponding author: eg.alamdari@gonbad.ac.ir)

برآورد وراثت‌پذیری محتوای روغن و پروتئین دانه در لاین‌های کنجد

(*Sesamum indicum* L.) در رژیم‌های مختلف آبیاری و تلقیح با گونه‌های قارچ میکوریزا

اسماعیل قلی نژاد^{۱*}، رضا درویش زاده^۲، عباس ابهری^۳

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و وراثت‌پذیری محتوای روغن و پروتئین دانه در لاین‌های کنجد تحت رژیم‌های مختلف آبی و قارچ‌های میکوریزا، تعداد ۸ لاین کنجد در سه آزمایش جداگانه به صورت فاکتوریل-اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه ساعت‌لوی ارومیه در سال زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ مورد بررسی قرار گرفتند. کرت‌های اصلی شامل ترکیب عامل A یعنی سه سطح مختلف آبیاری و عامل B یعنی سه سطح میکوریزا بودند. کرت‌های فرعی شامل لاین‌های کنجد بود. صفات مورد مطالعه شامل درصد و عملکرد روغن، درصد و عملکرد پروتئین، درصد نیتروژن و شاخص کلروفیل بود. در هر سه شرایط مختلف آبیاری، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی در صفات شاخص کلروفیل و عملکرد پروتئین دانه مشاهده شد. بنابراین با انتخاب صفات شاخص کلروفیل و درصد پروتئین دانه می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی عملکرد روغن و عملکرد پروتئین دانه را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: اجزای واریانس، توارث‌پذیری، درصد نیتروژن، شاخص کلروفیل، لاین

مقدمه

۱. دانشجویار گروه علمی علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران * نویسنده مسئول: gholinezhad1358@yahoo.com

۲. استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳. استادیار گروه علمی علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

کنجد (*Sesamum indicum* L.) گیاهی علفی، یکساله و متعلق به خانواده Pedaliaceae است و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دانه روغنی است که با مناطق خشک و نیمه خشک سازگار بوده و به عنوان ملکه گیاهان دانه روغنی شناخته می‌شود (Roul *et al.*, 2017). سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد دانه کنجد در جهان به ترتیب ۱۲/۸ میلیون هکتار، ۶/۵ میلیون تن و ۵۱۰ کیلوگرم در هکتار، همچنین سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد دانه کنجد در ایران به ترتیب ۴۲۰۰۰ هکتار، ۲۹۰۰۰ تن و ۶۹۰ کیلوگرم در هکتار است (FAOSTAT, 2020).

در حال حاضر خشکی یکی از اساسی‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصول گیاهان زراعی محسوب می‌شود. با توجه به گرم شدن کره زمین و تغییرات اقلیمی در کره زمین به نظر می‌رسد که شرایط خشکی در آینده هم ادامه داشته باشد (Hussain *et al.*, 2018; Pekcan *et al.*, 2016).

یکی از روش‌های مواجهه با تنش خشکی بهبود سطح تحمل گیاهان به تنش است. موفقیت در برنامه‌های به‌نژادی به دو عامل تنوع ژنتیکی و وراثت‌پذیری بستگی دارد (Falconer & Mackey, 1996). در مطالعه‌ای روی گندم دوروم و تری‌تیکاله تمامی صفات مورد بررسی ضریب تغییرات ژنتیکی از ضریب تغییرات فنوتیپی کمتر بود که نشان دهنده تأثیر عوامل محیطی بر بیان صفات بوده است (Alipour Kondari & Arzani, 2021). در تحقیق رئوف و همکاران (Rauf *et al.*, 2007) تنوع ژنتیکی و فنوتیپی قابل ملاحظه‌ای برای درصد روغن مشاهده شد. عارفی و همکاران (Arefi *et al.*, 2015) اظهار داشتند که برای صفت عملکرد روغن، نسبت واریانس ترکیب پذیری عمومی به واریانس ترکیب پذیری خصوصی در هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی کمتر از یک بدست آمد که بیانگر تأثیر بیشتر واریانس غالبیت نسبت به واریانس افزایشی است. Khan و همکاران (Khan *et al.*, 2007) گزارش کردند که عملکرد روغن در آفتابگردان از وراثت‌پذیری بالایی برخوردار است. مطالعات نشان داده‌اند که وراثت‌پذیری صفات در شرایط نرمال و تنش خشکی متفاوت است (Holland *et al.*, 2003). محققان در گندم دوروم ضریب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی را به ترتیب برای عملکرد دانه در بوته ۱۵/۰۴ و ۱۴/۸۷ درصد گزارش کردند (Ibrahim *et al.*, 2020). پژوهشگران در بررسی خود وراثت‌پذیری بالایی را برای صفات زراعی مشاهده کردند. وراثت‌پذیری بالا در صفات مورد بررسی مبین این موضوع است که تأثیر واریانس ژنتیکی بیشتر از واریانس محیطی است و انتخاب در نسل‌های اولیه می‌تواند موفقیت آمیز باشد (Sharaan *et al.*, 2017). در گزارشی در تمام صفات مورد بررسی ضریب تغییرات فنوتیپی از ضریب تغییرات ژنتیکی بیشتر بود که نشان دهنده تأثیر عوامل محیطی بر بیان صفات بوده است (Kumar *et al.*, 2013).

توارث‌پذیری به عنوان تابعی از واریانس‌های ژنتیکی و محیطی، رابطه بین ارزش فنوتیپی و ارزش ژنتیکی برای یک صفت در یک اجتماع را بیان می‌کند. این پارامتر ژنتیکی نشان می‌دهد که چه مقدار از تفاوت‌های مشاهده شده در فنوتیپ، ناشی از

توارث است. توارث‌پذیری بالا برای یک صفت نشان می‌دهد که بخش اساسی از واریانس فنوتیپی، ناشی از واریانس ژنتیکی است در حالی که در توارث‌پذیری پایین، عوامل غیر ژنتیکی سهم بیشتری در تنوع دارند (Khan *et al.*, 2013). با عبارتی، صفاتی که کمتر تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند وراثت‌پذیری بالایی دارند (Omoigui *et al.*, 2006). بر اساس نظر محققان وراثت‌پذیری کمتر از ۳۰ درصد در گروه وراثت‌پذیری پائین، وراثت‌پذیری بین ۳۰ تا ۶۰ درصد در گروه وراثت‌پذیری متوسط و بیشتر از ۶۰ درصد در گروه وراثت‌پذیری بالا قرار می‌گیرد (Johnson *et al.*, 1955). در واقع طبق این نتایج چنین استنباط می‌شود صفات دارای وراثت‌پذیری بالاتر، تنوع ژنتیکی بالاتری دارند، چرا که واریانس ژنتیکی بر مبنای امیدهای ریاضی برآورد می‌شوند. اگرچه وراثت‌پذیری عمومی به‌خوبی وراثت‌پذیری خصوصی نمی‌تواند سهم ژنتیکی تنوع را مشخص نماید، اما بالا بودن میزان آن معرف انتقال نسبی بهتر صفات از والدین به نتاج است (Golabadi *et al.*, 2008). در آزمایشی در کلزا توارث‌پذیری برای کلیه صفات به جز صفت ارتفاع بوته بالا بود. در این بررسی ضرایب تنوع فنوتیپی کلیه صفات بیشتر از ضرایب تنوع ژنتیکی بود که نشان دهنده تاثیر بیشتر عوامل محیطی بر این صفات است (Ismaili *et al.*, 2015). خان و همکاران (Khan *et al.*, 2007) گزارش کردند که عملکرد روغن در آفتابگردان از وراثت‌پذیری بالایی برخوردارند. وراثت‌پذیری بالا در صفات مورد بررسی مبین این موضوع است که تأثیر واریانس ژنتیکی بیشتر از واریانس محیطی است و انتخاب در نسل‌های اولیه می‌تواند موفقیت آمیز باشد (Sharaan *et al.*, 2017).

وراثت‌پذیری در مورد انتخاب صفات پلی‌ژنیک اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف انتخاب، در نظر گرفتن افراد دارای بهترین ارزش‌های ژنتیکی به عنوان والدین نسل بعد است و به دلیل اینکه این عمل با توجه به ارزش فنوتیپی و عملکرد افراد انجام می‌گیرد؛ میزان همبستگی بین ارزش فنوتیپی و ارزش ژنتیکی، یعنی وراثت‌پذیری، بسیار مهم و معنی‌دار است (Badaeva *et al.*, 1996). محققان بر این باور هستند که عملکرد دانه تحت تنش خشکی وراثت‌پذیری پایین دارد و این به دلیل کنترل ژنتیکی پیچیده صفت و اثر متقابل ژنتیک و محیط است (Dixit *et al.*, 2014). پیشرفت کم در انتخاب برای عملکرد موجب شده است تا نظر اصلاح‌گران بذر به سمت صفات ثانویه متمایل شود (Lendjeva *et al.*, 2008). در آزمایشی روی ژنوتیپ-های کنگد در شرایط بدون تنش نتایج رگرسیون مرحله‌ای نشان داد که صفات تعداد کپسول در گیاه، تعداد دانه در کپسول، تعداد گره ساقه اصلی و وزن صد دانه طی چهار مرحله وارد مدل شده و بیشترین تغییرات عملکرد دانه را شامل شدند ولی در نهایت وزن صد دانه در مدل باقی ماند و ۷۳ درصد تغییرات عملکرد دانه را توجیه نمود. تعداد کپسول در بوته، وزن دانه در بوته و وزن هزاردانه اثر مستقیم مثبت و معنی‌داری بر عملکرد تک بوته‌ها داشتند (Zeinali *et al.*, 2006). مطالعات نشان داده‌اند که وراثت‌پذیری صفات در شرایط نرمال و تنش خشکی متفاوت است (Holland *et al.*, 2003). ارقامی که برای عملکرد بالا در شرایط عادی (بدون تنش) انتخاب می‌شوند، ممکن است در شرایط تنش عملکرد زیاد نداشته باشند

(Nakhjavan *et al.*, 2012). بنابراین بیشتر محققان گزینش ژنوتیپ‌ها را در هر دو شرایط تنش و بدون تنش توصیه می‌کنند (Nezami *et al.*, 2008). اگر صفتی از وراثت‌پذیری خوبی در هر دو شرایط نرمال و تنش خشکی برخوردار باشد، مسلماً گزینش بر اساس آن کارایی بالایی خواهد داشت (Amiri Oghan *et al.*, 2001).

هدف از انجام این تحقیق، تخمین اجزای واریانس و وراثت‌پذیری خصوصیات کیفی دانه مانند درصد روغن و پروتئین، عملکرد روغن و پروتئین دانه در ۸ لاین کنجد تحت شرایط مختلف رژیم آبیاری و تلقیح و عدم تلقیح با قارچ‌های میکوریزا بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو سال زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی ساعت‌لوی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی با طول جغرافیایی ۴۵ درجه و ۲ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۴۴ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۵۲ متر از سطح دریا واقع در ۲۵ کیلومتری ارومیه اجرا گردید. این تحقیق به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتور اصلی شامل سطوح مختلف آبیاری، آبیاری نرمال: آبیاری بعد از ۷۰ میلی‌متر تبخیر و تعرق گیاه یا ETC، تنش ملایم: آبیاری بعد از ۹۰ میلی‌متر تبخیر و تعرق گیاه یا ETC و تنش شدید: آبیاری بعد از ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر و تعرق گیاه یا ETC، و دو گونه قارچ میکوریزا *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* و عدم تلقیح با قارچ میکوریزا و فاکتور فرعی شامل ۸ لاین کنجد به نام‌های ۱- ناز تک شاخه، ۲- ناز چند شاخه، ۳- دشتستان ۵، ۴- دشتستان ۲، ۵- داراب ۲، ۶- داراب ۱۴، ۷- هلیل و ۸- پال بود. فاصله هر کرت فرعی از کرت فرعی دیگر به صورت یک خط نکاشت و فاصله میان هر دو کرت اصلی ۲ متر در نظر گرفته شد. هر کرت دارای ۴ خط کاشت به طول ۴ متر بود. بنابراین مساحت هر کرت فرعی و اصلی به ترتیب ۱۰ و ۹۶ مترمربع و مساحت کل قطعه آزمایشی با احتساب فواصل بین واحدهای آزمایشی و کانال‌های آبیاری در حدود ۳۰۰۰ متر مربع بود. از قارچ‌های *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* به صورت مخلوطی از اسپور (۲۰ اسپور در هر گرم مایه تلقیح)، هیف و قطعات جدا شده ریشه‌های آلوده به عنوان تلقیح کننده (۱۰ گرم مایه تلقیح در هر کپه) در عمق ۲ سانتی‌متری زیر هر بذر استفاده شد. قارچ‌های میکوریزا از شرکت تحقیقاتی زیست-فناوری توران شاهرود تهیه شد و در زیر میکروسکوپ اسپورهای موجود بررسی گردیدند. در تیمارهای مربوطه در هر چاله ۱۰ گرم قارچ ریخته شده سپس روی قارچ با خاک به اندازه دو سانتی‌متر پوشش داده شده و بذرها روی خاک کاشته شدند و مجدداً روی بذرها با حدود سه سانتی‌متر خاک پوشانده شد. بذرها در سال ۱۳۹۴ در تاریخ ۲۰ اردیبهشت ماه و در سال ۱۳۹۵ در تاریخ ۱۳ اردیبهشت ماه با فاصله ردیف ۵۰ و فاصله بوته ۱۵ سانتی‌متر با تراکم ۱۳ بوته در مترمربع و به طریقه هیرم‌کاری کشت شدند. کاشت به صورت جوی و پشته و آبیاری به روش نشتی انجام گرفت در موقع کاشت در هر کپه ۳ عدد بذر قرار داده شد که بعداً

در مرحله ۲-۴ برگی بوته‌های اضافی تنک شدند. تا مرحله ۲-۴ برگی و استقرار کامل گیاه همه تیمارها به طور یکسان آبیاری شدند و بعد از این مرحله سطوح مختلف رژیم‌های آبیاری اعمال شد. داده‌های هواشناسی در طول فصل رشد کنگد در ایستگاه تحقیقاتی ساعت‌لوی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش به ترتیب در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است. اولین آبیاری حدود ۱۰ روز بعد از کاشت انجام شد. وجین علف‌های هرز به صورت دستی در دو مرحله، ۲۰ و ۴۰ روز بعد از کاشت صورت پذیرفت. بیماری و آفت خاصی در مزرعه مشاهده نشد. برای حذف اثر حاشیه، ردیف‌های کناری و نیم متر از ابتدا و انتهای هر ردیف حذف گردید.

جهت تعیین ظرفیت زراعی^۱ نقطه پژمردگی دائم^۲ و وزن مخصوص ظاهری خاک محل مورد آزمایش، ابتدا از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک مزرعه با سیلندرهای ۷ سانتی‌متری به تعداد دو سیلندر خاک دست نخورده از چند نقطه مزرعه به تصادف برداشت گردید و به آزمایشگاه بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی منتقل نموده و سپس نمونه‌ها را در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و بلافاصله پس از در آوردن از آون با ترازوی دقیق برای تعیین وزن مخصوص ظاهری ثبت شدند. مقداری از خاک دست نخورده (از هر نمونه سه تکرار) نیز در داخل دستگاه صفحات فشاری^۳ روی صفحات ۰/۳ و ۱۵ اتمسفری در ظروف دایره‌ای شکل قرار داده و سپس خاک داخل صفحات فشاری را به نقطه اشباع رسانده شدند و فشار دستگاه به ۰/۳ و ۱۵ اتمسفر تنظیم و موتور دستگاه روشن گردید و این فشار تا مدتی که کاملاً آب خروجی از شلنگ کناری قطع شود ادامه داشت و بعد از اینکه دستگاه خاموش شد، دکمه فشار آن بسته شد و پس از مدت زمانی که لازم بود فشار داخل محفظه کم شود در دستگاه بسته ماند. سپس مقداری از نمونه‌های تحت فشار ۰/۳ و ۱۵ اتمسفر را در داخل ظروف قرار داده و به آون منتقل گردیدند و بعد از ۲۴ ساعت که کاملاً آب آنها خارج شده بود از آون خارج کرده و فوراً با ترازوی دقیق وزن شدند و در نهایت وزن مخصوص ظاهری، ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم به ترتیب ۱/۳۷، ۲۵ و ۱۲ محاسبه گردید (Mousavi & Akhavan, 2008).

$$RAW = \frac{FC-PWP}{100} \times \rho \times D \times MAD$$

RAW = آب سهل الوصول (میلی‌متر)، FC = ظرفیت زراعی، PWP = نقطه پژمردگی دائم، ρ = وزن مخصوص ظاهری،

D = عمق توسعه ریشه بر حسب میلی‌متر و MAD = ضریب آب سهل الوصول است.

در خاک لوم- لوم رسی ظرفیت زراعی خاک ۲۵ و نقطه پژمردگی دائم ۱۲ است. وزن مخصوص ظاهری خاک ۱/۳۷ است. عمق توسعه ریشه در کنجد ۶۰۰ میلی‌متر در نظر گرفته شد. ضریب آب سهل الوصول یا F یا MAD یا θ است. MAD، ضریب آب سهل الوصول همان آب قابل استفاده است که بین ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم قرار گرفته است. این ضریب در آبیاری مطلوب ۰/۶۵ در تنش ملایم ۰/۸ و در تنش شدید ۰/۹۵ در نظر گرفته شد.

$$RAW = \frac{25-12}{100} \times 1.37 \times 600 \times 0.65 \quad \text{بنابراین:}$$

در شرایط آبیاری مطلوب، تنش ملایم و تنش شدید خشکی آب سهل الوصول یا RAW به ترتیب برابر ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰ میلی‌متر بدست آمد که معادل تبخیر و تعرق گیاه یا ETC در نظر گرفته شد.

$$ET_o = ET_p \times K_p$$

$$ET_c = ET_o \times K_c$$

$$ET_o = \text{تبخیر و تعرق پتانسیل گیاه و } ET_p = \text{تبخیر و تعرق تشتک تبخیر}$$

ETC = تبخیر و تعرق گیاه، Kc = ضریب گیاهی کنجد که در اردیبهشت ماه ۰/۶ در خردادماه و تیرماه ۱ و مردادماه ۰/۸

و در شهریورماه ۰/۶ در نظر گرفته شد، Kp = ضریب تشتک تبخیر است.

به منظور محاسبه میزان آبیاری واحدهای آزمایشی از روش WSC^۱ (Chamberlain, 1952) فلوم تیپ ۳ استفاده

شد. اسامی لاین‌های کنجد، داده‌های هواشناسی در طول فصل رشد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک به ترتیب در جداول

۱، ۲ و ۳ ارائه شده است.

جدول ۱: اسامی لاین‌های کنجد

Code	Names of sesame lines
1	Single branch Naz
2	Several branches Naz
3	Dashtestan 5
4	Dashtestan 2
5	Darab 2
6	Darab 14
7	Halil

جدول ۲: داده‌های هواشناسی در طول فصل رشد کنگد در ایستگاه تحقیقاتی ساعت‌لوی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی

ماه												پارامترهای هواشناسی
شهریور	مرداد	تیر	خرداد	اردیبهشت	فروردین	سال	سال	سال	سال	سال	سال	
سال ۹۵	سال ۹۴	سال ۹۵	سال ۹۴	سال ۹۵	سال ۹۴	سال ۹۵	سال ۹۴	سال ۹۵	سال ۹۴	سال ۹۵	سال ۹۴	
۳۰/۱۳	۲۸/۵۰	۳۲/۵۶	۳۴/۳۵	۳۱/۲۸	۳۳/۵۳	۲۶/۵۸	۲۹/۴۸	۲۲/۹۴	۲۱/۴	۱۵/۱۸	۱۷/۰۵	حداکثر دما (درجه سانتی‌گراد)
۱۱/۹۲	۱۲/۶۶	۱۵/۹۵	۱۵/۵۴	۱۶/۱۳	۱۷	۱۰/۹۹	۱۲/۲۶	۹/۱۴	۸/۶	۳/۴۲	۳/۰۱	حداقل دما (درجه سانتی‌گراد)
۲۱/۰۲	۲۰/۵۸	۲۴/۲۵	۲۴/۹۴	۲۳/۷۰	۲۶/۲۵	۱۸/۷۸	۲۰/۸۷	۱۶/۰۴	۱۵	۹/۳۰	۱۰/۰۳	میانگین دما (درجه سانتی‌گراد)
۰	۱۰/۵۱	۰	۰	۵/۵۴	۰	۳۱/۱۲	۶/۲۳	۵۲/۳۵	۴۰/۳۴	۶۳/۵۵	۱۳/۹۴	بارندگی (میلی‌متر)
۱۸۴/۹	۱۶۴/۶	۲۴۱/۲	۲۸۸/۱	۲۵۴/۱	۲۷۹/۴	۱۹۳/۲	۲۷۸	۱۷۲/۲	۲۰۶/۳	۶۴/۱	۶۸/۲	تأخیر (میلی‌متر)
۴۵/۴۸	۵۳/۴۶	۴۵/۵۹	۳۶/۶۲	۴۷/۱۳	۳۷/۴۸	۴۹/۴۴	۴۲/۲۰	۵۳/۵۹	۵۰/۸۴	۶۱/۴۲	۵۲/۶۷	رطوبت نسبی (%)

جدول ۳: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایش در عمق ۳۰ متر

۱۳۹۵	۱۳۹۴	واحد	خصوصیات خاک
لومی-لومی رسی	لومی-لومی رسی	-	بافت خاک
۱/۹۹	۱/۱۸	(ds/m)	هدایت الکتریکی (EC)
۸/۱۳	۷/۷۹	-	پی اچ (pH)
۴۹	۴۹	%	درصد اشباع
۱۶	۱۶/۸	%	آهک
۲۳	۳۳	%	رس
۵۰	۵۰	%	سیلت
۲۷	۱۷	%	شن
۰/۷۸	۱/۱۶	%	کربن آلی
۰/۰۸	۰/۱۲	%	نیتروژن
۲/۸۲	۸/۱۵	ppm	فسفر
۴۰۷	۷۷۴	ppm	پتاسیم

برداشت نهایی بعد از حذف اثرات حاشیه‌ای (ردیف‌های کناری و نیم متر از بالا و پایین هر پلات) از مساحت ۲ مترمربع در ۲۵ شهریور ماه انجام گرفت (Karimi et al., 2019). درصد روغن، با دستگاه سوکسله (A.O.A.C., 1990) و درصد پروتئین با دستگاه کج‌دال مدل v40 اندازه‌گیری شد (Hosseini, 1995) در اینجا درصد نیتروژن محاسبه و سپس در عدد ۶/۲۵ ضرب شد. عملکرد روغن نیز از حاصل ضرب درصد روغن در عملکرد دانه و عملکرد پروتئین از حاصل ضرب درصد پروتئین

در عملکرد دانه محاسبه گردید. برای ارزیابی شاخص کلروفیل (SPAD) تعداد پنج برگ از هر کرت به طور تصادفی با دستگاه کلروفیل سنج (مدل Minolta، ساخت کشور ژاپن) اندازه گیری شد و سپس میانگین آنها به دست آمد. برآورد اجزای واریانس و وراثت پذیری به روش حداکثر درست نمایی محدود شده انجام گرفت. برای این منظور از برنامه تهیه شده در نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ (<http://www4.ncsu.edu/~jholland/heritability/Inbreds.html>) استفاده شد (Golparvar *et al.*, 2003).

نتایج و بحث

در جداول ۴ تا ۱۲، ضریب تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی، اجزای واریانس و وراثت پذیری صفات اندازه گیری شده در هر ۹ شرایط مختلف آزمایش ارائه شده است که نشان می دهد تنوع زیادی بین لاین های کنجد وجود دارد بنابراین امکان گزینش برای مقاومت به خشکی برای به نژادگران فراهم است. گزارش شده است که ژنوتیپ های کنجد موجود در کلکسیون بانک ژن گیاهی ملی ایران از تنوع کافی جهت انتخاب در هر دو شرایط عادی و تنش خشکی برخوردارند (Abbasali *et al.*, 2017). محققان صفات زراعی و مورفولوژیکی ۹۱ ژنوتیپ وارداتی کنجد را به همراه سه رقم داخلی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد ژنوتیپ ها، تنوع مطلوبی برای اکثر صفات داشتند و عملکرد دانه جزء صفاتی بود که بیشترین ضریب تنوع فنوتیپی را داشت (Masoudi & Ahmadi, 2019).

در شرایط آبیاری مطلوب و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی مربوط به صفت عملکرد پروتئین دانه بود (جدول ۴). در شرایط آبیاری مطلوب و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس موسه^۱ و اینترادیسز، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی در صفت شاخص کلروفیل مشاهده شد (جدول ۵ و ۶). در شرایط تنش ملایم خشکی و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی مربوط به صفت عملکرد پروتئین دانه بود (جدول ۷). در شرایط تنش ملایم خشکی و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس موسه^۱ و گلوموس اینترادیسز، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی از صفت شاخص کلروفیل حاصل شد (جدول ۸ و ۹). در شرایط تنش شدید خشکی و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا و تلقیح با گلوموس موسه^۱ و گلوموس اینترادیسز، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی مربوط به صفت عملکرد پروتئین دانه بود (جدول ۱۰، ۱۱ و ۱۲). این نتایج نشان می دهد که در بین لاین های کنجد مورد مطالعه از لحاظ عملکرد پروتئین دانه اختلافات گسترده ای وجود دارد. میزان تغییرات شاخص کلروفیل، عملکرد روغن دانه و درصد پروتئین دانه در هر ۹ شرایط مختلف آزمایش در ردیف دوم، سوم و چهارم بوده است (جدول ۴ تا ۱۲).

ضرایب تنوع ژنتیکی برای کلیه صفات از ضرایب تنوع فنوتیپی کمتر بودند. تفاوت‌های جزئی بین ضرایب تنوع ژنتیکی و فنوتیپی برای صفاتی مانند درصد روغن دانه و درصد پروتئین دانه در هر ۹ شرایط مختلف آزمایش بیانگر آن است که در این صفات ژنوتیپ در مقایسه با محیط اهمیت و نقش بیشتری دارد (جدول ۴ تا ۱۲). تنوع بالا در عملکرد توده‌های کنجد هماهنگ با مطالعات سایر پژوهشگران است (Siva Prasad et al., 2013; Tahmasebi et al., 2021).

در شرایط آبیاری مطلوب و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا، متوسط وراثت‌پذیری بین ۰/۰۰۰۶ برای عملکرد روغن دانه تا ۰/۶۰ برای درصد پروتئین دانه متغیر بود (جدول ۴). در شرایط آبیاری مطلوب و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس موسه‌آ، متوسط وراثت‌پذیری بین ۰/۰۰ برای درصد نیتروژن دانه تا ۰/۸۸ برای درصد پروتئین دانه و ۰/۷۹ برای شاخص کلروفیل متغیر بود (جدول ۵). در شرایط آبیاری مطلوب و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس / اینترادیسز، متوسط وراثت‌پذیری بین ۰/۰۰ برای درصد نیتروژن دانه تا ۰/۷۳ برای شاخص کلروفیل و ۰/۶۰ برای عملکرد پروتئین دانه متغیر بود (جدول ۶). در شرایط تنش ملایم خشکی و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا، بیشترین وراثت‌پذیری برای شاخص کلروفیل (۰/۵۱)، درصد پروتئین دانه (۰/۴۸) و عملکرد پروتئین (۰/۴۸) مشاهده شد (جدول ۷). در شرایط تنش ملایم خشکی و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس موسه‌آ، بیشترین وراثت‌پذیری برای شاخص کلروفیل (۰/۷۰)، درصد پروتئین دانه (۰/۶۳) و درصد روغن دانه (۰/۳۷) مشاهده شد (جدول ۸). در شرایط تنش ملایم خشکی و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس / اینترادیسز، بیشترین وراثت‌پذیری در شاخص کلروفیل (۰/۵۴)، درصد روغن دانه (۰/۵۱) و عملکرد روغن و پروتئین دانه (۰/۳۷) مشاهده شد (جدول ۹).

در شرایط تنش شدید خشکی و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا، بیشترین وراثت‌پذیری در درصد پروتئین دانه (۰/۹۴)، شاخص کلروفیل (۰/۵۹) و عملکرد پروتئین (۰/۵۲) مشاهده شد (جدول ۱۰). در شرایط تنش شدید خشکی و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس موسه‌آ، بیشترین وراثت‌پذیری در درصد پروتئین دانه (۰/۸۸)، درصد روغن دانه (۰/۷۲) و شاخص کلروفیل (۰/۶۳) مشاهده شد (جدول ۱۱). در شرایط تنش شدید خشکی و تلقیح با قارچ میکوریزا گلوموس / اینترادیسز، بیشترین وراثت‌پذیری در درصد پروتئین دانه (۰/۶۲)، شاخص کلروفیل (۰/۵۵) و عملکرد پروتئین دانه (۰/۴۱) مشاهده شد (جدول ۱۲).

وراثت‌پذیری برآورد شده در این تحقیق با نتایج دانشیان و همکاران (Daneshyan et al., 2006) مطابقت داشت. میزان بازدهی انتخاب برای یک صفت به تاثیر نسبی عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی در بروز تفاوت‌های فنوتیپی بستگی دارد که به وسیله وراثت‌پذیری بیان می‌شود. میزان وراثت‌پذیری عامل مهمی در تعیین روش مناسب جهت بهبود یک صفت در برنامه‌های به‌نژادی و همچنین شاخصی از نحوه تاثیر روش‌های انتخاب برای بهبود یک صفت است (Bourdon, 1997). تاکنون در چندین تحقیق تنوع ژنتیکی توده‌ها و ارقام کنجد مورد مطالعه قرار گرفته است. در تحقیقی گزارش شد تنوع ژنتیکی مطلوبی برای صفات

زراعی و اجزای عملکرد در ۲۰ لاین اصلاحی و توده بومی کنگد وجود دارد (Salehi & Saeidi, 2012) در تحقیق ایشان اختلاف کمی بین ضرایب تنوع ژنتیکی و فنوتیپی صفات مشاهده شد.

مقادیر بالاتر وراثت‌پذیری نشان می‌دهد که اهمیت واریانس ژنتیکی در صفات مورد مطالعه به مراتب بیشتر از واریانس محیطی است. برای صفاتی مانند عملکرد روغن و عملکرد پروتئین، وراثت‌پذیری در شرایط تنش خشکی شدید بالاتر از شرایط آبیاری مطلوب بود که حاکی از واکنش متفاوت لاین‌ها به تنش خشکی (حساسیت متفاوت ژنوتیپ‌ها به شرایط آزمایش) است. علت اینکه صفاتی مانند شاخص کلروفیل و درصد پروتئین تغییر چندانی در میزان وراثت‌پذیری آن‌ها در هر ۹ شرایط مختلف آزمایش مشاهده نمی‌شود تاثیرپذیری کم این صفات از شرایط آزمایش است. به طور کلی واریانس ژنتیکی، فنوتیپی و وراثت‌پذیری صفات در هر ۹ شرایط مختلف آزمایش از روند ثابتی تبعیت نمی‌نماید (جداول ۴ تا ۱۲). به دلیل واکنش متفاوت لاین‌های کنگد به شرایط مختلف محیطی وراثت‌پذیری تغییر می‌کند معمولاً صفات سازگار به شرایط محیط تغییرات کمتری نشان می‌دهند. هر چند وراثت‌پذیری صفات کیفی دانه در هر ۹ محیط در حد بالایی بود اما میزان وراثت‌پذیری از آزمایشی به آزمایش دیگر متفاوت بود.

نتیجه‌گیری

موفقیت در تغییر ویژگی‌های جمعیت از طریق میزان انطباق بین مقادیر فنوتیپی و مقادیر ژنوتیپی قابل پیش‌بینی است؛ اندازه‌گیری این میزان از انطباق از طریق محاسبه وراثت‌پذیری انجام می‌شود. اگر وراثت‌پذیری صفت بالا باشد (بیش از ۶۰ درصد) در آن صورت انتخاب فنوتیپی برای تغییر صفت مطلوب خواهد بود اما اگر وراثت‌پذیری متوسط یا پایین باشد در بهبود صفت باید از روش‌های مبتنی بر آزمون نتاج، گزینش بر مبنای شاخص یا از گزینش به کمک نشانگرهای مولکولی و یا گزینش ژنومی استفاده نمود. در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی ملایم، بیشترین وراثت‌پذیری برای صفت درصد پروتئین و شاخص کلروفیل در شرایط تلقیح با قارچ *گلووموس موسه* مشاهده شد. در شرایط تنش خشکی شدید و در شرایط بدون تلقیح و تلقیح با قارچ میکوریزا، بیشترین مقدار وراثت‌پذیری در درصد پروتئین دانه مشاهده شد. در نه محیط مختلف آزمایش، بیشترین میزان واریانس ژنتیکی در صفات شاخص کلروفیل، عملکرد روغن و عملکرد پروتئین دانه مشاهده شد. در هر سه شرایط مختلف آبیاری، بیشترین میزان تغییرات فنوتیپی، ژنتیکی و محیطی در صفات شاخص کلروفیل و عملکرد پروتئین دانه مشاهده شد. در برنامه‌های به‌نژادی عمده هدف محققان افزایش عملکرد روغن و پروتئین است. به دلیل وراثت پیچیده این صفات تلاش بر این است که با تغییر و اصلاح صفاتی همچون شاخص کلروفیل و درصد پروتئین که ارتباط نزدیکی باهم و با عملکرد دارند بتوان این صفات را بهبود بخشید.

جدول ۴: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین‌های کنجد در شرایط آبیاری مطلوب و بدون تلقیح با میکوریزا

صفت	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۲/۹۰	۱/۶۸	۰/۰۱۶۸	۴۱/۸۸	۰/۴۱۸	۲۹/۶۰	۰/۳۰	۵/۶۶	۱/۲۷
عملکرد روغن دانه	۲۴/۳۲	۴/۱۷	۰/۰۴۱۷	۸۹۵۷/۰۰	۸۹/۵۷	۶۶۰۹	۶۶/۱۰	۰/۰۶	۳۳/۴۳
درصد پروتئین دانه	۲۱/۶۵	۳۸/۶۴	۰/۳۸۶۴	۳۷/۳۰	۰/۳۷	۶۳/۵۶	۰/۶۴	۶۰/۸۰	۳/۶۹
عملکرد پروتئین دانه	۱۲/۵۶	۱۳۵/۱۷	۱/۳۵	۲۶۰۳	۲۶/۰۳	۲۰۷۰/۸	۲۰/۷۱	۶/۵۳	۳۶/۲۳
درصد نیتروژن	۳/۴۹	۰/۲۹	۰/۰۰۲۹	۱/۱۷	۰/۰۱۱	۱/۲۳	۰/۰۱	۲۳/۲۴	۲/۸۶
شاخص کلروفیل	۴۱/۶۷	۲۲۵۹/۹	۲۲/۵۹	۸۵۵	۸/۵۵	۳۸۷۸/۹	۳۸/۷۹	۵۸/۲۶	۱۴/۹۴

جدول ۵: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین‌های کنجد در شرایط آبیاری مطلوب و تلقیح با قارچ گломوس موسه‌آ

صفت	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۳/۹۰	۵/۷۹	۰/۰۶	۲۸/۲۵	۰/۲۸	۲۴/۶۲	۰/۲۵	۲۳/۵۰	۱/۱۳
عملکرد روغن دانه	۴۱/۵۰	۳۷۷/۳۳	۳/۷۷	۱۰۸۹	۱۰/۸۹	۱۱۶۰/۳۳	۱۱/۶۰	۳۲/۵۲	۸/۲۰
درصد پروتئین دانه	۲۳/۹۴	۴۲/۸۳	۰/۴۳	۸/۵۰	۰/۰۸۵	۴۸/۵۰	۰/۴۹	۸۸/۳۲	۲/۹۲
عملکرد پروتئین دانه	۲۲/۵۹	۲۷۹/۳۳	۲/۷۹	۳۰۵	۳/۰۵	۵۲۱/۳۳	۵/۲۱	۵۳/۵۸	۱۰/۱۰
درصد نیتروژن	۳/۷۵	۰	۰	۰/۲۹	۰/۰۰۲	۰/۹۸	۰/۰۱	۰	۲/۶۶
شاخص کلروفیل	۵۵/۴۳	۵۷۱۲/۶۷	۵۷/۱۳	۶۹۰	۶/۹۰	۷۱۶۵	۷۱/۶۵	۷۹/۷۳	۱۵/۲۷

جدول ۶: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به لاین‌های کنجد در شرایط آبیاری مطلوب و تلقیح با میکوریزا گلوبوسا/اینترادیسز

صفت	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۴/۴۹	۰/۳۵	۰/۰۰۳۵	۵۸	۰/۵۸	۳۹/۰۲	۰/۳۹	۰/۹۰	۱/۴۰
عملکرد روغن دانه	۳۳/۷۸	۴۴۵/۶۷	۴/۴۶	۳۶۰	۳/۶۰	۷۴۵/۳۳	۷/۴۵	۵۹/۷۹	۸/۰۸
درصد پروتئین دانه	۲۲/۹۷	۱۲/۲۳	۰/۱۲	۳۸	۰/۳۸	۳۷/۵۷	۰/۳۸	۳۲/۵۶	۲/۶۸
عملکرد پروتئین دانه	۱۷/۶۰	۱۴۸/۸۳	۱/۴۹	۱۱۶/۴۱	۱/۱۶	۲۴۵/۷۸	۲/۴۶	۶۰/۵۵	۸/۹۱
درصد نیتروژن	۳/۶۴	۰	۰	۱/۲۰	۰/۰۱	۱/۲۵	۰/۰۱	۰	۲/۷۴
شاخص کلروفیل	۴۸/۹۷	۳۰۷۶/۵۰	۳۰/۷۷	۷۰۵/۶۰	۷/۰۵	۴۱۸۹	۴۱/۸۹	۷۳/۴۴	۱۳/۲۱

جدول ۷: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین های کنجد در شرایط تنش ملایم خشکی و بدون تلقیح با میکوریزا

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۱/۵۲	۰/۰۳	۰/۰۰۰۳	۱۲/۸۰	۰/۱۲۸	۸/۵۷	۰/۰۹	۰/۳۹	۰/۷۳
عملکرد روغن دانه	۱۹/۰۸	۳۶۹/۸۴	۳/۷۰	۷۸۸/۶۷	۷/۸۸	۹۴۳/۲۷	۹/۴۳	۳۹/۲۱	۱۰/۰۸
درصد پروتئین دانه	۲۲/۸۴	۱۸/۷۸	۰/۱۹	۲۹/۳۶	۰/۲۹	۳۸/۳۵	۰/۳۸	۴۸/۹۷	۱/۹۰
عملکرد پروتئین دانه	۱۰/۵۴	۲۰۵/۷۲	۲/۰۶	۳۰۸/۳۳	۳/۰۸	۴۲۷/۱۷	۴/۲۷	۴۸/۱۶	۱۹/۶۰
درصد نیتروژن	۳/۵۲	۰	۰	۰/۵۷	۰/۰۰۵	۲/۷۳	۰/۰۳	۰	۴/۹۲
شاخص کلروفیل	۳۴/۸۴	۲۳۲۷/۶۷	۲۳/۲۸	۸۸۶/۰۰	۸/۸۶	۴۵۶۲	۴۵/۶۲	۵۱/۰۳	۱۹/۳۸

جدول ۸: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین های کنجد در شرایط تنش ملایم خشکی و تلقیح با قارچ گلواموس موسه آ

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۲/۲۴	۹/۳۸	۰/۰۹	۲۳/۷۰	۰/۲۳۷	۲۵/۱۸	۰/۲۵	۳۷/۱۶	۱/۱۸
عملکرد روغن دانه	۳۱/۲۱	۲۸۴	۲/۸۴	۱۱۴۵	۱۱/۴۵	۱۰۸۵	۱۰/۸۶	۲۶/۱۶	۱۰/۵۵
درصد پروتئین دانه	۲۳/۷۹	۱۸/۰۲	۰/۱۸	۱۵/۲۵	۰/۱۵	۲۸/۱۸	۰/۲۸	۶۳/۹۲	۲/۲۲
عملکرد پروتئین دانه	۱۷/۵۶	۷۹/۵۸	۰/۸۰	۳۷۰	۳/۷۰	۳۴۰	۳/۴۰	۲۳/۴۳	۱۰/۵۰
درصد نیتروژن	۳/۷۸	۰	۰	۰/۳۷	۰/۰۰۳	۲/۰۸	۰/۰۲	۰	۳/۷۴
شاخص کلروفیل	۵۰/۱۳	۳۶۸۲	۳۶/۸۲	۸۷۹/۵	۸/۷۹	۵۲۲۵/۴	۵۲/۲۵	۷۰/۴۷	۱۴/۴۱

جدول ۹: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین‌های کنگد در شرایط تنش ملایم خشکی و تلقیح با گلوبوس/ اینترا دیسز

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۲/۷۱	۲۵/۶۷	۰/۲۶	۳۶	۰/۳۶	۴۹/۶۷	۰/۵۰	۵۱/۶۸	۱/۱۹
عملکرد روغن دانه	۲۶/۵۵	۵۸۶/۷۲	۵/۸۷	۱۲۸۵	۱۲/۸۵	۱۵۴۴	۱۵/۴۴	۳۷/۹۹	۹/۱۲
درصد پروتئین دانه	۲۳/۴۵	۲۱/۹۸	۰/۲۲	۵۵/۰۲	۰/۵۵	۵۸/۶۶	۰/۵۹	۳۷/۴۷	۳/۲۷
عملکرد پروتئین دانه	۱۴/۴۸	۱۲۴/۰۲	۱/۲۴	۴۰۰/۷	۴/۰۰۷	۴۲۴/۱۲	۴/۲۴	۲۹/۲۴	۷/۶۹
درصد نیتروژن	۳/۷۰	۰	۰	۰/۸۳	۰/۰۰۸	۱/۰۸	۰/۰۱	۰	۰
شاخص کلروفیل	۴۲/۶۱	۲۷۶۵	۲۷/۶۵	۸۴۴	۸/۴۴	۵۰۵۴/۶	۵۰/۵۵	۵۴/۷۰	۱۲/۳۴

جدول ۱۰: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین‌های کنگد در شرایط تنش شدید خشکی و بدون تلقیح با میکوریزا

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۰/۵۵	۱۰/۲۵	۰/۱۰	۴۰/۵۰	۰/۴۰	۳۷/۲۵	۰/۳۷	۲۷/۵۲	۰/۷۷
عملکرد روغن دانه	۷/۱۱	۱۹۸/۳۳	۱/۹۸	۲۵۲	۲/۵۲	۴۵۹	۴/۵۹	۴۳/۲۱	۱۹/۷۹
درصد پروتئین دانه	۲۳/۵۰	۱۴۹/۶۷	۱/۵۰	۱۲/۳۰	۰/۱۲	۱۵۸/۸	۱/۵۸	۹۴/۸۱	۵/۲۱
عملکرد پروتئین دانه	۴/۱۳	۱۰۸/۸۵	۱/۰۹	۱۱۲/۳۰	۱/۱۲	۲۰۷/۷۸	۲/۰۸	۵۲/۳۹	۲۵/۲۷
درصد نیتروژن	۳/۶۸	۰/۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۵۳	۰/۰۰۵	۲/۵۲	۰/۰۳	۵/۲۹	۰/۹۷
شاخص کلروفیل	۲۱/۶۸	۲۲۰۹/۸۳	۲۲/۱۰	۶۵۱	۶/۵۱	۳۷۲۵/۱۷	۳۷/۲۵	۵۹/۳۲	۲۱/۶۸

جدول ۱۱: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین های کنگد در شرایط تنش شدید خشکی و تلقیح با قارچ گلوموس موسه آ

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۱/۵۹	۱۲/۳۵	۰/۱۲	۷	۰/۰۷	۱۷/۰۲	۰/۱۷	۷۲/۵۸	۰/۹۹
عملکرد روغن دانه	۱۵/۷۵	۲۳۴/۳	۲/۳۴	۶۵۳	۶/۵۳	۷۷۴	۷/۷۴	۳۰/۲۸	۱۷/۶۶
درصد پروتئین دانه	۲۴/۴۴	۱۰۶/۱۷	۱/۰۶	۲۰/۴۰	۰/۲۰	۱۱۹/۷	۱/۲۰	۸۸/۶۴	۴/۴۸
عملکرد پروتئین دانه	۹/۲۵	۱۹۴/۸	۱/۹۵	۲۸۸/۱۷	۲/۸۸	۴۰۴/۹۸	۴/۰۵	۴۸/۱۰	۲۱/۷۵
درصد نیتروژن	۳/۸۳	۰/۵۷	۰/۰۱	۰/۴۵	۰/۰۰۴	۱/۹۰	۰/۰۲	۲۹/۶۹	۳/۶۹
شاخص کلروفیل	۳۶/۷۴	۲۲۸۱	۲۲/۸۱	۶۵۹	۶/۵۹	۳۶۱۶	۳۶/۱۶	۶۳/۰۸	۱۶/۳۶

جدول ۱۲: برآورد اجزای واریانس، وراثت پذیری و ضریب تغییرات برای خصوصیات کیفی و صفات مربوط به دانه لاین های کنگد در شرایط تنش شدید خشکی و تلقیح با گلوموس اینترارادیسز

صفه	میانگین	واریانس ژنتیکی		واریانس محیطی		واریانس فنوتیپی		ضریب تغییرات	
		درصد	مقدار	درصد	مقدار	درصد	مقدار	وراثت پذیری	ژنتیکی
درصد روغن دانه	۴۲/۲۶	۱/۲۵	۰/۰۱	۷۴/۵۰	۰/۷۴	۵۰/۹۲	۰/۵۱	۲/۴۵	۱/۶۸
عملکرد روغن دانه	۱۱/۹۰	۳۰۵/۸۳	۳/۰۶	۵۹۶	۵/۹۶	۸۴۹/۵	۸/۵۰	۳۶	۲۴/۴۹
درصد پروتئین دانه	۲۴/۳۷	۳۰/۴۹	۰/۳۰	۲۷/۱۳	۰/۲۷	۴۸/۵۷	۰/۴۹	۶۲/۷۶	۲/۸۷
عملکرد پروتئین دانه	۶/۸۵	۱۴۴/۶۷	۱/۴۵	۲۴۷/۲۳	۲/۴۷	۳۴۵/۲۲	۳/۴۵	۴۱/۹۱	۲۷/۱۱
درصد نیتروژن	۳/۷۹	۰	۰	۱	۰/۰۱	۱/۳۴	۰/۰۱	۰	۲/۶۳
شاخص کلروفیل	۲۹/۰۶	۲۳۲۹/۸۳	۲۳/۳۰	۶۱۱/۴۰	۶/۱۱	۴۱۶۷/۱۰	۴۱/۶۷	۵۵/۹۱	۲۲/۲۱

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح ملی به شماره ۹۳۰۱۴۴۷۴ تاریخ تصویب ۹۳/۱۱/۲۱ که بخشی از بودجه آن توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری تامین اعتبار شده بود بدین وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Abbasali, M., Gholipouri, A., Tobeh, A., Khoshkholgh Sima, N.A., Ghalebi, S. (2017). "Identification of drought tolerant genotypes in the Sesame (*Sesamum indicum* L.) collection of national plant gene bank of Iran". Iranian Journal of Field Crop Science, 48(1):275-289. (In Persian)
- Alipour Kondari, H., Arzani, A. (2021). "Evaluation of heterosis and heritability of yield and yield components in bread wheat, durum wheat and triticale". Journal of Crop Production, 13(3):107-118. (In Persian)
- Amiri Oghan, H., Moghadam, M., Ahmadi, M.R., Valizadeh, M., Shakiba, M. (2001). "Hertability of seed yield and yield components in rapessed (*Brassica napus*) under drought stress and normal conditions". Seed & Plant, 18(2):179-199. (In Persian)
- Arefi, S., Nabipour, A., Samizadeh, H. (2015). "Evaluation of combining ability of sunflower lines based on line $\times$ tester analysis under water stress and non-stress conditions". Journal of Crop Breeding, 7(15):115-125. (In Persian)
- Association Official Analytical Chemists. (1990). Official Method of Analysis. Washington, DC, USA.
- Badaeva, E.D., Friebe, B., Gill, B.S. (1996). "Genome differentiation in Aegilops 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species". Genome, 39:1150-1158.

- Bourdon, R.M. (1997). Understanding animal breeding. Prentice-Hall. 538 pp.
- Chamberlain, A.R. (1952). "Measuring water in small channels with WSC flume". Agricultural Experiment Stations and Circular, 200. State College of Washington, Pullman.
- Daneshyan, J., Jabari, H., Farokhi, A. (2006). "Effect of water deficit and plant density on yield and agronomic characteristics of sunflower cultivation in the second culture". 9th Iranian congress of crop science and plant breeding, University of Tehran, college of Aboureihan, Pakdasht, Iran. 500 p. (In Persian)
- Dixit, S., Singh, A., Kumar, A. (2014). "Rice breeding for high grain yield under drought: a strategic solution to a complex problem". International Journal of Agronomy, 1-15.
- Falconer, D. S., Mackey, T.F.C. (1996). "Introduction to quantitative genetics". Longman Group Ltd. Harlow, UK, 187- 246.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization statistical databases. (2020). <http://faostatfao.org/>
- Golabadi, M., Arzani, A., Mirmohammadi Meybodi, S.A.M. (2008). "Evaluation of influence of late-season moisture stress on yield and morpho-physiological characteristics of f_3 families of durum wheat". Iranian Journal of Field Crops Research, 6(2):405-418.
- Golparvar, A.R., Majidi Harvan, I., Ghassemi Pirbaloti, E. (2003). "Genetic improvement yield potential and water stress resistance in wheat genotypes (*Triticum aestivum*)". Aridity Seasonal and Agricultural Drought, 13:13 – 21.
- Holland, J.B., Nyquist, W.E., Cervantes-Martinez, C.T. (2003). "Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update". Plant Breeding Review, 22:9–111.
- Hosseini, Z. 1995. "Conventional methods in food analysis". Shiraz University Press. Pp. 210. (In Persian)
- Hussain, M., Farooq, Sh., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M., Nawazd, A. (2018). "Drought stress in sunflower: physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives". Agriculture Water Management, 201:152-166.

- Ibrahim, A.U., Yadav, B., Anusha, R., Magashi, A.I. (2020). "Heterosis studies in durum wheat (*Triticum durum* L.)". Journal of Genetics, Genomics and Plant Breeding, 4:1. 2-8.
- Ismaili, A., Nourozi Asl, A., Zebarjadi, A.R., Drikvand, R., Azizi, Kh. (2015). "Study on heritability and path analysis of different traits, seed yield and oil yield of canola in climatically condition of KhoramAbad, Iran". Agronomy Journal, 106:162-170.
- Johnson, H.W., Robinson, H.F., Comstac, R.E. (1955). "Genotypic and phenotypic correlation in soybean and their implications in selection". Agronomy Journal, 47:477-483.
- Karimi, Z., AghaAlikhani, M., Gholamhoseini, M. (2019). "Study of planting density on agronomic traits of sesame cultivars". Iranian Journal of Field Crops Research, 16(4):821-831. (In Persian)
- Khan, F.A., Azhar, F.M., Afzal, I., Rauf, S. (2007). "Effect of nitrogen regimes on combining ability variation in oil and protein contents in cotton seed (*Gossypium hirsutum* L.)". Plant Production Science, 10:367-371.
- Khan, H., Rehman, H.U., Bakht, J., Khan, S.A., Hussain, I., Khan, A., Ali, S. (2013). "Genotype $\times$ environment interaction and heritability estimates for some agronomic characters in sunflower". The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(4):1177-1184.
- Kumar, B., Singh, C.M., Jaiswal, K.K. (2013). "Genetic variability, association and diversity studies in bread wheat". Bioscan, 8(1):143-147.
- Lendjeva S., Neumann K., Lohwasser U., Borner A. (2008). "Molecular mapping of genomic regions associated with wheat seedling growth under osmotic stress". Biologia plantarum, 52:259-266.
- Masoudi, B., Ahmadi, M. (2019). "Evaluation of genetic diversity of agronomic and morphological traits of Sesame genotypes". Journal of Crop Breeding, 11(31):78-91 (In Persian)
- Mousavi, S.F., Akhavan, S. (2008). Irrigation Principles. Kankash Press. Pp: 414.

- Nakhjavan, S., Bihamta, M.R., Darvish, F., Sorkhi, B., Zahravi, M. (2012). "Heritability of agronomic traits in the progenies of a cross between two drought tolerant and susceptible barley genotypes in terminal drought stress conditions". Iranian Journal of Crop Sciences, 14(2):136-154. (In Persian)
- Nezami, H., Khzaei, R., Boroumand Rezazadeh, Z., Hosseini, A. (2008). "Effect of drought stress and defoliation on sunflower (*Helianthus annuus* L.) in controlled conditions". Desert, 12:99-104.
- Omoigui, L.O., Ishiyoku, M.F., Kamara, A.Y., Alabi, S.O., Mohammed, S.G. (2006). "Genetic variability and heritability studies of some reproductive traits in cowpea". African Journal of Biotechnology, 5:1191-1195.
- Pekcan, V., Evci, G., Yilmaz, M.L., Balkan Nalcai, AS., Erdal, SC., Cicek, N., Ekmekci, NY., Kaya, Y. (2016). "Drought effects on yield traits of some sunflower inbreds". Agriculture and Forestry, 61(4):101-107.
- Rauf, S., Khan, T.M., Naveed, A., Munir, H. (2007). "Modified path to high lint yield in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under two temperature regimes". Turkish Journal of Biology, 31:119-126.
- Roul, B., Mishra, B.K., Prusty, N. 2017. "Natural effect of micronutrient on growth and growth parameter of sesame oilseed crop". Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(5):1926-1928.
- Salehi, M. and Saeidi, Gh. (2012). "Genetic variation of some agronomic traits and yield component in breeding lines of Sesame". Journal of Crop Breeding, 4(9):77-92 (In Persian)
- Sharaan, A.N., Gallab, K.H., Eid, M.A.S.M. (2017). "Estimation of genetic parameters for yield and its components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under pedigree selection". International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 10(2):22-30.
- Siva Prasad, Y.V.N., Krishna, M.S.R., Yadavalli, V. (2013). "Correlation, path analysis and genetic variability for economical characteristics in F₂ and F₃ generations of the cross AVT₃×TC₂₅ in

Sesame (*Sesamum indicum* L.)". Journal of Environmental and Applied Bio research, 1(2):14-18.

Tahmasebi, A.K., Darvishzadeh, R., Fayaz Moghaddam, A., Gholinezhad, E., Abdi. H. (2021). "Phenotypic variation of indigenous sesame landraces in urmia climate". Journal of Crop Breeding, 12(36): 30-38. (In Persian)

Zeinali, H., Mirlohi, A., Safaii, L. (2006). "Evaluation of relationship between grain yield and yield components in sesame (*Sesamum indicum* L.)". Research Agriculture Science, 2:1-9. (In Persian)

Evaluation of heritability for oil and protein contents of sesame (*Sesamum indicum* L.) lines under different irrigation regimes and mycorrhizal fungi

E. Gholinezhad¹, R. Darvishzadeh², A. Abhari³

Received: 2021.5.26

Accepted: 2021.7.19

Abstract

To investigate the genetic diversity and the heritability of oil and protein content of seed in lines of sesame under different irrigation regimes and mycorrhizal fungi, 8 lines of sesame were studied in three separate experiments as factorial split plot layout based on a randomized block complete design with three replications in research field of Agricultural Research Center, West-Azerbaijan in 2015 and 2016 cropping seasons. The main plots (factor A and B) consisted of three different irrigation regimes three levels of mycorrhiza. Sub plots consisted of eight sesame lines. Studied traits were including oil percentage and yield, protein percentage and yield, nitrogen percentage and chlorophyll index. In all three irrigation conditions, the most phenotypic, genetic and environmental variance was observed in traits of chlorophyll index and protein yield. Therefore, with selecting traits such as chlorophyll index and protein percentage in breeding programs would improve oil and protein yield.

Key words: Chlorophyll index, Heritability, Line, Nitrogen percentage, Variance components.

¹ Associate Professor, Department of Agronomy, Payame Noor University, Tehran, Iran.
(* Corresponding author: gholinezhad1358@yahoo.com)

² Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Agronomy, Payame Noor University, Tehran, Iran

مطالعه عوامل مؤثر بر حذف زیستی اورانیوم توسط ریز جلبک زنده *Chlorella vulgaris*

پریسا محمدی^۱، نورا جوانمردی^۲، پریسا تاجر محمدقزوینی^۳

چکیده

زیست پالایی توسط ریز جلبکها به عنوان روشی مؤثر جهت حذف رادیونوکلئیدها از پسابها مطرح است. در این مطالعه زیست پالایی اورانیوم از محلول‌های آبی با استفاده از ریز جلبک *Chlorella vulgaris* در حالت ناپیوسته ارزیابی شد. روش پلاکت برمن توسط نرم افزار آماری Minitab جهت غربالگری عوامل مؤثر مانند غلظت اولیه اورانیوم، دما، زمان، pH و مقدار زیست توده بر حذف زیستی اورانیوم استفاده شد. نتایج نشان دادند که غلظت اولیه اورانیوم و pH از نظر آماری به عنوان عوامل مؤثر هستند. جهت تعیین اثرات اصلی و برهم‌کنش عوامل مؤثر بر حذف اورانیوم از طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. پس از آن پردازش داده‌های تجربی و ارزیابی تطابق معادله با داده‌های تجربی انجام و مقادیر شرایط بهینه تعیین شد. نتایج نشان دادند که *C. vulgaris* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design-Expert قادر به حذف ۹۹/۶۳ درصد از اورانیوم موجود از محلولهای حاوی ۷/۱ میلی گرم بر لیتر اورانیوم در pH ۴/۳ است.

واژه های کلیدی: اورانیوم، ریز جلبک، زیست پالایی، طراحی آزمایش، فلزات سنگین

۱. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهراء (س)، تهران- ایران

۲. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهراء (س)، تهران- ایران

۳. استادیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران- ایران *نویسنده مسئول ptajer@aeoi.org.ir

مقدمه

آلودگی محیط زیست یک مسئله روز جهانی است که به واسطه فعالیت هایی مانند بهره برداری از معادن، توسعه تکنولوژی، صنعتی شدن و شهرنشینی در زیست کره، پیوسته در حال افزایش است. از آنجا که فلزات سنگین سمیت زیادی دارند، تهدید جدی برای محیط زیست محسوب می شوند. اورانیوم به صورت طبیعی و در مقادیر بسیار کم در خاک، سنگ و آب وجود دارد ولی به صورت تجاری از کانی های معدنی مانند اورانینیت استخراج می شود (Aljamali *et al.*, 2019). اورانیوم نیز می تواند به صورت ترکیبی با عناصر دیگر وارد چرخه غذایی حیوانات و انسان ها شود (Bem & Bou-Rabee, 2004). امکان جابه جایی اورانیوم در محیط، وابسته به خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک و آب است (Bem & Bou-Rabee, 2004). میزان جابه جایی محصولات اورانیوم به جنس زمین، pH و حضور لیگاند های کمپلکس ساز در آب های سطحی وابسته است (McDiarmid *et al.*, 2000).

در سال های اخیر تکنولوژی های متنوعی با هدف حذف یا بازیافت فلزات سنگین و رادیونوکلئید های موجود در محیط های آلوده معرفی و توسعه یافته است. اما تکنولوژی های مبتنی بر استفاده از میکروارگانیسم ها و مواد زیستی، در این میان بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (Fu & Wang, 2011; Khan *et al.*, 2008). امروزه ثابت شده است که اغلب روش های مرسوم غیر زیستی برای پالایش فلزات سنگین کارایی کافی ندارند (Volesky, 1990) و نیاز به مصرف مقادیر زیادی مواد افزودنی و انرژی دارند (Ahalya *et al.*, 2003). اغلب روش های مرسوم غیر زیستی به لحاظ مقاومت در برابر تغییرات pH دارای محدودیت هایی هستند (Ahluwalia & Goyal, 2007) و قابلیت انتخابی محدود داشته و ممکن است به صورت غیر انتخابی عمل کنند (Antunes *et al.*, 2003). همچنین روش های مرسوم غیر زیستی پسماندهای فراوانی تولید می کنند (Ahalya *et al.*, 2003; Ahluwalia & Goyal, 2007) که نیاز به سرمایه گذاری های کلان دارند و اغلب بازگشت سرمایه از این روش ها طولانی است (Obob *et al.*, 2009). بنابراین دانشمندان امروزه برای یافتن روش های خلاقانه، جدید، با صرفه اقتصادی بیشتر و پایدارتر در تیمار منابع آبی و پساب ها تلاش می کنند. همین امر باعث ایجاد انگیزه برای تولید جاذب های ارزان قیمت شده است (Kumar *et al.*, 2015).

تحقیقات نشان داده است که فناوری های زیستی به لحاظ هزینه و کارآمد بودن برای حذف فلزات سنگین حتی از محلول های بسیار رقیق سودمندتر هستند (Kumar *et al.*, 2015). در مجموع سلول های زنده و غیر زنده میکروارگانیسم ها و هم فرآورده های مشتق از آنها، می توانند در فرایند زیست پالایی فلزات سنگین مفید باشند (Gadd, 1990). اما هنوز آگاهی کمی درباره میانکنش های فلزات و میکروب ها و کاربرد آنها وجود دارد و زمان آن فرا رسیده است که این میانکنش ها بیشتر درک شوند. ایده استفاده از ریزجلبک ها برای زیست پالایی فلزات سنگین اولین بار توسط اوسوالد و گوتز در سال ۱۹۵۷ مطرح شده است که اخیرا توجه زیادی به آن شده است (Doshi *et al.*, 2007; Oswald, 1988). امروزه جلبک ها به عنوان منابع طبیعی و

تجدید پذیر با زیست توده ای که تمایل های متفاوتی برای انواع فلزات دارند، یک کاندید بسیار مهم به عنوان جاذب زیستی مطرح هستند (Doshi et al., 2006; Mallick, 2002). تحقیقات نشان داده است که ظرفیت به دام اندازی و اتصال به فلزات توسط جلبک‌های ساکن دریا و همچنین آب شیرین در مورد فلزاتی همچون نقره، طلا و کبالت در مقایسه با کربن فعال، زئولیت های طبیعی (مواد معدنی سیلیکاته آبدار) و رزین های سنتزی تبادل یونی، بالاتر بوده است (Doshi et al., 2006). پراس ولا و همکاران در سال ۲۰۰۶ حذف فلزات سنگینی همچون روی، مس و منگنز را با استفاده از فناوری های وابسته به جلبک ها مانند HRAP (High Rate Algal Ponds) و ATS (Algal Turf Scrubber) با کمک زیست توده‌ی جلبک‌های سبزی همچون *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora* و سیانوباکتری‌هایی مانند *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Anabaena* و یا کنسرسیوم‌هایی از هر دوی آنها را بررسی کردند (Perales-Vela et al., 2006). امروزه تحقیقات نشان داده است که ریزجلبک‌های کلرلا و سندسموس کاندیدهای خوبی برای حذف فلزات سنگین هستند و می‌توانند پتانسیل زیادی در پاکسازی پساب های آلوده حاوی یون های فلزی داشته باشند (De-Bashan & Bashan, 2010).

معمولاً عوامل تاثیر گذار زیادی بر فرآیند زیست پالایی فلزات وجود دارند که مطالعه تمامی این عوامل تاثیر گذار و برهمکنش آنها منجر به صرف زمان و هزینه زیادی می شود. روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) یا به اختصار RSM، یک مجموعه از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. هدف در این گونه تکنیک‌ها، بهینه‌سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) است. یک آزمایش شامل یک سری از آزمون‌هاست که اجرا نامیده می‌شود. در هر آزمایش، تغییرات در متغیرهای ورودی به منظور تعیین علل تغییرات در متغیر پاسخ ایجاد می‌شوند (Ryan & Denton, 1973). در اصل امروزه RSM برای مدل پاسخ‌های تجربی توسعه داده شده است (Box & Draper, 1987). یک تحقیق بر اساس RSM، شامل پنج مرحله طراحی آزمایش‌ها (Experimental Design)، تجزیه و تحلیل داده‌ها (Experimental Analyses)، غربالگری (Screening) و حذف فاکتورهای غیر معنی دار و تجدید مدل ریاضی تا رسیدن به مدل قابل قبول، بهینه سازی (Optimization) و یافتن ناحیه و نقطه بهینه است. در نهایت باید اعتبار سنجی (Validation) یافته ها انجام شود و نقطه بهینه به کمک نرم افزار آماری محاسبه گردد (Fu, 2015).

بنابراین در جهت کاهش هزینه ها، افزایش دقت و صرفه جویی در زمان در این پژوهش، ابتدا از طراحی پلاکت برمن (Plackett-Burman) برای شناسایی مولفه های مؤثر بر زیست پالایی اورانیوم توسط *C. vulgaris* از محلول‌های حاوی اورانیوم استفاده شد. پس از تعیین عوامل مؤثر در زیست پالایی اورانیوم، آزمایش‌های بهینه سازی عوامل مؤثر بر زیست پالایی اورانیوم توسط ریزجلبک منتخب توسط روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد.

مواد و روش ها

آماده سازی محلول فلزی اورانیوم

جهت ساخت محلول های اورانیوم از نمک اورانیل نیترات هگزا هیدرات $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ استفاده شد. pH هر محلول به وسیله H_2SO_4 یک نرمال تنظیم گردید (Kasra-Kermanshahi et al., 2019). برای جلوگیری از اثر تداخلی آلاینده ها تمام ظروف بکار رفته با HNO_3 یک نرمال و آب مقطر شسته شدند (Li et al., 2014). کار در کلیه موارد آزمایشگاهی با رعایت اصول ایمنی و در آزمایشگاه ویژه مواد رادیواکتیو پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای انجام شد.

آماده سازی زیست توده جلبکی جهت آزمایش های حذف اورانیوم

ریزجلبک سبز *C. vulgaris* (ریزجلبک خریداری شده از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (IBRC) به شماره شناسایی *Chlorella vulgaris* IBRC-M-50026) در محیط کشت مایع BBM با ترکیب موجود در جدول ۱ در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سلسیوس، میزان روشنایی و تاریکی ۱۶ ساعت به ۸ ساعت و شدت روشنایی ۳۰۰۰ لوکس اگرمگذاری گردید. به منظور جمع آوری زیست توده ریزجلبکی، محیط کشت حاوی جلبک در دمای ۴ درجه سلسیوس، با سرعت ۴۵۰ دور بر دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول ها با آب مقطر شسته و برای آزمایش های بعدی استفاده شدند. وزن خشک زیست توده نیز پس از شست و شوی سلول ها و خشک شدن آنها در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس تعیین شد (Kumar et al., 2015).

جدول ۱: ترکیب محیط کشت BBM (Heidari et al., 2017)

عناصر میکرو	محلول های ذخیره (g/l)	حجم	عناصر ماکرو	محلول های ذخیره (g/l)	حجم
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۸/۸۲	۱ ml	NaNO_3	۲۵	۱۰ ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۱/۴۴	۱ ml	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۲/۵	۱۰ ml
MoO_3	۰/۷۱	۱ ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۷/۵	۱۰ ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	۱/۵۷	۱ ml	K_2HPO_4	۷/۵	۱۰ ml
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	۰/۴۹	۱ ml	KH_2PO_4	۱۷/۵	۱۰ ml
H_3BO_3	۱۱/۴۲	۱ ml	NaCl	۲/۵	۱۰ ml
محلول اسیدی	محلول های ذخیره (g/l)	حجم	محلول بازی	محلول های ذخیره (g/l)	حجم
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۴/۹۸	۱ ml	EDTA anhydrides	۵۰	۱ ml
H_2SO_4	۱	۱ ml	KOH	۳۱	۱ ml

آزمایش‌های زیست پالایی در حالت ناپیوسته

آزمایش‌های حذف اورانیوم توسط ریزجلبک *C. vulgaris* در ظروف حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول اورانیوم با شرایط مشخص شده جهت هر آزمایش در طراحی آزمایش‌ها انجام شد. سپس هر نمونه با صافی غشایی ۰/۲ میکرومتری فیلتر گردید و میزان اورانیوم در محلول توسط دستگاه ICP- OES(Perkin Elmer Optima 2000 DV) سنجیده شد. دو ارلن حاوی ریزجلبک‌ها و محیط فاقد اورانیوم به عنوان کنترل استفاده شدند.

طراحی آزمایش‌ها

ابتدا عوامل تأثیر گذار بر جذب اورانیوم مانند اثر pH، دما، مقدار زیست توده و غیره انتخاب و سپس با استفاده از طراحی پلاکت برمن (Plackett-Burman) شناسایی عوامل مؤثر بر زیست پالایی اورانیوم توسط ریزجلبک *C. vulgaris* از محلول‌های حاوی اورانیوم انجام شد. در این بررسی از نرم افزار آماری Minitab 16.0 برای طراحی آزمایش‌ها، تحلیل نتایج و تعیین اهمیت هر عوامل استفاده شد. نتایج طراحی آزمایش غربالگری عوامل در جدول ۲ ارائه شده است. در این بررسی، پنج عامل شامل غلظت اولیه اورانیوم (A)، دما (B)، زمان (C)، pH (D) و مقدار زیست توده (E) در دو سطح و با ۲ تکرار در نقطه مرکزی و با انجام ۱۴ آزمایش، غربالگری شد (در روش پلاکت برمن هر عامل مستقل بررسی می شود).

جدول ۲: متغیرهای مستقل روش طراحی پلاکت برمن و سطوح کد شده

متغیر	نماد	سطح‌ها	
		+1	-1
غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)	A	۱۰	۱
دما (درجه سلسیوس)	B	۴۰	۲۵
زمان (ساعت)	C	۴۸	۰/۵
pH	D	۷	۴
مقدار زیست توده (g/l)	E	۲/۵	۰/۷۵

پس از غربال عوامل مؤثر در زیست پالایی اورانیوم، آزمایش‌های بهینه سازی عوامل مؤثر بر زیست پالایی اورانیوم توسط ریزجلبک *C. vulgaris* توسط روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد. در این پژوهش، متغیرهای تأثیرگذار منتخب در پنج سطح $-\alpha$ ، -1 ، 0 ، $+1$ و $+\alpha$ به صورتیکه در جدول ۳ ارائه شده است مطالعه شد. بر این اساس، با استفاده از طراحی مرکب مرکزی

۱۳ سری آزمایش طراحی گردید. جهت تحلیل آماری داده ها و بهینه سازی آن از نرم افزار آماری Design-Expert 7.0 استفاده شد (Witek-Krowiak *et al.*, 2014).

جدول ۳: متغیرهای روش طراحی مرکب مرکزی و سطوح کد شده

متغیر	نماد	سطحها				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	A	۴	۴/۷	۶/۵	۸/۳	۹
غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)	B	۱	۲/۳	۵/۵	۸/۶۸	۱۰

در فرآیند زیست پالایی، مقدار یون فلزی حذف شده توسط ریزجلبک با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید که در آن C_0 غلظت اولیه فلز در محلول (mg/l)، C_f غلظت نهایی فلز در محلول (mg/l) است (Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2019; (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

$$R = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100$$

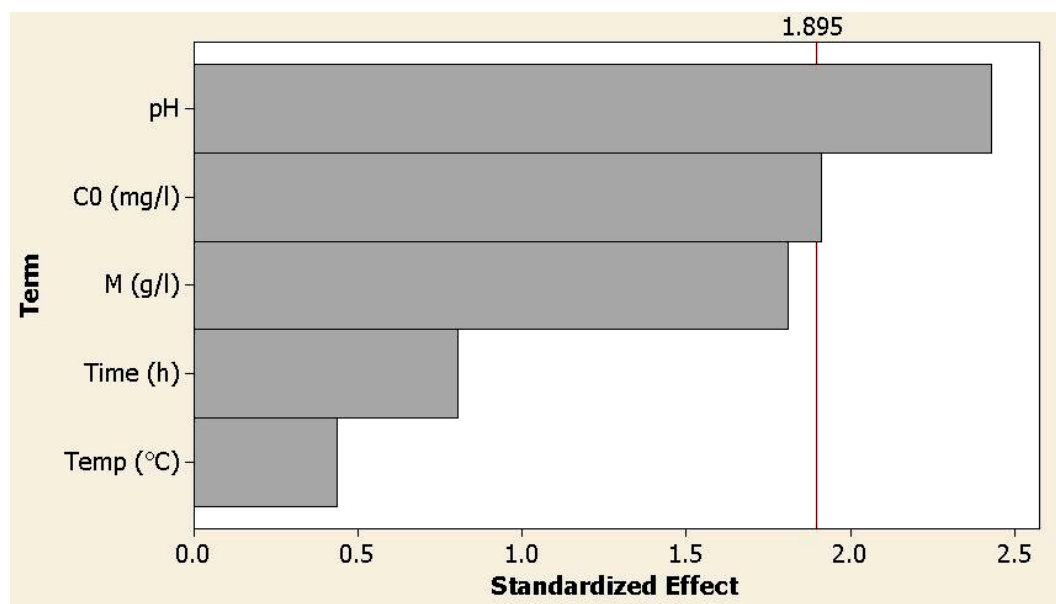
نتایج و بحث

غربالگری عوامل مؤثر بر میزان حذف اورانیوم در هر آزمایش در جدول ۴ مشاهده می‌گردد. آزمایش‌های زیست پالایی اورانیوم، درون ظروف حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول اورانیوم با غلظت و pH مشخص و با میزان زیست توده لازم از ریزجلبک در دمای مشخص انجام گرفت.

نتایج تحلیلی نرم افزار Minitab که شامل نمودار Pareto، نمودار نرمال اثرات استاندارد شده و نمودار اثرات اصلی بر پاسخ است در اشکال ۱ تا ۳ مشاهده می‌گردد. باتوجه به مقادیر بدست آمده، عوامل غلظت اولیه اورانیوم و pH توسط نرم افزار به عنوان عوامل مؤثر شناسایی گردید و مقدار زیست توده، دما و زمان به عنوان عوامل غیر مؤثر شناسایی شد. نمودار Pareto در شکل ۱، عوامل مؤثر و غیر مؤثر و نیز میزان تاثیرگذاری کمی هر یک از آنها بر پاسخ را ارائه می‌دهد.

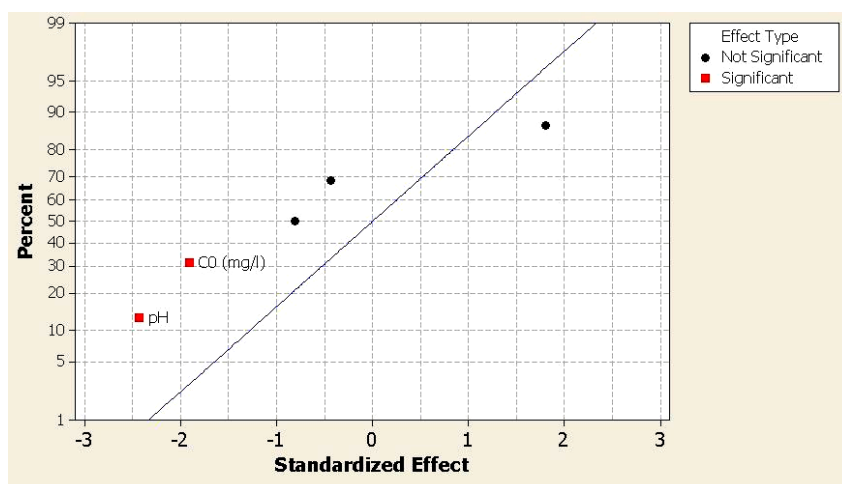
جدول ۴: غربالگری عوامل مؤثر بر جذب زیستی اورانیوم با استفاده از روش پلاکت برمن

ردیف	شماره آزمایش	غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)	دما (درجه سلسیوس)	زمان (ساعت)	pH	مقدار زیست توده (g/l)	پاسخ R (%)
۱	۱	۱	۲۵	۴۸	۷	۲/۵	۸۵
۲	۲	۱۰	۴۰	۰/۵	۷	۲/۵	۱۰/۰۲
۳	۳	۱۰	۲۵	۴۸	۴	۰/۷۵	۲۸/۱۷
۴	۴	۱	۴۰	۴۸	۷	۰/۷۵	۹/۱۵
۵	۵	۱	۲۵	۰/۵	۴	۰/۷۵	۸۸/۳۱
۶	۶	۱۰	۴۰	۴۸	۴	۲/۵	۹۶/۸۳
۷	۷	۵/۵	۳۲/۵	۲۴/۲۵	۵/۵	۱/۶۲۵	۹۶/۰۳
۸	۸	۱	۲۵	۰/۵	۷	۲/۵	۸۶
۹	۹	۱۰	۲۵	۴۸	۷	۰/۷۵	۲۰/۹۱
۱۰	۱۰	۱	۴۰	۴۸	۴	۲/۵	۹۱/۵۵
۱۱	۱۱	۱۰	۴۰	۰/۵	۷	۰/۷۵	۴۸/۴۷
۱۲	۱۲	۵/۵	۳۲/۵	۲۴/۲۵	۵/۵	۱/۶۲۵	۹۴
۱۳	۱۳	۱	۴۰	۰/۵	۴	۰/۷۵	۹۲/۰۴
۱۴	۱۴	۱۰	۲۵	۰/۵	۴	۲/۵	۷۸/۱۷

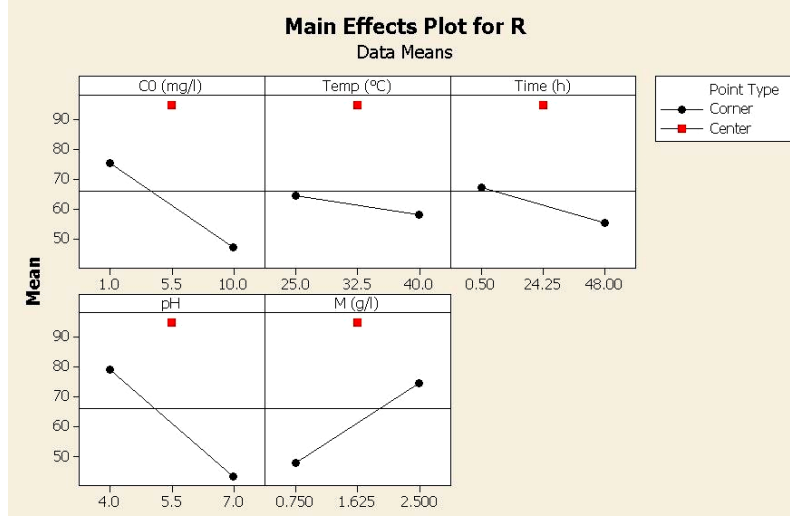


شکل ۱: نمودار Pareto بیانگر میزان تاثیر عوامل بر پاسخ خروجی نرم افزار Minitab (C0 = غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)، M = مقدار زیست توده (g/l)، Time = زمان (ساعت)، Temp = دما (درجه سلسیوس))

در نمودار اثرات استاندارد شده، عوامل دارای اثر مثبت در میزان حذف اورانیوم در سمت راست خط مورب و عوامل دارای اثر منفی در میزان حذف اورانیوم در سمت چپ خط مورب نشان داده شدند (شکل ۲). همچنین در نمودار اثرات اصلی، میزان اثر گذاری و نوع اثر (مثبت یا منفی) هر یک از عوامل به صورت مجزا ارائه شده است (شکل ۳).



شکل ۲: نمودار نرمال اثرات استاندارد شده عوامل فرآیند، خروجی نرم افزار Minitab (C0 = غلظت اولیه اورانیوم (mg/l))



شکل ۳: نمودار اثرات اصلی بر پاسخ، خروجی نرم افزار Minitab (C0 = غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)، M = مقدار زیست توده (g/l)، Time = زمان (ساعت)، Temp = دما (درجه سلسیوس))

بررسی عوامل تأثیر گذار بر زیست پالایی اورانیوم با طراحی پلاکت برمن (Plackett-Burman) توسط Minitab نشان داد که غلظت اولیه اورانیوم و pH از نظر آماری عوامل مؤثر می باشند و مقدار زیست توده، دما و زمان به عنوان عوامل غیر مؤثر شناسایی شدند. بنابراین، در ادامه بهینه سازی مقدار زیست توده، دما و زمان از آزمایش‌ها حذف شد. جهت تعیین اثرات اصلی و

برهمکنش دو متغیر تاثیرگذار غلظت اولیه اورانیوم و pH بر زیست پالایی اورانیوم توسط ریزجلبک *C. vulgaris*، از طراحی مرکب مرکزی (CCD) در RSM استفاده شد. بر این اساس، با استفاده از طراحی مرکب مرکزی، ۱۳ سری آزمایش طراحی گردید. مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی در جدول ۵ ارائه شده است.

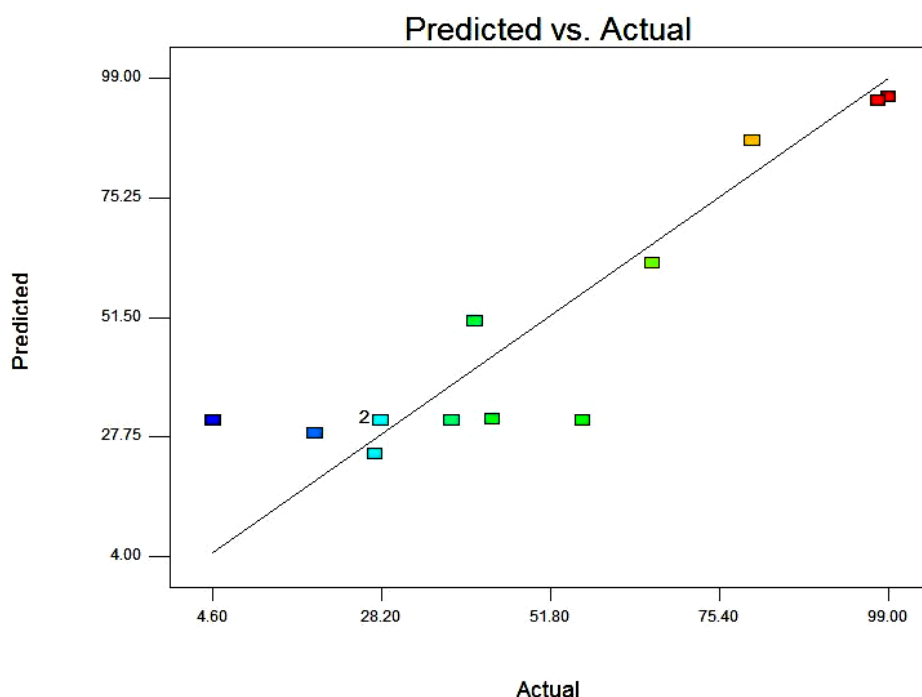
جدول ۵: مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش رویه پاسخ

ردیف	شماره آزمایش	pH	غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)	پاسخ R (%)
۱	۱	۶/۵	۱۰	۲۷/۲۴
۲	۲	۸/۳	۲/۳	۱۸/۸۵
۳	۳	۶/۵	۵/۵	۴/۶
۴	۴	۴	۵/۵	۸۰
۵	۵	۶/۵	۵/۵	۳۸/۰۳
۶	۶	۴/۷	۸/۶۸	۹۹
۷	۷	۴/۷	۲/۳	۶۶/۰۳
۸	۸	۶/۵	۵/۵	۵۶/۲۸
۹	۹	۹	۵/۵	۴۳/۶۴
۱۰	۱۰	۶/۵	۱	۹۷/۶
۱۱	۱۱	۶/۵	۵/۵	۲۸/۰۶
۱۲	۱۲	۶/۵	۵/۵	۲۸/۰۶
۱۳	۱۳	۸/۳	۸/۶۸	۴۱/۲

مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

$$R1 = -544.42261 + 211.84291 * pH + 144.23372 * C - 51.07477 * pH * C - 16.94662 * pH^2 + 1.40686 * C^2 + 3.89252 * pH^2 * C$$

به منظور تأیید مؤثر بودن اثرات اصلی و برهمکنشی متغیرها، تحلیل واریانس انجام شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F بزرگ در جدول تحلیل واریانس نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵ درصد است. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۳۹ و ۴/۷۹ است که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد. همچنین مقادیر R^2 برابر با ۰/۸۳ است که نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی به خوبی قادر است مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند. در بحث کارآمدی مدل، شکل ۴ انحراف داده‌های تجربی از داده‌های پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به نزدیکی اکثر داده‌های تجربی به خط ترسیم‌شده، می‌توان نتیجه گرفت که معادله ارائه شده به خوبی فرآیند زیست پالایی اورانیوم را توسط ریزجلبک منتخب توصیف می‌کند.



شکل ۴: مقایسه‌ی مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده به منظور ارزیابی کارآمدی مدل

جدول ۶: تحلیل واریانس مدل پیشنهادی

مرجع	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	8771.532	6	1461.922	4.793803	0.0390
A-pH	3057.651	1	3057.651	10.02638	0.0194
B-C	2475.265	1	2475.265	8.116666	0.0292
AB	28.1961	1	28.1961	0.092458	0.7713
A ²	1352.689	1	1352.689	4.435617	0.0798
B ²	1411.518	1	1411.518	4.628524	0.0750
A ² B	2996.311	1	2996.311	9.825235	0.0202

تحلیل واریانس مدل، فاکتورهای اصلی و برهم کنش فاکتورها در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که فاکتور اصلی A و B از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0.05$) روی فرآیند تاثیرگذار هستند. همچنین در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده نتایج نشان داد که با افزایش pH از ۴ تا ۹، میزان حذف از ۸۶/۵ درصد به ۳۱/۲۴ درصد کاهش می‌یابد. مطالعات قبلی حذف فلزات نشان می‌دهد که pH یکی از مهمترین عوامل محیطی است. pH محلول می‌تواند فعالیت گروه‌های عاملی زیست توده را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین pH به شدت می‌تواند برای فلزات اختصاصیت داشته باشد و در دسترس بودن یون‌های فلزی را تحت تأثیر قرار دهد (Volesky, 1994; Yi et al., 2012). برای مثال در محدوده pH های اسیدی تا نزدیک به خنثی، چهار کمپلکس اصلی، $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ ، $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ ، UO_2^{2+} و $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ برای اورانیوم در محلول وجود دارد. همراه با افزایش pH، درصد UO_2^{2+} در محلول کاهش یافته، در حالیکه درصد گونه‌های تک ظرفیتی $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ و $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$

افزایش می‌یابد (Bahrami- Bavani, 2017; Tsuruta & technology, 2006; Wang et al., 2010) که می‌تواند در دسترس بودن اورانیوم را به منظور جذب تحت تاثیر قرار دهد.

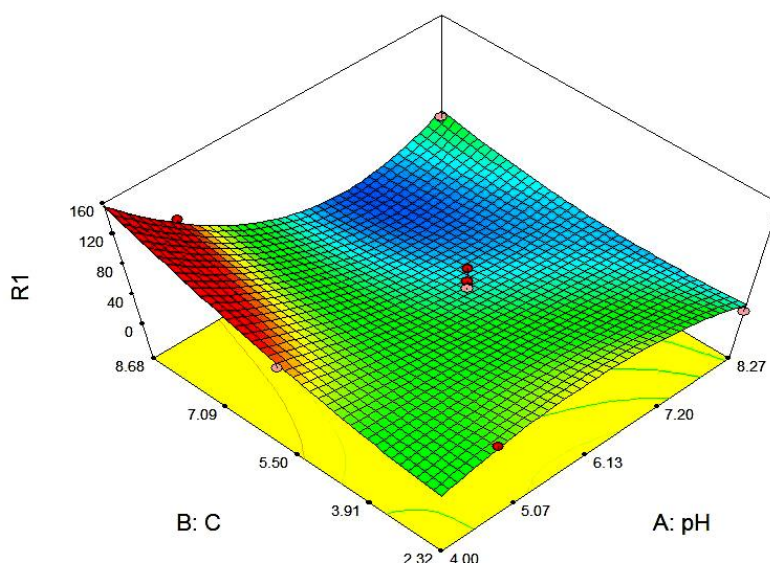
نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اورانیوم از ۱ تا ۱۰ میلی گرم بر لیتر، میزان حذف از ۹۴/۶۷ درصد به ۲۴/۳ درصد کاهش می‌یابد. این امر ناشی از افزایش سمیت اورانیوم همراه با افزایش غلظت این فلز و احتمالاً به دلیل سیستم‌های مقاومت ریزجلبک می‌باشد که باعث کاهش در بازده جذب اورانیوم توسط ریزجلبک شده است. در بعضی از تحقیقات بیان شده است که افزایش غلظت اورانیوم منجر به افزایش نیروی محرکه انتقال جرم و غلبه بر مقاومت‌های انتقال جرم می‌شود که افزایش بازده جذب اورانیوم را از محیط‌های آبی به دنبال دارد (Kasra-Kermanshahi et al., 2019). اما در برخی از گزارش‌ها نیز ذکر شده است که حذف زیستی در غلظت‌های کم یون فلز، با کارایی بیشتری نسبت به غلظت‌های بالاتر صورت می‌گیرد. با توجه به سمیت برخی از یون‌های فلزات سنگین برای سویه‌های جلبکی زنده، جذب یون‌های فلزی با افزایش غلظت یون فلز کاهش می‌یابد. بنابراین، بهینه سازی غلظت یون‌های فلزی برای جذب کارآمد فلزات توسط جلبک‌ها ضروری است (Mehta, 2001).

نتایج رویه سه بعدی برهمکنش فاکتورهای مؤثر در حذف اورانیوم، توسط ریزجلبک *C. vulgaris* در شکل ۵ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که ریزجلبک *C. vulgaris* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design-Expert 7.0 (غلظت اورانیوم برابر با ۷/۱ میلی گرم بر لیتر و pH ۴/۳) قادر به حذف ۹۹/۶۳ درصد اورانیوم از محیط آبی است.

Design-Expert® Software

R1
99
4.6

X1 = A: pH
X2 = B: C



شکل ۵: رویه سه بعدی برهمکنش مقدار غلظت اورانیوم (mg/l) و pH بر حذف زیستی اورانیوم توسط ریزجلبک *C. vulgaris*
(C= غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)، R= مقدار یون اورانیوم حذف شده (%))

نتیجه گیری

استفاده از فرآیندهای زیست پالایی برای حذف فلزات سنگین و اورانیوم از پساب های پرتوزا از فاضلاب ها، بسیاری از محدودیت های بزرگ سایر روش های فیزیکوشیمیایی را نداشته و از نظر اقتصادی نیز مطلوب تر است. با این حال مطالعات بیشتری جهت برطرف نمودن محدودیت های کنونی این فناوری برای استفاده در مقیاس صنعتی مورد نیاز است. زیست پالایی که در آن از ریزجلبک ها جهت سمیت زدایی بسیاری از آلاینده های زیست محیطی استفاده می شود، می تواند جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکوشیمیایی فعلی در حذف فلزات سنگین باشد. به منظور انجام درست آلودگی زدایی توسط فن آوری زیست پالایی می بایست کارایی جاذب های زیستی مختلف در این فرآیند با توجه به دامنه ی غلظت های مختلف یون های فلزی تعیین گردد. بنابراین باید مطالعات بیشتری انجام شود تا ریزجلبک هایی که بهترین عملکرد را در زیست پالایی فلزات مختلف و ترکیبات آن دارند انتخاب شوند. موفقیت ریزجلبک ها در زمینه حذف فلزات سنگین و رادیونوکلئیدها به توانایی یک ریزجلبک برای حذف آلاینده ها بستگی دارد. استفاده موفق از ریزجلبک ها در پاکسازی مشروط بر تجزیه و تحلیل عوامل مؤثر در حذف فلزات توسط یک جاذب زیستی است. نتایج این پژوهش نشان داد که ریزجلبک زنده *C. vulgaris* به دلیل داشتن توانایی بالای حذف اورانیوم از محلول های آلوده به غلظت های پایین اورانیوم، می تواند گزینه مناسبی برای ساخت تالاب های مصنوعی در زیست پالایی محلول های آلوده به غلظت پایین اورانیوم در فاز نیمه صنعتی از این ریزجلبک باشد.

منابع

- Ahalya, N., Ramachandra, T. and Kanamadi, R. (2003). Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemistry and Environment* 7(4): 71-79.
- Ahluwalia, S.S. and Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12): 2243-2257.
- Aljamali, N.M., Jawad, A.M. and Jawad, A. (2019). A Literature Review on Types of Contamination (Biological, Chemical, Medical). *International Journal of Green Chemistry*, 5(1).
- Antunes, W.M., Luna, A.S., Henriques, C.A. and da Costa, A.C. (2003). An evaluation of copper biosorption by a brown seaweed under optimized conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3): 174-184.
- Bahrami- Bavani, M. (2017). Study on the biosorption ability of Molybdenum and Uranium by *Acidithiobacillus ferrooxidans* from aqueous solutions. *M.Sc.Thesis Alzahra University*.
- Bem, H. and Bou-Rabee, F. (2004). Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment international*, 30(1): 123-134.
- Box, G.E. and Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. Wiley New York.

- De-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: A Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6): 1611-1627.
- Doshi, H., Ray, A., Kothari, I. and Gami, B. (2006). Spectroscopic and scanning electron microscopy studies of bioaccumulation of pollutants by algae. *Current microbiology*, 53(2): 148-157.
- Doshi, H., Ray, A. and Kothari, I. (2007). Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: spectroscopic, kinetics and SEM studies. *Biotechnology Bioengineering*, 96(6): 1051-1063.
- Fu, F. and Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A Review. *Journal of Environmental Management*, 92(3): 407-418.
- Fu, M.C. (2015). Handbook of simulation optimization. International Series in Operations Research & Management Science, University of Maryland College Park, MD, USA.
- Gadd, G. (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8): 834-840.
- Heidari, F., Riahi, H., Aghamiri, M.R., Shariatmadari, Z. and Zakeri, F. (2017). Isolation of an efficient biosorbent of radionuclides (^{226}Ra , ^{238}U): green algae from high-background radiation areas in Iran. *Journal of Applied Phycology*, 29(6): 2887-2898.
- Kasra-Kermanshahi, R., Bahrami-Bavani, M. and Tajer-Mohammad-Ghazvini, P. (2019). Microbial clean-up of uranium in the presence of molybdenum using pretreated *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 322(2): 1139-1149.
- Khan, M.A., Rao, R.A.K. and Ajmal, M. (2008). Heavy metal pollution and its control through nonconventional adsorbents (1998-2007): A Review. *Journal of International Environmental Application Science*, 3(2): 101-141.
- Kumar, K.S., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S. and Shin, K.-H. (2015). Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 113: 329-352.
- Li, X., Ding, C., Liao, J., Lan, T., Li, F., Zhang, D., Yang, J., Yang, Y., Luo, S. and Tang, J. (2014). Biosorption of uranium on *Bacillus sp. dwc-2*: preliminary investigation on mechanism. *Journal of Environmental Radioactivity*, 135: 6-12.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A Review. *Biometals*, 15(4): 377-390.
- McDiarmid, M.A., Keogh, J.P., Hooper, F.J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B. and Anderson, L. (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environmental Research*, 82(2): 168-180.
- Mehta, S.K. and Gaur, J.P. (2001). Removal of Ni and Cu from single and binary metal solutions by free and immobilized *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Protistology*, 37(3): 261-271.

- Oboh, I., Aluyor, E. and Audu, T. (2009). Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions using a biomaterial. *Leonardo Journal of Sciences*, 14: 58-65.
- Oswald, W. (1988). Micro-algae and waste-water treatment. Borowitzka MA, LJ Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. USA.
- Perales-Vela, H.V., Pena-Castro, J.M. and Canizares-Villanueva, R.O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1): 1-10.
- Ryan, R. and Denton, R. (1973). Initial releases of *Chrysocharis laricinellae* and *Dicladocerus westwoodii* for biological control of the larch casebearer in the western United States. Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station, Portland, Oregon.
- Tsuruta, T.J. (2006). Removal and recovery of uranium using microorganisms isolated from Japanese uranium deposits. *Journal of Nuclear Science Technology*, 43(8): 896-902.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.-S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3): 266-291.
- Volesky, B. (1990). Removal and recovery of heavy metals by biosorption. *Biosorption of Heavy Metals*, 7-43.
- Volesky, B. (1994). Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4): 291-302.
- Wang, J.-s., Hu, X.-j., Wang, J., Bao, Z.-l., Xie, S.-b. and Yang, J.-h. (2010). The tolerance of *Rhizopus arrhizus* to U (VI) and biosorption behavior of U (VI) onto *R. arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*, 51(1-2): 19-23.
- Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A. and Pokomeda, K. (2014). Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology*, 160: 150-160.
- Yi, Z.-j. and Yao, J. (2012). Kinetic and equilibrium study of uranium (VI) adsorption by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry*, 293(3): 907-914.

Study of effective factors on biological removal of uranium by live microalgae *Chlorella vulgaris*

P. Mohammadi¹, N. Javanmardi², P. Tajer-Mohammad-Ghazvini^{3*}

Received: 2021.5.16

Accepted: 2021.7.19

Abstract

Bioremediation by microalga is an effective method to remove radionuclides and heavy metals from wastewater. In this study, the bioremediation of uranium from aqueous solutions was evaluated using microalgae *Chlorella vulgaris* in a batch system. The Plackett-Burman method by Minitab statistical software was used to screen for effective factors such as initial uranium concentration, temperature, time, pH and amount of biomass on the bioremoval of uranium. The results showed that the initial uranium concentration and pH were statistically effective. To determine the main effects and interaction of factors affecting uranium removal, central composite design was used. The experimental data were then processed and the equation was evaluated to match the experimental data, and then the optimal removal values were determined. The results showed that *C. vulgaris* in optimal conditions proposed by Design-Expert software can remove 99.63% of existing uranium from solutions containing 7.1 mg / l uranium with pH 4.3.

Keywords: Bioremediation, Experimental design, Heavy metals, Microalgae, Uranium

¹ Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

² Msc., Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

³ Assistant Professor, Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran, (Corresponding Author: ptajer@aeoi.org.ir).

اثرات باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در ترکیب با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگ‌خوار چغندر قند (*Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) در شرایط آزمایشگاهی

مجید علی‌محمدیان^۱، شهرام آرمیده^{۲*}، شهرام میرفخرایی^۳، مریم فروزان^۴

چکیده

استفاده از ترکیبات گیاهی و فیزیکی به همراه باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) در کاهش دوز مصرفی و افزایش اثر آن از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا کارایی باکتری Btk در اختلاط با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگ‌خوار چغندر قند *Spodoptera exigua* Hb. در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی گرفت. شاخص LC_{50} حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری، نانوذرات سیلیکا و نیمارین بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب (۷۲۴/۷۸، ۹۸۲/۲۸ و ۳۹۳/۷۱) میلی گرم بر لیتر به دست آمد. در بررسی اثر ترکیبی، بیشترین و کمترین مرگ و میر در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (۶۶ درصد) و تیمار شاهد (آب مقطر) (۲ درصد) مشاهده شد، همچنین در ارزیابی خسارت، بیشترین و کمترین خسارت در تیمار شاهد (۵۵/۳ درصد) و تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (۱۵ درصد) حاصل شد. در این بررسی با توجه به افزایش کارایی باکتری در تلفیق با نیمارین، کاربرد توأم آنها در کنترل لاروهای برگ‌خوار چغندر قند قابل توصیه است.

واژه های کلیدی: ، باکتری *Bacillus thuringiensis*، برگ‌خوار چغندر قند، نانومواد، کشندگی

۱. دانشجوی دکتری حشره شناسی گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه- پردیس

۲. دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه * نویسنده مسئول: Sh.aramideh@Urmia.ac.ir

۳. استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۴. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه

مقدمه

یکی از مهم ترین آفات چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) لارو برگ‌خوار کارادرینا (*Spodoptera exigua* Hb.) است که به طیف وسیعی از گیاهان زراعی، سبزیجات و صیفی‌جات خسارت اقتصادی وارد می‌کند. ویژگی‌های زیستی این آفت مانند قدرت زادو ولد بالا، طیف وسیع میزبانی و قدرت سازگاری با شرایط مختلف محیطی، این حشره را به آفتی بسیار مهم تبدیل کرده است (Farahani et al., 2011). فشار مبارزه شیمیایی روی این آفت موجب کاهش کارایی سموم به واسطه مقاومت به گروه‌های مختلف آفت‌کش‌های شیمیایی شده است (Ahmad et al., 2018). از روش‌های جایگزین کنترلی مثل کنترل زراعی، کنترل زیستی و میکروبی بخصوص بوسیله نماتودها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌های بیمارگر در برنامه‌های مدیریت این آفت مورد توجه قرار گرفته است (Schünemann et al., 2014; Chattopadhyay et al., 2017; Luna-Espino et al., 2018). باکتری *Bacillus thuringiensis* با کاربرد نزدیک به ۹۵ درصد، مهمترین میکروارگانسیم مورد استفاده در کنترل زیستی آفات کشاورزی است (Sansinenea et al., 2012). این باکتری دارای بیش از یک هزار جدایه است که نزدیک به ۶۰ درصد آنها روی راسه‌های دوبالان، بالپولکداران و سخت بالپوشان مؤثرند (Tabashnik et al., 2015) بر اساس منابع موجود، فرآورده‌های *Btk* سالیانه در چندین میلیون هکتار علیه بالپولکداران آفت محصولات کشاورزی، جنگلی و محصولات انباری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dubois et al., 1988; Reardon et al., 1994; Kish, 2004; Jijkli, 2010). این باکتری، در مرحله اسپورزایی، یک یا چند کریستال پروتئینی درون سلولی تولید می‌کند که خاصیت حشره کشی داشته و برای طیف گسترده‌ای از حشرات و دیگر بی‌مهرگان از قبیل نماتدها و کنه‌ها سمی است ولی برای انسان، مهره داران و گیاهان، غیر سمی است و به راحتی تجزیه می‌شود (Xu et al., 2014; Soundararajan, 2012; Palma et al., 2014). یکی از جدیدترین استراتژی‌ها در کنترل آفات و حفاظت گیاهان، ترکیب یا تلفیق چند عامل با یکدیگر است (Sharifzadeh et al., 2018)، روش تلفیق دو یا چند ماده بویژه هنگامی که ترکیبات اثر متفاوتی داشته باشند موجب کاهش مقاومت آفات می‌شود (Ghassemi-Kahrizeh & Aramideh, 2014; Zhu et al., 2016; Sudo et al., 2017) و در مواردی موجب کاهش هزینه مبارزه می‌شود (Das, 2014). وقتی دو ماده خاصیت تشدید کنندگی اثر داشته باشند، موجب کاهش دز مصرفی می‌گردند (Wraight & Ramos, 2005). تاثیر توأم باکتری *B. thuringiensis* و حشره‌کش گیاهی آزادیراختین (*Azadirachta indica* A. Juss.) با فرم تجاری نیمارین در کنترل پروانه سفید آمریکایی (*Hyphantria cunea* Drury) نشان داده که آزادیراختین دارای تشدید کنندگی اثر است (Sheibani, 2010). نتایج مشابه روی اثر بیماری‌زایی باکتری *B. thuringiensis* روی سنین مختلف لارو سوسک کلرادوی سیب زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) و اثر تشدیدکننده‌های گیاهی در افزایش کارایی آن در شرایط آزمایشگاه مشاهده شد (Javi et al., 2004). تاثیر باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سنین اول، دوم و سوم برگ‌خوار چغندر قند و نقش حناء و کاربراندوم در افزایش کارایی آن در

۱۵۰ / اثرات باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در ترکیب با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگخوار...

آزمایشگاه نشان داد که ترکیبات گیاهی نظیر حناء دارای تشدید کنندگی اثر است (Namvar et al., 2003). از طرف دیگر مطالعات مختلف حاکی از اثرات حشره کشی ترکیبات فیزیکی نظیر نانوذرات سیلیکا SiO_2 NPs روی آفات مختلف نظیر شیشه-گندم (*Sitophilus granarius* L.) (Goswami et al., 2010; Debnath et al., 2011; El-Naggar et al., 2020)، شیشه چهار-نقطه‌ای (*Callosobruchus maculatus* F.) (Rouhani et al., 2012; Arumugam et al., 2016)، شیشه آرد (*Tribolium confusum* Jacquelin du Val) و شیشه دندانه‌دار برنج (*Oryzaephilus surinamensis* L.) است (El-Naggar et al., 2020). همچنین SiO_2 NPs در مزرعه روی آفاتی نظیر برگخوار پرودرینا (*Spodoptera litoralis* Bois) (El-Samahy et al., 2015;)، پروانه پشت الماسی کلم (*Plutella xylostella* L.) (Shoaib et al. 2018; Bilal et al. 2020)، روی شته ها و شپشک‌ها (Debnath et al., 2010; Pavitra et al., 2018; Caceres et al., 2019) اثرات خوبی نشان داده‌اند. لذا جهت کاهش مصرف مقدار باکتری و افزایش تاثیر آن در اختلاط با یک ترکیب سازگار با محیط زیست، اثر باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در اختلاط با نانو ذرات سیلیکا و نیمارین جهت کنترل لارو سن دوم برگخوار چغندر قند *Spodoptera exigua* Hb. در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در تحقیق

باکتری *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) با نام تجاری Belthiral® به صورت پودر و تابل، ۳۲۰۰۰ IL/mg ساخت کارخانه Probelete S.A.CTRA مادرید-اسپانیا و فرمولاسیون تجاری آزادیراختین (*Azadirachta indica* A. Juss.) با نام تجاری نیمارین® امولسیون حاوی ۰/۱۵ درصد ماده مؤثره آزادیراختین، تولید شرکت Biotech international Ltd.(New Delhi, India) مورد استفاده قرار گرفت، همچنین نانو ذره سیلیس SiO_2 با قطر ذرات ۴۰-۵۰ نانومتر و با خلوص ۹۹/۹۹ درصد تولید شرکت پیشگامان (Pishgamannano® www.Irannanotech.com) در آزمایشات بکار رفت.

پرورش میزبان

برای انجام زیست سنجی در شرایط آزمایشگاهی، لاروهای پروانه برگخوار چغندر قند روی غذای مصنوعی متشکل از لوبیا چیتی، آگار، مخمر آبجوی خشک، متیل پراهایدروکسی بنزوات، اسیدسوربیک، اسیدآسکوربیک، فرمالدئید و آب مقطر در دمای 26 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 57 ± 3 با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، پرورش یافتند (Singh & Moore, 2005). سپس لاروهای سن دوم که از دسته تخم‌های یکسان بوجود آمدند را با اندازه گیری عرض کپسول سر تفکیک و در آزمایش به کار برده شدند.

تعیین کشندگی (LC₅₀)

در شرایط آزمایشگاهی به منظور تعیین میزان کشندگی باکتری (*Bt*)، نانوذرات سیلیکا (NPs) و نیمارین (NE) روی سن دوم لاروی، ابتدا در یک سری آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌هایی با بیشترین و کمترین تلفات (۲۰ الی ۸۰ درصد) تعیین و سپس در فاصله این دو غلظت، سه غلظت به روش لگاریتمی مشخص شد (Pourmirza, 2005) (جدول ۱)، بدین ترتیب پنج غلظت به همراه آب مقطر (بعنوان شاهد) و هر غلظت در سه تکرار و تمام غلظت‌ها به همراه یک درصد پخش کننده توپین-۸۰ روی برگ‌های چغندر قند کشت شده در گلدان‌هایی به ابعاد ۴×۸×۱۰ سانتیمتر که به خوبی برگ‌ها توسط ظروف بستنی یک کیلویی محصور شده بود، به وسیله اسپری دستی پاشیده شد و تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم در هر تکرار رهاسازی شدند و درب آنها با توری مسدود گردید. نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف هر ترکیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت یادداشت برداری شد و تجزیه و تحلیل گردید.

اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری

این آزمایش به منظور ارزیابی خاصیت اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری *Btk* روی مرگ و میر لاروهای سن دوم برگ‌خوار چغندر قند طراحی شد. بدین منظور بعد از تعیین مقادیر LC₂₅ و LC₅₀ اثرات توأم نانوسیلیکا همراه با باکتری و نیمارین همراه با باکتری بر اساس مقدار LC₂₅ و LC₅₀ توزین و محلول‌های هر تیمار شامل باکتری (*Bt*, LC₅₀)، نانوسیلیکا (NPs, LC₅₀)، نیمارین (NE, LC₅₀)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (*Bt*, LC₂₅, NPs+ LC₂₅)، ترکیب باکتری با نیمارین (*Bt*, LC₂₅, NE+ LC₂₅) و تیمار شاهد (آب مقطر) به همراه یک درصد پخش کننده توپین-۸۰ در سه تکرار که توسط ظروف بستنی یک کیلویی به ابعاد ۴×۸×۱۰ سانتیمتر محصور شده بودند، به وسیله سمپاش دستی پاشیده شد و بعد از خشک شدن سطح برگ در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن دوم با استفاده از قلم مو به آرامی روی برگ‌های درون ظروف قرار گرفت و درب آنها با توری مسدود گردید. تلفات لاروی پس از یک، سه و پنج روز پس از تیمار، شمارش شد.

ارزیابی خسارت

همزمان با ارزیابی مرگ و میر لاروهای سن دوم، تاثیر اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری در درصد خسارت وارده توسط ۳۰ عدد لارو در هر تیمار با اندازه‌گیری سطح برگ قبل و بعد از تیمار بوسیله سطح سنج برگ بعد از یک، سه و پنج روز تعیین و با استفاده از معادله زیر محاسبه و مقایسه میانگین شد (Abdollahzadeh Bavani et al., 2019).

$$\text{درصد خسارت} = \frac{\text{خسارت تیمار} - \text{خسارت شاهد}}{\text{خسارت شاهد}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده های حاصل از تلفات لاروهای سن دوم بعد از اصلاح با فرمول ابوت با روش تجزیه پروبیت آنالیز و مقادیر LC_{25} و LC_{50} محاسبه گردید (Abbott, 1925). اثر تلفیقی باکتری با نانوذرات سیلیکا و نیمارین همچنین ارزیابی خسارت از تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارها به روش HSD-TUKEY در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم افزار (SPSS v. 22) انجام گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel-2016 استفاده گردید.

$$\text{درصد تلفات} = \frac{\text{تلفات تیمار} - \text{تلفات شاهد}}{\text{تلفات شاهد}} \times 100$$

نتایج و بحث

تجزیه پروبیت حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis*، نیمارین (NPs)، نانوسیلیکا (NE) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی سن دوم لاروی برگخوار چغندر قند مطابق جدول ۱ حاصل شد. نتایج نشان داد نیمارین با LC_{50} کمتر در مقایسه با باکتری، و نانو ذرات سیلیکا اثر مطلوبتری روی سن دوم لاروی پروانه برگخوار چغندر قند دارد.

جدول ۱: تجزیه پروبیت، LC_{50} و LC_{25} باکتری *Bacillus thuringiensis*، نیمارین و نانوسیلیکا بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی

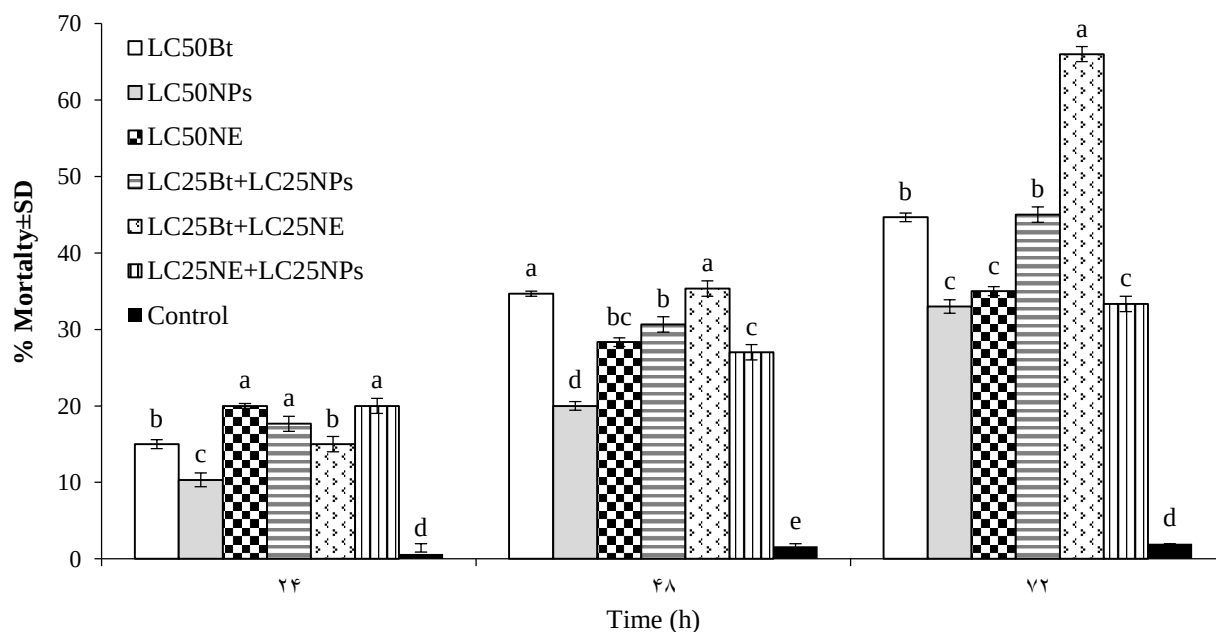
سن دوم لاروی پروانه برگخوار چغندر قند

Treatment	Concentration (mg. L ⁻¹)	Time (h)	X ² (df)	Slope± SE	Intercept	LC_{50} (ppm)	LC_{25} (ppm)
						Fiducial limits	Fiducial limits
Bt	320.00	24	0.924(3)	1.075±0.45	-4.110	2252.39	1569.10
	765.00		)	3		2064.07-2929.42	920.77-2028.68
	1210.00	48	2.437(3)	1.670±0.39	-5.191	1483.31	706.30
	1655.00		)	6		956.44-1901.20	237.46-914.85
	2100.00	72	7.818(3)	2.573±0.42	-7.36	724.78	396.35
	Control		)	0		317.22-1324.57	3.82-707.95
NPs	284.00	24	0.212(3)	1.775±0.29	-5.239	3219.22	1925.11
	673.00		)	0		2555.60-4556.23	1613.12-2255.87
	1062.00	48	2.040(3)	1.388±0.28	-3.701	1852.94	880.32
	1451.00		)	2		1033.98-2079.88	331.41-975.11
	1840.00	72	7.129(3)	1.586±0.28	-3.878	982.64	503.55
	Control		)	4		890.64-1169.55	420.48-950.20
NE	350.00	24	0.594(3)	2.176±0.74	-7.885	1608.15	1087.72
	800.00		)	7		1207.31-3951.89	769.66-1306.42
	1250.00	48	1.082(3)	3.089±0.64	2.067	793.35	514.68
	1700.00		)	2		531.19-1192.80	440.18-945.41
	2150.00	72	3.363(3)	5.273±0.79	-6.024	393.71	212.79
	Control		)	3		241.76-525.04	96.98-321.07

با توجه به نتایج بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیمارین با ۱۶۰۸/۱۵، ۷۹۳/۳۵ و ۳۹۳/۷۱ کمترین شاخص LC_{50} و بیشترین تلفات روی لارو سن دوم برگخوار چغندر قند نشان داد.

اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های تلفات تیمارهای باکتری (LC_{50} , Bt)، نانوسیلیکا (LC_{50} , NPs)، نیمارین (LC_{50} , NE)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (LC_{25} , NPs+ LC_{25} , Bt)، ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25} , NE+ LC_{25} , Bt)، ترکیب نانوسیلیکا با نیمارین (LC_{25} , NE+ LC_{25} , NPs) و تیمار شاهد روی لارو سن دوم برگخوار چغندر قند بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب نشان داد که با اطمینان ۹۵ درصد بین کشندگی تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد [$F(6, 14)=195.02$, $P=0.001$]، در هر سه زمان F محاسبه شده از F جدول در سطح احتمال آماری ۹۵ درصد، بزرگ‌تر بوده و P (احتمال) کوچکتر از ۰/۰۵ است.

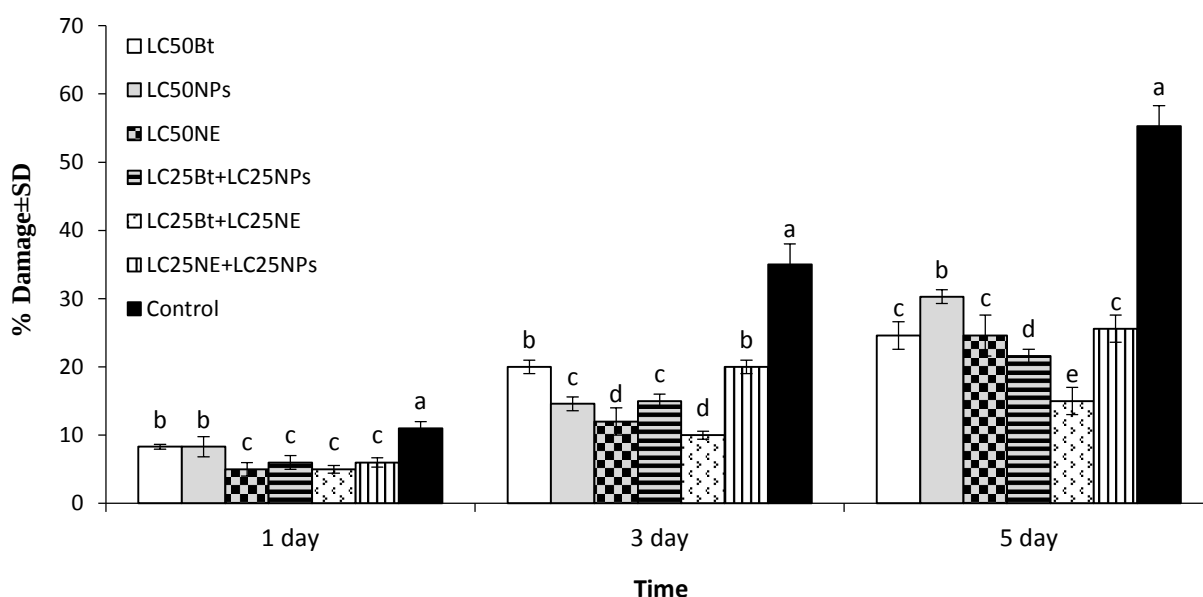


شکل ۱: مقایسه میانگین درصد تلفات ناشی از تیمارها، روی لارو سن دوم برگخوار چغندر قند پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش آزمون توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد در شرایط آزمایشگاهی (حروف مشابه در بالای هر ستون نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است).

در بررسی اثر ترکیبی، بیشترین و کمترین مرگ و میر در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25} , AZ+ LC_{25} , Bt) و تیمار شاهد (آب مقطر) مشاهده شد (شکل ۱).

ارزیابی خسارت

تجزیه واریانس درصد خسارت حاصل از تاثیر تیمارهای باکتری (LC_{50} , Bt)، نانوسیلیکا (LC_{50} , NPs)، نیمارین (LC_{50}), NE)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (LC_{25} , NPs+ LC_{25} , Bt)، ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25} , NE+ LC_{25} , Bt)، ترکیب نانوسیلیکا با نیمارین (LC_{25} , NE+ LC_{25} , NPs) و تیمار شاهد بعد از ۱، ۳ و ۵ روز در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی دار نشان داد [F(6, 14)=22.11; P=0.001, F(6, 14)=273.68; P=0.001 و F(6, 14)=1153.92; P=0.001]. در هر سه زمان F محاسبه شده از F جدول در سطح احتمال آماری ۹۵ درصد، بزرگتر بوده و P (احتمال) کوچکتر از ۰/۰۵ میبود.



شکل ۲: مقایسه میانگین تعداد درصد خسارت لارو سن دوم برگخوار چغندر قند به وسیله تیمارهای مختلف بعد از ۱، ۳ و ۵ روز در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی. ستون‌های با حروف یکسان اختلاف معنی داری با هم ندارند.

با توجه به میانگین تیمارها، بیشترین خسارت در تیمار کنترل و کمترین خسارت در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین

(LC_{25} , NE+ LC_{25} , Bt) مشاهده شد (شکل ۲).

گزارش‌های زیادی در مورد تحقیق و کاربرد باکتری *B. thuringiensis* علیه مراحل لاروی پروانه برگخوار چغندر قند

یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی بویژه چغندر قند وجود دارد (Hernandez-Martinez et al., 2008; Da-yong et al., 2012; Da-yong & Yong-man, 2013). بررسی‌ها نشان داده در شرایط آزمایشگاهی، مقاومت در برابر باکتری Btk در بسیاری

از حشرات نظیر پروانه شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) (McGaughey, 1985)، لارو جوانه‌خوار توتون (*Heliothis*)

(*virescens*) (Gould et al., 1992)، پروانه پشت‌الماسی (*P. xylostella*) (Tabashnik, 1994)، لارو برگخوار چغندر قند (*S. exigua*)

(Moar et al., 1995)، پروانه ساقه خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis*) (Siqueira et al., 2004)، پروانه سرخ ثانویه پنبه (*Pectinophora gossypiella*) (Tabashnik et al., 2004) و لارو پروانه قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* Hübner) (Xu et al., 2005) گزارش گردیده است. در کاربرد مزرعه‌ای نیز گزارش‌هایی از مقاومت آفات به باکتری *Btk* حکایت دارد (McGaughey, 2003; Janmaat & Myers, 1985). استفاده از ترکیبات فیزیکی و گیاهی می‌تواند در تشدید اثر باکتری موثر باشد. اثر هم افزایی محصولات چریش بر *Btk* در بسیاری از تحقیقات اثبات شده است (Togbe et al., 2014; Abedi et al., 2014; Singh et al., 2019; Konecka et al., 2007). درخت چریش حاوی ماده اکدیستروئیدی به نام آزادیراختین بوده که قادر است در فرآیندهای فیزیولوژیک بندپایان اختلال ایجاد نماید. آثار ضد تغذیه‌ای قوی و توانایی ایجاد اختلال در رشد و نمو و تولید مثل حشره توسط این ترکیب ثابت شده است (Murugan, et al., 1998; Ling et al., 2000). باکتری *Btk* در اختلاط با روغن دانه چریش (نیمارین) روی پروانه شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) خاصیت هم افزایی نشان داده است (Nouri-Ganbalani, 2016). بررسی اثر ترکیبی باکتری *B. thuringiensis* و روغن دانه چریش روی بید سیب‌زمینی (*Phthorimaea operculella*) در مزرعه و انبار موثر بوده و ترکیب چریش و باکتری *B. thuringiensis* (دلفین) غده‌ها را در برابر این آفت به طور قابل توجهی محافظت می‌کند (Salama & Salem, 2000). با توجه به نتایج تحقیق حاضر نیز که شاخص LC_{50} نیمارین بیشترین کشندگی را نسبت به باکتری و نانو سلیکا نشان داد، همچنین نیمارین در اختلاط با باکتری (LC_{25} , NE+ LC_{25} , Bt) با ۶۶ درصد تلفات و کاهش خسارت تا ۱۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد (آب مقطر) ۵۵/۳ درصد خسارت، بهترین عملکرد را در کنترل لاروهای سن دوم برگ‌خوار چغندر قند نشان داد. لذا استفاده توأم باکتری و نیمارین می‌تواند یک روش سازگار با محیط زیست و زیست پایه در کنترل آفات هدف مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس بررسی Abedi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تاثیر نیمارین و *Btk* روی لاروهای کرم قوزه پنبه (*H. armigera*) مقدار LC_{50} محاسبه شده نیمارین در مقایسه با *Btk* کمتر بوده و نیمارین حدود ۲ برابر سمی تر از *Btk* نشان داد که نتایج این بررسی نیز مشابه آن است. تاثیر حشره‌کش‌های گیاهی نیمارین، نیمک، نیمک سوپر، نیم‌پلاس، نیم‌آزال روی جمعیت *B. tabaci* بررسی شده و نیمارین بالاترین درصد کاهش جمعیت آفت را ۱۰ روز پس از محلول‌پاشی ایجاد کرده است (Sarailoo & Poorghaz, 2006). اسید تانیک و تاننهای گیاهی دیگر نیز باعث تأخیر در رشد و نمو لاروهای آفت می‌گردند و می‌توانند بعنوان سینرژیست با باکتری *B. thuringiensis* بکار روند، بررسی‌ها نشان داده تلفات حاصله از مخلوط این سینرژیست‌ها و *B. thuringiensis* نسبت به حالت استفاده از *B. thuringiensis* تنها، به مراتب بیشتر است (Khanizad & Safaralizadeh, 2002). همچنین Singh و همکاران در سال ۲۰۰۷ برهم‌کنش مثبت مشابهی را در لاروهای پروانه کرم قوزه پنبه (*H. armigera*) یافتند که در معرض باکتری *Btk* و روغن گیاهی azadirachtin قرار گرفته بودند که این نتایج با داده‌های این تحقیق همسو است. نانو سلیکا بصورت فیزیکی روی کوتیکول آفت تاثیر گذاشته و خواص آبرگریزی

ان را که مانع ورود و نفوذ ترکیبات شیمیایی و آب به داخل بدن می‌گردند تخت تاثیر قرار می‌دهد در نتیجه باعث مرگ می‌شود (Abd El-Wahab et al., 2016). اثر کشندگی Bt-ZnO NPs در روی سوسک چهار نقطه ای (*C. maculatus*) نشان داد که Bt-ZnO NPs باعث کاهش باروری و زاد آوری سوسک چهار نقطه‌ای در آزمایشهای دوز- پاسخ شد. همچنین Bt-ZnO NPs موجب اختلال در رشد مراحل لاروی، شفیرگی پس از تیمار با ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر گردید، این بررسی نشان داد در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر مرگومیر ۱۰۰ درصد با LC_{50} برابر با ۱۰/۷۱ میکروگرم در میلی لیتر حاصل می‌گردد (Malaikozhundan et al., 2017). بررسی ها نشان داده که نانو ذرات سیلیکا با قابلیت مقاومت به اشعه ماوراءبنفش و گرما بعنوان حامل می‌توانند مولکول‌های پروتئینی نظیر دلتا اندوتوکسین باکتری *B. thuringiensis* رو به بافت‌ها و سلول‌های نماتد منتقل نمایند، و موجب مرگ و میر و بازدارندگی از رشد نماتدها گردند (Xu et al., 2016). اثر حشره کش AgNPs سنتز شده با Btk در روی لارو پروانه *Trichoplusia ni* Hübner و لارو طوقه خوار اگروتیس *Agrotis ipsilon* مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج نشان داد که تیمار AgNPs سنتز شده با Btk روی هر دو آفت اثر کشندگی بالایی دارد (Atef et al., 2017). نتیجه مشابه با حشره کش AgNPs سنتز شده با Btk در روی لاروهای پشه کولکس و آنوفل نیز مشاهده گردید (Marimuthu et al., 2013; Banu et al., 2014). در این بررسی بعد از ۷۲ ساعت مخلوط نانوذره سیلیکا با باکتری Btk اختلاف معنی داری با کاربرد تنه‌های باکتری Btk نشان نداد. با عنایت به اثرات سوء سموم کشاورزی بر سلامت انسان، موجودات غیر هدف و الودگی محیط زیست استفاده از پتانسیل باکتری Btk بعنوان عامل زیستی در اختلاط با نیمارین در کنترل این آفت و بررسی های میدانی قابل توصیه است.

نتیجه گیری کلی

باکتری Btk در ترکیب با نیمارین موجب افزایش اثر کشندگی و کاهش خسارت در محصول را نشان داد که به نظر می‌رسد مربوط به نحوه اثر ترکیبات است. باکتری Btk و نیمارین به طریق گوارشی عمل می‌کنند، در حالی که ترکیب نانوسیلیکا به طریق فیزیکی و جلدی اثر می‌کند. در این بررسی با توجه به افزایش کارایی باکتری Btk در تلفیق با روغن گیاهی نیمارین و کاهش مصرف فرموله باکتریایی، کاربرد توأم این دو عامل در راستای مدیریت مقاومت و کنترل پایدار جمعیت لاروهای برگخوار چغندر قند و آفات حساس قابل توصیه است.

سپاسگزاری

به این وسیله از مدیریت و آزمایشگاه‌های دانشگاه شهید باکری میان‌دوآب وابسته به دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مختلف در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abd El-Wahab, A. S. El –Bendary, H. M. and El-Helaly A. A. (2016). Nano silica as a promising nano pesticide to control three different aphid species under semi-field conditions in Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences F Toxicology & Pest Control*, 8 (2): 35- 49.
- Abdollahzadeh Bavani, M. Aramideh, Sh. and Hosseinzadeh A. (2019). Effect of *Bacillus thuringiensis*, SeNPV, Spinosad and Enamectin on third larval instar of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) in laboratory and field conditions. *Plant Pest Research*, 9 (1): 1-12.
- Abedi, Z. Saber, M. Vojoudi, S. Mahdavi, V. and Parsaeyan E. (2014). Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*. 14: 30.
- Ahmad, M. Farid, A. and Saeed, M. (2018). Resistance to new insecticides and their synergism in *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) from Pakistan. *Crop Protection*, 107: 79-86.
- Arumugam, G. Velayutham, V. Shanmugavel, S. and Sundaram, J. (2016). Efficacy of nanostructured silica as a stored pulse protector against the infestation of bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae). *Applied Nanoscience*, 6: 445-450.
- Atef, M. Sayeda, M. Sanghoon, Kimb. and Behleb, W. (2017). Characterization of silver nanoparticles synthesised by *Bacillus thuringiensis* as a nanobiopesticide for insect pest control. *Biocontrol Science and Technology*, 27(24).
- Ayoub, H.A. Khairy, M. Rashwan, F.A. and Abdel-Hafez, H.F. (2017). Synthesis and characterization of silica nanostructures for cotton leaf worm control. *Journal of Nanostructure Chemistry*, 7:91-100.
- Banu, A.N. Balasubramanian, C. and VinayagaMoorthi, P. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Dip.: Culicidae). *Parasitology Research*, 113: 311-316.
- Bilal, M. Xu, C. Cao, L. Zhao, P. Cao, C. Li, F. and Huang, Q. (2020). Indoxacarb-loaded fluorescent mesoporous silica nanoparticles for effective control of *Plutella xylostella* L. with decreased detoxification enzymes activities. *Pest Management Science*, 76:3749-3758.
- Caceres, M. Vassena, C.V. Garcera, M.D. and Santo-Orihuela, P.L. (2019). Silica nanoparticles for insect pest control. *Current Pharmaceutical Design*, 25: 4030-4038.

- Chattopadhyay, P. Banerjee, G. and Mukherjee, S. (2017). Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. 3 Biotech, 7:60.
- Das, S.K. (2014). Scope and relevance of using pesticide mixtures in crop protection: a critical review. IJESTR, 2(5):119-125.
- Da-yong, J. Xueli, Q. Xiangguo, L. and Yongwan, Y. (2012). Effects of Tween 80 on spreading of *Bacillus thuringiensis* on crop leaves and its control efficacy against *Spodoptera exigua* in scallion fields. Plant Protection, 38(5):143-146.
- Da-yong, J. and Yong-man, Y. (2013). Effect on growth and development of *Spodoptera exigua* larvae by *Bacillus thuringiensis* CAB109. Northern Horticulture, 20(6):122-124.
- Debnath, N. Das, S. Brahmachary, R.L. Chandra, R. Sudan, S. and Goswami, A. (2010). Entomotoxicity assay of silica, zinc oxide, titanium dioxide, aluminium oxide nanoparticles on *Lipaphis pseudobrassicae*. AIP Conference Proceedings, 1276: 307-310.
- Debnath, N. Das, S. Seth, D. Chandra, R. Bhattacharya, S.C. and Goswami, A. (2011). Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Pest Science, 84: 99-105.
- Dubois, N. R. Reardon, R. and Kolodny-Hirsch. D. M. (1988). Field efficacy of the NRD-12 strain of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth. Journal of Economic Entomology. 81: 1672-1677.
- El-Naggar, M.E. Abdelsalam, N.R. Fouda, M.M.G. Mackled, M.I. Al-Jaddadi, M.A.M. Ali, H.M. Siddiqui, M.H. and Kandil, E.E. (2020). Soil application of nano silica on maize yield and its insecticidal activity against some stored insects after the post-harvest. Nanomaterials, 10:739.
- El-Samahy, M.F.M. Khafagy, I.F. and El-Ghobary, A.M.A. (2015). Efficiency of silica nanoparticles, two bioinsecticides, peppermint extract and insecticide in controlling cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisd. and their effects on some associated natural enemies in sugar beet fields. Journal of Plant Protection and Pathology, Mansoura University, 6:1221-1230.
- Farahani, S. Talebi, A.A. and Fathipour, Y. (2011). Life cycle and fecundity of *Spodoptera exigua* (Lep.:Noctuidae) on five soybean varieties. Journal of Entomological Society of Iran, 30(2): 1-12.
- Ghassemi-Kahrizesh, A. and Aramideh, Sh. (2014). Study on the synergistic effect of Henna in enhancement of pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner on third and fourth instars larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(12):1497-1507.

- Goswami, A. Roy, I. Sengupta, S. and Debnath, N. (2010). Novel applications of solid and liquid formulations of nanoparticles against insect pests and pathogens. *Thin Solid Films* 519:1252-1257.
- Gould, F. Ramirez, A.M. Anderson, M. Ferre, J. Silva, F.J. and Moar, W.J. (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 80: 7986-7990.
- Hernandez-Martinez, P. Ferre, J. and Escriche B (2008) Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97:245-250
- Janmaat, A.F. and Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looppers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270: 2263-2270.
- Javi, E. Safaralizadeh, M.H. and Poormirza, A.A. (2004). Survey of pathogenic of *Bacillus thuringiensis* Berliner on different instar larvae of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col., Chrysomelidae) and effect of plant synergistic in increasing its efficiency in laboratory conditions. *Sciences and Techniques of Agriculture and Natural Sources*, 4: 187-198. (In Persian).
- Jijkli, M.H. (2010). European market of biological control agents: actual situation and perspectives. Final Report of an EU Project 416Pp.
- Khanizad, A. and Safaralizadeh, M.H. (2002). The evaluating synergist effect of tannic acid in combination with low doses *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Galleria mellonella* larvae, *Proceedings of the Fifteenth Congress of Plant Protection*, Kermanshah, Iran. Pp. 274. (In Persian).
- Kish, K. J. (2004). Saprophagous caterpillars (Lepidoptera: Noctuidae: Herminiinae): Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* application in forest and laboratory settings. Master of Science Thesis. West Virginia University.
- Konecka, E. Kaznowski, A. and Tomkowiak, D. (2019). Insecticidal activity of mixtures of *Bacillus thuringiensis* crystals with plant oils of *Sinapis alba* and *Azadirachta indica*. *Annals of Applied Biology*, 174(3): 364-371.
- Ling, M. A. Gordon, G. and Zalucki, M. (2000). Biological effects of azadirachtin on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. *Australian Journal of Entomology*. 39: 301-304. 23.
- Luna-Espino, JC. Castrejón-Gómez, VR. Pineda, S. Figueroa, JA. and Martínez, AM. (2018). Effect of four multiple nucleopolyhedrovirus isolates on the larval mortality and development of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) determination of virus production and mean time to death. *Florida Entomologist*, 101(2): 153-159.

- Malaikozhundan, B. Vaseeharan, B. Vijayakumara, S. and Thangaraj, M. P. (2017). *Bacillus thuringiensis* coated zinc oxide nanoparticle and its biopesticidal effects on the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology, 174: 306-314.
- Marimuthu, S. Abdul Rahuman, A. Kirthi, A.V. Santhoshkumar, T. Jayaseelan, C. and Rajakumar, G. B. (2013). Eco-friendly microbial route to synthesize cobalt nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against malaria and dengue vectors. Parasitology Research, 112: 4105–4112.
- McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229: 193-195.
- Moar, W.J.M. Pusztai-Carey, H. van Faassen, D. Bosch and Frutos, R. (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lep.: Noctuidae). Applied and Environmental Microbiology, 61: 2086-2092.
- Murugan, K. Jeyabalan, D. Senthil-Kumar, N. Babu, R. Sivaramakrishnan, S. and Senthil-Nathan, S. (1998). Antifeedant and growth-inhibitory properties of neem limonoids against the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner). Insect Science and Its Application, 18: 157-162.
- Namvar, P. Safaralizadeh, M.H. and Pourmirza, A.A. (2003). Studies on the susceptibility of *Spodoptera exigua* (Hubner) larvae to *Bacillus thuringiensis* under greenhouse conditions. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 7: 215-221. (In Persian).
- Nouri-Ganbalani, G. Borzoui, E. Abdolmaleki, A. Abedi, Z. and Kamita, S.G. (2016). Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and Azadirachtin on *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Insect Science, 16(1):95 1–8.
- Palma, L. Delia Muñoz, D. Berry, C. Murillo, J. and Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins, 6(12): 3296-3325.
- Pourmirza, A. A. (2005). Local variation in susceptibility of Colorado potato beetle (Col.: Chrysomelidae) to insecticide. Journal of Economic Entomology, 98: 2176-80.
- Pavitra, G. Sushila, N. Sreenivas, A.G. and Ashok, J. Sharanagouda, H. (2018). Biosynthesis of green silica nanoparticles and its effect on cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover and mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7: 1450–1460.
- Reardon, R, N. Dubois, and McLane. W. (1994). *Bacillus thuringiensis* for managing gypsy moth: A review. U. S. Forest Serv., National Center of Forest Health Management. Morgantown, WV. FHM-NC-01-94. 32 pp.
- Rouhani, M. Samih, M.A. and Kalantari, S. (2012). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). Journal of Entomology Research, 4:297-305.

- Salama, H.S. and Salem, S.A. (2000). *Bacillus thuringiensis* and neem seed oil (*Azadirachta indica*) effects on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* zeller in the field and stores. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz, 33: 73-80.
- Sansinenea, E. (2012). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Dordrecht; Heidelberg; London; New York, NY: Springer.
- Sarailoo, M.H. and Poorghaz, A.H. (2006). The effect of some plant origin materials against *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton field of Gonbad. Journal of Agriculture Science Natural Resources, 13(4): 62-72. (In Persian).
- Schünemann, R. Knaak, N. and Fiuza, L.M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. ISRN Microbiology, 1-12.
- Sharifzadeh, M.S. Abdollahzadeh, G. Damalas, Ch.A. and Rezaei, R. (2018). Farmers' criteria for pesticide selection and use in the pest control process. Agriculture, 8: 24.
- Sheibani, Z.T. (2010). Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on first, second and third ages of white leaf-eating butterfly larvae of Pistachio *Ocneria terebinthina* (Lep.:Lymanteridae). Journal of Research in Agricultural Science, 6 (11): 83- 92.
- Shoaib, A. Elabasy, A. Waqas, M. Lin, L. Cheng, X. Zhang, Q. and Shi, Z. (2018). Entomotoxic effect of silicon dioxide nanoparticles on *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae) under laboratory conditions. Environmental Toxicology and Chemistry, 100: 80-91.
- Singh, G. Rup, P. J. and Koul O. (2007). Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae) larvae. Bulletin of Entomological Research, 97: 351-7.
- Singh, P. and Moore, R. F. (2005). Handbook of Insect Rearing. Elsevier Science Publishers 7: 575- 576.
- Siqueira, H.A.A. Moellenbeck, D. Spencer, T. and Siegfried. B.D. (2004). Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Journal of Economic Entomology, 97: 1049-1057.
- Soundararajan, R.P. (2012). Pesticides- Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech, Rijeka, Croatia.
- Sudo, M. Takahashi, D. Andow, D.A. Suzuki, Y. and Yamanaka, T. (2017). Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal. Evolutionary Applications, (2): 271-283.

- Tabashnik, B.E. Zhang, M. Fabrick, J.A. Wu, Y. and Gao, M. (2015). Dualmode of action of *B.t.* proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Nature*, 5: 15107.
- Tabashnik, B.E. Liu, Y.B. Unnithan, D.C. Carriere, Y. Dennehy, T.J. and Morin, S. (2004). Shared genetic basis of resistance to *B.t.* toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 97: 721-726.
- Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39: 47-79.
- Togbe, C.E. Zannou, E. Gbehounou, G. Kossou, and Huis, A.V. (2014). BBC: Biological based combinations- a concept way forward in sustainable pest management. *International Journal of Tropical Insect Science*, 34: 248-259.
- Wraight, SP. and Ramos, ME. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis- based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(3): 139-150.
- Xu, J. Huigens, ME. Orr, D. and Groot, AT. (2014). Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *Ecological Entomology*, 39: 627-636.
- Xu, Qin. Xuemei, Xiang. Xiaowen, Sun. Hong, Ni. and Lin, Li. (2016). Preparation of nanoscale *Bacillus thuringiensis* chitinases using silica nanoparticles for nematocide delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 13-21.
- Xu, X. Yu, L. and Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 948-954.
- Zhu, F. Lavine, L. O'Neal, S. Lavine, M. Foss, C. and Walsh, D. (2016). Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects*, 7(1): 2.

Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in combination with neemarin and silica nanoparticles in the control of second instar larvae of sugar beet, *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) in laboratory condition

M. Alimohamadian¹, Sh. Aramideh^{2*}, Sh. Mirfakhraie³, M. Frozan⁴

Received: 2021.2.17

Accepted: 2021.6.29

Abstract:

Use of plant and physical compounds with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) is very important in reducing the dose and increasing its effect. Therefore, the efficiency of Btk in mixing with silica nanoparticles and neemarin in controlling second larval instar *Spodoptera exigua* Hb. in vitro was evaluated. The LC₅₀ value obtained from the effect of different concentrations of Btk, silica nanoparticles and neemarin after 72 hours was obtained (724.78, 982.28 and 393.39) mg.L⁻¹, respectively. In the study of the mix effect, the highest and lowest mortality were observed in the treatment of Btk combination with neemarin (66%) and the control treatment (distilled water) (2%). Also, in the damage assessment, the highest and lowest damage was observed in the control (55.3%) and Btk combination neemarin (15%) treatments. Due to the increased efficiency of Btk in combination with neemarin, their combined use in the control of larval instar of *S. exigua* is recommended.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, lethality, Nanomaterial, *Spodoptera exigua*

1 PhD Student of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia-Pardis, Ir

2 Associate professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(*Corresponding Author: Sh.aramideh@Urmia.ac.ir)

3 Assistant Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

4 Plant Protection Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran

اثر پیش تیمار بذر با نانولوله‌های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی

(*Pistacia atlantica* Desf & *P.khinjuk* Stocks)

فهیمة محمدپور^۱، فرهاد قاسمی آقباش^۲، مهرداد زرافشار^{۳*}، احسان قنبری^۴

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر نانولوله‌های کربنی با غلظت‌های مختلف بر صفات مورفولوژیکی، زی توده و غلظت عناصر غذایی در برگ دو گونه پسته وحشی و مقایسه آنها با تیمارهای سرمادهی و اسید سولفوریک ۶۵ درصد در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که کاربرد نانولوله‌های کربنی با غلظت‌های ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به صورت معنی‌داری باعث بهبود خصوصیات مورفولوژیکی و زی توده در دو گونه پسته وحشی شامل بنه و خینجک در مقایسه با سایر تیمارها شده است. بیشترین افزایش در طول ریشه، ارتفاع ساقه و طول یقه در گونه بنه در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در گونه خینجک، بیشترین میزان طول ریشه و وزن خشک و تر ریشه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن ثبت شد. بالاترین غلظت منیزیم برگ در گونه بنه در تیمار ۱۰ و در گونه خینجک در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. غلظت فسفر در برگ دو گونه در تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج این تحقیق اثرات مثبت نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های پایین بر صفات مورفولوژیکی بنه و خینجک را تایید کرد.

واژه‌های کلیدی: پسته وحشی، زی توده تر و خشک، سرما، عناصر غذایی، مورفولوژی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر

۲- استادیار، گروه مهندسی طبیعت، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر

۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، فارس شیراز * نویسنده مسئول: mehrdad.zarashar@areeo.ac.ir

۴- فارغ التحصیل دکتری جنگلداری، کارشناس جنگل و مرتع اداره کل منابع طبیعی و آبخیزداری استان کرمانشاه

مقدمه

جنس *Pistacia* برگرفته از نام فارسی این گونه یعنی پسته است و به‌همین دلیل ایران به‌عنوان خاستگاه درخت پسته شناخته شده است. این جنس دارای ۱۵ گونه بوده که فقط سه گونه آن در ایران می‌روید که شامل گونه‌های *P. vera* L.، *P. khinjuk* stock و *P. atlantica* Desf. است (Bahrani et al., 2010). گونه بنه با نام علمی *P. atlantica* عمدتاً در ایران و افغانستان متمرکز است. گونه خینجوک با نام علمی *P. khinjuk* بیشتر در ارتفاعات بین ۷۰۰ تا ۲۰۰۰ متر و در مناطق کوهستانی ایران، ترکیه، سوریه، عراق و افغانستان پراکنش دارد (Behboodi, 2003). تکثیر گونه‌های پسته وحشی بیشتر به‌صورت دانه‌زاد انجام می‌گیرد. بذور این گونه‌ها دارای پوسته سختی بوده که باعث رکود فیزیولوژیکی آن و در نتیجه کاهش درصد جوانه‌زنی می‌شود (چراغی و همکاران، ۱۳۹۴).

فناوری مواد نانو و کاربرد آنها در جنبه‌های مختلف علوم گیاهی در حال افزایش است. نانوذرات در علوم گیاهی دارای کاربردهای متفاوت از جمله کنترل علف‌های هرز، کنترل آفات و حشرات، کاهش استفاده از کوددهی شیمیایی، افزایش قدرت جوانه‌زنی بذر، افزایش رشد و زی‌توده گیاهان هستند (Khot et al., 2012). علی‌رغم تولید و کاربرد روزافزون نانوذرات، همچنان اطلاعات دقیق و گسترده‌ای در ارتباط با اثرات این مواد بر زیست‌شناسی گیاه وجود ندارد. نانوذرات در تعریف به ذراتی اطلاق می‌شوند که اندازه آنها از ۱ تا ۱۰۰ نانومتر متغیر است (Khodakovskaya et al., 2012). محققین دریافته‌اند که تأثیرات مثبت و منفی نانو ذرات بر رشد و توسعه گیاه بستگی به ترکیب، غلظت، اندازه و خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و همچنین نوع گونه گیاهی دارد و از یک گیاه به گیاه دیگر متفاوت است (Khodakovskaya et al., 2012). در توضیح اثر مواد نانو بر صفات مورفولوژی و فیزیولوژی سیستم‌های گیاهی، اندازه و شکل این ذرات نقش اصلی را دارند (Gruyer et al., 2013). نانوذرات مختلفی تاکنون در زمینه علوم گیاهی استفاده شده است که مهم‌ترین آنها عبارتند از: سیلیکون (SiO_2)، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)، نانوذره نقره (SNPs) و نانولوله‌های کربنی. نانوکربن‌ها دارای ساختمان گرافیتی هستند و براساس کاربرد به دو دسته تک جداره و چند جداره تقسیم می‌شوند. نانومواد کربنی تک جداره در ساختمان خود یک صفحه گرافین پیچیده و ناهمگن دارند که قطر آنها از یک تا چندین نانومتر و طول آنها تا چندین میکرومتر گزارش شده است. نانوکربن‌های چند جداره حاوی بیش از یک صفحه گرافین لوله شده هم‌مرکز هستند. گزارش شده است که فاصله بین لایه‌های گرافین در نانولوله‌های کربن چند جداره به‌علت نیروی دافعه اتمی موجود نمی‌تواند کمتر از ۰/۳۴ نانومتر باشد (Inagaki, 2000; Jackson et al., 2013).

نقش مثبت نانولوله‌های کربنی در افزایش رشد کیفی گیاهان تایید شده است (Lahiani et al., 2015). محققان گزارش کرده‌اند که نانولوله‌های کربنی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی سلول‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Haghighi & da Silva, 2014). یکی از اثرات مهم نانولوله‌های کربنی بهبود ویژگی‌های رشدی گیاهان و تحریک ریشه‌زایی در مراحل اولیه رشد است (Srinivasan & Saraswathi, 2010). نانولوله‌های کربنی رشد اندام‌های ریشه و ساقه گیاه *Cicer arietinum* را در شرایط مختلف نور (تاریکی و روشنایی) را تحریک نمود (Tripathi et al., 2011).

نتایج تحقیقات Jiang و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های پایین می‌توانند جوانه‌زنی و رشد ریشه برنج را افزایش دهند ولی در غلظت‌های بالا اثرات سمی دارند. همچنین نتایج آنها نشان داد که نانولوله‌های کربنی تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر طول ریشه و وزن تر و خشک ریشه در گیاه برنج اثر مثبت داشته ولی در غلظت‌های بالاتر اثرات منفی مشاهده شد. در پژوهش‌های دیگری نیز اثرات منفی غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی بر پیاز و تربچه تایید شده است (Haghighi & da Silva, 2014). نانولوله‌های کربنی خصوصیات و اثرات متفاوتی بر بیولوژی گیاهان دارند. به‌عنوان مثال Tripathi & Sarkar (۲۰۱۵) نشان دادند که نانولوله‌های کربنی می‌توانند نرخ رشد را در همه بخش‌های گیاه *Cicer arietinum* از جمله ریشه و ساقه افزایش دهند. Cañas و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که نانولوله‌های کربنی تک جداره به‌طور قابل‌توجهی مانع رشد طولی ریشه گوجه‌فرنگی و کلم می‌شوند، اما طول ریشه را در پیاز و خیار افزایش می‌دهند. اثرات نانولوله‌های کربنی بسته به گونه گیاهی متفاوت است (محمدپور و همکاران، ۱۳۹۸). در تحقیق ریگی کارواندیری و همکاران (۱۳۹۸) مشخص شد که نانولوله‌های کربنی چند جداره با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر وزن تر و خشک و طول ریشه گیاه به‌لیمو را نسبت به شاهد افزایش داده ولی غلظت‌های بالای آن (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش تعداد ریشه‌ها و کاهش حجم ریشه نسبت به نمونه شاهد شده‌اند.

با وجود کاربرد گسترده مواد نانو روی گونه‌های زراعی، تاثیر آن بر رشد و عملکرد گونه‌های جنگلی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. بنابراین، با توجه به مطالب فوق و اثرات مثبت نانو مواد بر رشد و نمو گیاهان، کاربرد آنها روی بهبود عملکرد درختان نیز قابل انتظار است. از آنجا که جوانه‌زنی گونه‌های مختلف پسته وحشی به سختی صورت گرفته و رشد کندی دارند، ارزیابی اثرات نانومواد روی جوانه‌زنی و رشد آنها ضروری است. این تحقیق با هدف بررسی پیش تیمار بذر دو گونه بنه و خینجوک با نانولوله‌های کربنی و اثرات متعاقب آن بر صفات رویشی، زی‌توده و غلظت عناصر غذایی برگ و مقایسه آن با تیمارهای رایج انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر نانوپرایمینگ بذور بر صفات مورفولوژیکی، زی‌توده و عناصر غذایی برگ دو گونه بنه و خینجوک (*Pistacia atlantica Desf & P. khinjuk Stocks*)، از نانولوله‌های کربنی چند جداره استفاده شد (جدول ۱). برای تهیه محلول نانو کربن با غلظت‌های موردنظر، ابتدا نانوذرات کربن بر مبنای حجم محلول موردنظر توزین شده و سپس آب مقطر به آن اضافه شد تا به حجم موردنظر برسد و در ادامه محلول تهیه شده در داخل دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت. سپس بذرها در داخل محلول مورد نظر غوطه‌ور و به‌مدت چهار ساعت روی دستگاه شیکر قرار داده شدند. غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و مدت زمان پرایمینگ چهار ساعت انتخاب شد. این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ملایر با شرایط دمایی 10 ± 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 10 ± 35 درصد انجام شد. بذور پرایم شده در ۱۰ تکرار برای هر تیمار درون گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد 15×25 سانتی‌متر حاوی خاک و ماسه به نسبت ۱ به ۱ کشت شد. خصوصیات فیزیکی خاک مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ نشان داده شده است. بذرها در تیمار سرما به‌مدت ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در داخل ماسه مرطوب قرار گرفت و بعد به گلدان منتقل شدند. در تیمار اسید، بذرها در داخل بشر ریخته شده و ۱۰۰ سی‌سی اسید سولفوریک ۶۵ درصد به آن اضافه شد و هر دو دقیقه یک بار با میله شیشه‌ای هم زده شدند. بذرها بعد از یک ساعت با آب جاری شسته شدند و در داخل گلدان قرار گرفتند. به‌صورت هم‌زمان با این دو تیمار، تیمار نانولوله‌های کربنی نیز به گلدان انتقال داده شده و آبیاری هر ۲۴ ساعت یک بار صورت گرفت. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و ۱۰ تکرار انجام شد.

جدول ۱: مشخصات نانولوله‌های چند جداره مورد استفاده در این تحقیق

نانو ساختار	قطر	طول (میکرومتر)	خلوص (%)	خاکستر	SSA	چگالی (گرم در متر مکعب)
MWCNTs	۱۰-۲۰	~۳۰	>۹۵	<۱/۵	۲۰۰	۲/۱

جدول ۲: خصوصیات فیزیکی خاک گلدان‌ها در تیمارهای مختلف

وزن مخصوص (g/cm^3)	pH	بافت خاک	هدایت الکتریکی (ms)
۰/۸	۸/۸	شنی	۱/۶۰۳

جهت بررسی اثرات نانوپرایمینگ بذر بر صفات مورفولوژیک نونهال‌ها، بعد از گذشت چهار ماه از کاشت، برخی از پارامتر-های رشد (مورفولوژی) و همچنین زی‌توده در تعدادی از نونهال‌های (۱۰ تکرار از هر تیمار) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری پارامترهای مورفولوژیک نونهال‌های رشد یافته از بذرهای نانوپرایم شده و شاهد در گلخانه مشخصات مورفولوژیک: شامل تعداد برگ، طول ساقه، طول ریشه و طول یقه با استفاده از خط‌کش برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. زی‌توده تر ریشه، ساقه و برگ بلافاصله پس از جدا نمودن اندام‌های گیاه از یکدیگر در سه تکرار برای هر تیمار اندازه‌گیری شد و زی‌توده خشک پس از قرار دادن آنها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری عناصر سدیم و پتاسیم برگ دو گونه مورد بررسی با استفاده از عصاره برگ و با دستگاه فلیم فتومتر (۶۲۰ C) سنجش شد. کربن برگ با استفاده از روش احتراق خشک اندازه‌گیری شد که در آن ابتدا یک گرم از هر تیمار توزین و پس از قرارگیری و در داخل کوره مجدداً مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. منیزیم برگ با دستگاه جذب اتمی (ContrAA 700)، فسفر با دستگاه اسپکتوفوتومتر و کلسیم برگ نیز به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شدند.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف و همگن بودن داده‌ها با آزمون لون بررسی شد. با رعایت نرمال و همگن بودن داده‌ها، مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

تأثیر تیمارهای نانولوله‌های و تیمارهای رایج بر صفات مورفولوژیک گونه خینجوک

براساس نتایج تحقیق، در هر یک از تیمارهای نانولوله‌های کربنی بیشترین مقادیر صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده شامل: تعداد برگ، طول ریشه، ارتفاع ساقه، طول یقه، زی‌توده تر و خشک برگ، زی‌توده تر و خشک ریشه، زی‌توده تر و خشک ساقه، در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر و پس از آن تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی و سرمادهی مشاهده شد. کمترین مقادیر صفات مورد مطالعه در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی، شاهد و اسید ۶۵ درصد مشاهده شد. درخصوص صفات مورفولوژی گونه خینجوک نتایج نشان داد که بیشترین میزان ارتفاع ساقه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن و کمترین میزان ارتفاع ساقه در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن مشاهده شد. سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند. همچنین بیشترین میزان طول ریشه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن و تیمار سرمادهی و کمترین مقدار در تیمار ۵۰ میلی‌گرم مشاهده شد. تیمار سرمادهی و تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر

نانوکربن بیشترین تعداد برگ را داشتند. سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند. بیشترین مقدار طول یقه در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن و کمترین مقدار در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن مشاهده شد. براساس نتایج، میزان زی‌توده تر و خشک ریشه ساقه و برگ، بیشترین مقدار وزن تر و خشک ریشه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن مشاهده شد. همچنین در خصوص میزان زی‌توده تر و خشک در ساقه گونه خینجوک، وزن تر و خشک ساقه در تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر و سرمادهی بیشتر از سایر تیمارها و کمترین مقدار وزن تر و خشک ساقه در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن مشاهده شد. نتایج مربوط به میزان زی‌توده تر و خشک در برگ گونه خینجوک نیز نشان داد که وزن تر و خشک برگ در تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین و در تیمار شاهد کمترین مقدار است (جدول ۲).

جدول ۳: تاثیر تیمارهای نانولوله کربنی و تیمارهای رایج بر صفات مورفولوژیک و زی‌توده گونه خینجوک بعد از چهار ماه

صفات	تیمارها						
	غلظت‌های نانولوله‌های کربن (میلی‌گرم در لیتر)						
	تیمارهای رایج						
	شاهد	تیمار سرما	اسید	۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵
طول ساقه (سانتی‌متر)	۴/۸۴±۰/۶ ^{bc}	۶/۱۵±۰/۸ ^b	۴/۳۰±۰/۱ ^{bc}	۵/۸۵±۰/۷ ^b	۸/۸۰±۰/۷ ^a	۲/۶۵±۰/۷ ^c	۳/۹۶±۰/۴۴ ^{bc}
طول ریشه (سانتی‌متر)	۱۷/۸±۰/۶ ^{cd}	۲۶/۹±۰/۸ ^{ab}	۲۰/۱±۰/۵ ^{bcd}	۱۵/۶±۰/۰ ^{cd}	۲۹/۸±۰/۲ ^a	۱۳/۷±۰/۲ ^d	۲۳/۰±۰/۷ ^{abc}
طول یقه (سانتی‌متر)	۱/۲±۰/۱ ^{abc}	۱/۳۵±۰/۱ ^{ab}	۱/۰۳±۰/۲ ^{bcd}	۰/۸۶±۰/۱ ^{cd}	۱/۱۹±۰/۱ ^{abc}	۰/۶۵±۰/۱ ^{cd}	۱/۵۶±۰/۱ ^a
تعداد برگ	۴/۹±۰/۴۵ ^{abc}	۶/۸۰±۰/۹ ^a	۲/۲±۰/۷ ^d	۴/۷۰±۰/۳ ^{bc}	۵/۷±۰/۴ ^{ab}	۳/۴±۰/۶ ^{cd}	۵/۴±۰/۷ ^{abc}
وزن تر ریشه (گرم)	۱/۱۷±۰/۱ ^{۲c}	۲/۳۲±۰/۰ ^{۵b}	۱/۹۶±۰/۰ ^{۹bc}	۱/۷۸±۰/۱ ^{۱bc}	۳/۹۰±۰/۱ ^{۸a}	۰/۸۱±۰/۰ ^{۶c}	۲/۱۵±۰/۰ ^{۵bc}
وزن خشک ریشه (گرم)	۰/۹۶±۰/۰ ^{۰cd}	۱/۸۱±۰/۰ ^{۹b}	۱/۰۶±۰/۰ ^{۲bc}	۰/۹۷±۰/۰ ^{۲bc}	۲/۳۸±۰/۰ ^{۲a}	۰/۵۲±۰/۰ ^{۲c}	۱/۲۶±۰/۰ ^{۶bc}
وزن تر ساقه (گرم)	۱/۱۳±۰/۰ ^{۷bcd}	۴/۰۹±۰/۳ ^{۲a}	۱/۴۷±۰/۰ ^{۵bcd}	۱/۴۸±۰/۱ ^{۱bcd}	۳/۱۳±۰/۰ ^{۴b}	۰/۶۴±۰/۰ ^{۹bcd}	۱/۶۰±۰/۱ ^{۱bc}
وزن خشک ساقه (گرم)	۰/۵۶±۰/۰ ^{۰۲b}	۱/۱۸±۰/۱ ^{۶ab}	۰/۸۰±۰/۰ ^{۷b}	۰/۸۲±۰/۰ ^{۲b}	۱/۸۲±۰/۰ ^{۲a}	۰/۳۸±۰/۰ ^{۰۲b}	۰/۹۳±۰/۰ ^{۰b}
وزن تر برگ (گرم)	۰/۶۰±۰/۰ ^{۰۳c}	۱/۶۷±۰/۳ ^{۲ab}	۰/۹۸±۰/۰ ^{۰۳bc}	۱/۱۹±۰/۱ ^{۲bc}	۲/۴۴±۰/۰ ^{۷a}	۰/۶۹±۰/۰ ^{۰۸c}	۱/۶۵±۰/۰ ^{۰۸ab}
وزن خشک برگ (گرم)	۰/۴۱±۰/۰ ^{۰c}	۰/۸۵±۰/۰ ^{۰۹abc}	۰/۵۳±۰/۰ ^{۰۲bc}	۰/۸۱±۰/۰ ^{۰۲abc}	۱/۲۸±۰/۰ ^{۰۲a}	۰/۳۴±۰/۰ ^{۰۲c}	۰/۸۷±۰/۰ ^{۰۶abc}

اعداد درون جدول به ترتیب نشان‌دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد در ۱۰ تکرار هستند. حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد

است.

تاثیر تیمارهای نانولوله‌های و تیمارهای رایج بر صفات مورفولوژیک گونه بنه

براساس نتایج تحقیق مشخص شد که در هر یک از تیمارهای نانولوله‌های کربنی بیشترین مقادیر صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در گونه بنه شامل: تعداد برگ، طول ریشه، ارتفاع ساقه، طول یقه، زی‌توده تر و خشک برگ، زی‌توده تر و خشک ریشه، زی‌توده تر و خشک ساقه، در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی (به جز میانگین تعداد برگ و وزن مرطوب ساقه) مشاهده شد. کمترین مقادیر این صفات در تیمار شاهد و اسید ۶۵ درصد مشاهده شد. براساس نتایج، بیشترین میزان طول ریشه در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین آن در تیمار اسید ۶۵

درصد مشاهده شد. در تیمارهای شاهد و سرمادهی نیز مقدار رشد ریشه کمتر از تیمارهای نانوکربن بود. بیشترین میزان ارتفاع ساقه در تیمار ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن و کمترین مقدار آن در تیمار اسید سولفوریک مشاهده شد. تیمارهای ۱۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند. طول ساقه در تیمارهای شاهد و سرمادهی کمتر از تیمارهای نانولوله‌های کربنی بود. بیشترین میزان طول یقه در تیمارهای ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن و کمترین مقدار طول یقه در تیمار اسید مشاهده شد. کمترین میانگین تعداد برگ در تیمار اسید و بیشترین مقدار در تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن و تیمار شاهد مشاهده شد تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانو کربن اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند. همچنین براساس نتایج صفات زی‌توده (وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ) در گونه‌ی بنه، بیشترین وزن تر و خشک ریشه در تیمارهای ۲۵ و ۷۵ و کمترین مقدار در تیمار اسید و شاهد مشاهده شد. یافته‌های تحقیق در خصوص بررسی صفات زی‌توده (وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ) در گونه بنه نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک ساقه در تیمار ۷۵ میلی گرم در لیتر نانوکربن و کمترین مقدار در تیمار اسید ۶۵ درصد و شاهد مشاهده شده است. همچنین نتایج بررسی صفات زی‌توده (وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ) در گونه بنه نشان داد که بیشترین مقدار زی‌توده برگ در تیمار ۲۵ میلی گرم در لیتر و کمترین میزان زی‌توده برگ در تیمار اسید ۶۵ درصد و شاهد مشاهده شده است (جدول ۳).

جدول ۴: تاثیر تیمارهای نانولوله کربنی و تیمارهای رایج بر صفات مورفولوژیک و زی توده گونه بنه بعد از چهار ماه

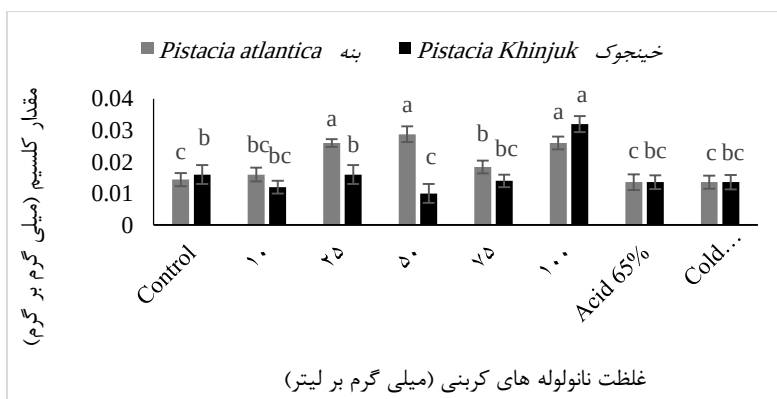
صفات	تیمارها						
	غلظت‌های نانولوله‌های کربن (میلی گرم در لیتر)						تیمارهای رایج
	۱۰	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	اسید	تیمار سرما شاهد
طول ساقه (سانتی متر)	۶/۳۱±۰/۴ ^{abc}	۷/۳۵±۰/۴ ^{۲a}	۷/۱۰±۰/۴ ^{۵ab}	۵/۳۹±۰/۴ ^{۴c}	۵/۸۱±۰/۳ ^{۱bc}	۰/۹۵±۰/۵ ^e	۲/۸۵±۰/۶ ^{۹d}
طول ریشه (سانتی متر)	۳۱/۸±۳/۸ ^b	۴۴/۹±۶/۰ ^a	۳۲/۷±۵/۳ ^b	۲۵/۸±۳/۲ ^{bc}	۲۲/۷±۳/۹ ^{bc}	۴/۰±۲/۳ ^d	۱۵/۶±۳/۹ ^c
طول یقه (سانتی متر)	۱/۰۲±۰/۱ ^{۳abc}	۱/۳۸±۰/۱ ^{۳a}	۰/۶۹±۰/۰۹ ^{cd}	۰/۹۴±۰/۰۸ ^{bcd}	۱/۲۶±۰/۱ ^{ab}	۰/۲۴±۰/۱ ^{۲e}	۰/۶۱±۰/۱ ^{۲d}
تعداد برگ	۴/۷±۰/۳ ^{۷a}	۵/۴±۰/۷ ^{۶ab}	۴/۳±۰/۴ ^{۷ab}	۳/۹±۰/۵ ^{۲ab}	۳/۳±۰/۶ ^{۶ab}	۰/۷±۰/۳ ^{۷c}	۲/۷±۰/۶ ^{۸b}
وزن تر ریشه (گرم)	۴/۹±۰/۰۲ ^{ab}	۵/۹۴±۰/۰۴ ^a	۴/۳۶±۰/۱ ^{۷bc}	۶/۳۵±۰/۰۴ ^a	۲/۹۶±۰/۰۴ ^{cd}	۱/۹۶±۰/۰۸ ^d	۲/۳۲±۰/۰۵ ^d
وزن خشک ریشه (گرم)	۲/۹۶±۰/۰۷ ^{ab}	۳/۶۳±۰/۲ ^{۱a}	۲/۵۷±۰/۰۴ ^{bc}	۳/۸۱±۰/۱ ^{۷a}	۱/۱۷±۰/۰۳ ^{cd}	۱/۰۶±۰/۰۴ ^d	۱/۸۱±۰/۰۴ ^{cd}
وزن تر ساقه (گرم)	۲/۹۰±۰/۰۶ ^{abc}	۳/۰۳±۰/۲ ^{۱abc}	۲/۹۳±۰/۰۹ ^{abc}	۳/۲۱±۰/۲ ^{۱ab}	۱/۸۵±۰/۰۵ ^{bcd}	۱/۴۷±۰/۰۹ ^{cd}	۴/۰۹±۰/۳ ^{۱a}
وزن خشک ساقه (گرم)	۱/۷۶±۰/۰۶ ^{ab}	۱/۹۲±۰/۰۴ ^{ab}	۱/۷۷±۰/۰۸ ^{ab}	۲/۰۲±۰/۱ ^{۱a}	۱/۰۶±۰/۰۳ ^{cd}	۰/۸۰±۰/۰۸ ^d	۱/۱۸±۰/۱ ^{۶abc}
وزن تر برگ (گرم)	۲/۳۳±۰/۰۴ ^{ab}	۲/۹۵±۰/۰۵ ^b	۲/۲۸±۰/۱ ^{۳ab}	۲/۳۶±۰/۱ ^{۲ab}	۱/۵۳±۰/۰۵ ^{bc}	۰/۹۸±۰/۰۷ ^c	۱/۶۷±۰/۱ ^{۷bc}
وزن خشک برگ (گرم)	۱/۲۲±۰/۰۳ ^{ab}	۱/۵۸±۰/۰۱ ^a	۱/۱۲±۰/۰۴ ^{bc}	۱/۲۴±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۷۱±۰/۰۳ ^{cd}	۰/۵۳±۰/۰۴ ^d	۰/۸۵±۰/۰۹ ^{bcd}

اعداد درون جدول به ترتیب نشان‌دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد در ۱۰ تکرار هستند. حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد است

تاثیر نانولوله‌های کربنی بر جذب عناصر غذایی برگ دو گونه بنه و خینجوک

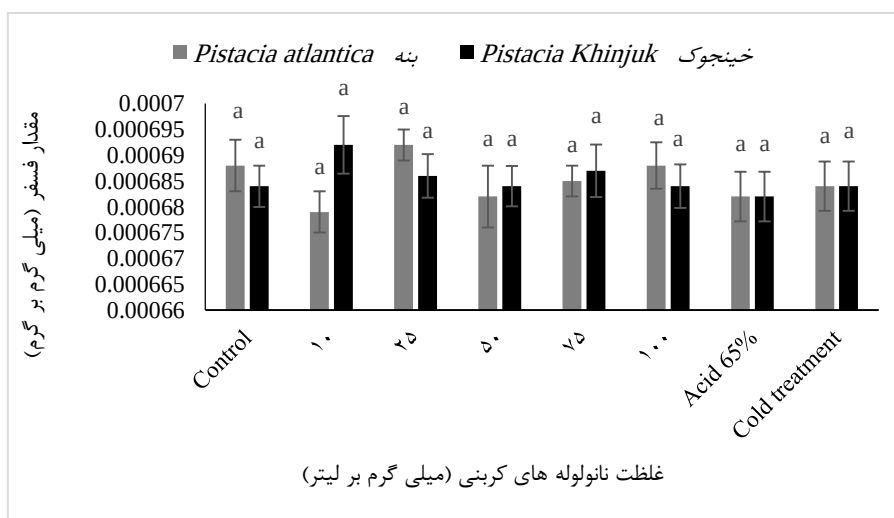
مطابق با نتایج تحقیق مشخص شد که در گونه بنه تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر دارای بیشترین مقادیر عنصر کلسیم و تیمارهای شاهد، اسید ۶۵ درصد و سرمادهی کمترین مقادیر بودند. در گونه خینجوک نیز تیمار

۱۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان عنصر کلسیم و تیمار ۵۰ میلی گرم در لیتر دارای کمترین میزان کلسیم را داراست. (شکل ۱).



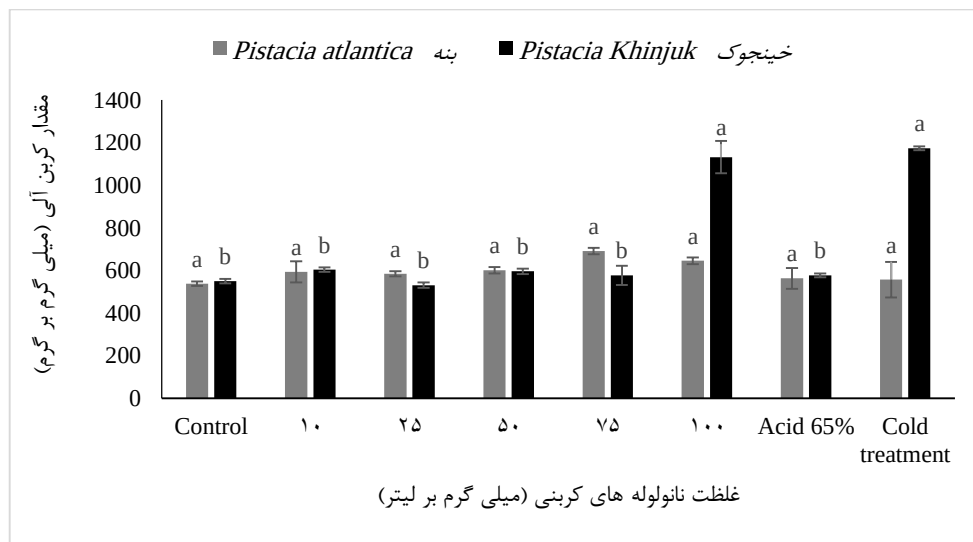
شکل ۱: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت کلسیم برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

براساس نتایج مشخص شد که میزان فسفر برگ در گونه بنه بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار آماری نداشته است. این وضعیت در گونه خینجوک نیز مشاهده شد (شکل ۲).



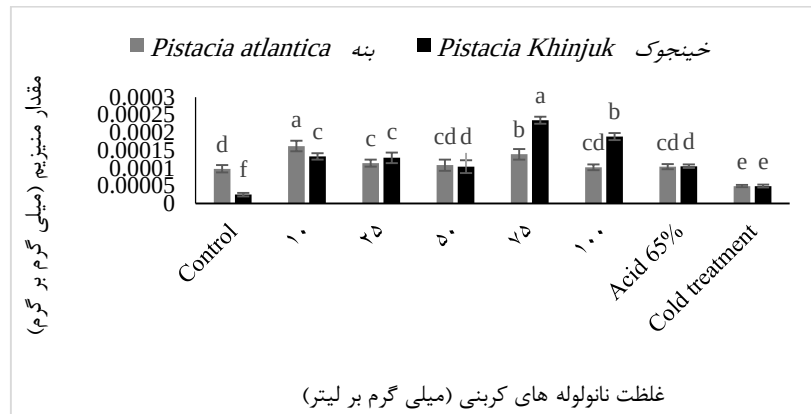
شکل ۲: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت فسفر برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

براساس نتایج مشخص شد که میزان کربن در برگ گونه بنه، بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار آماری نداشته است. در گونه خینجوک نیز تیمارهای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربن و تیمار سرمادهی بیشترین میزان کربن را داشتند و سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند (شکل ۳).



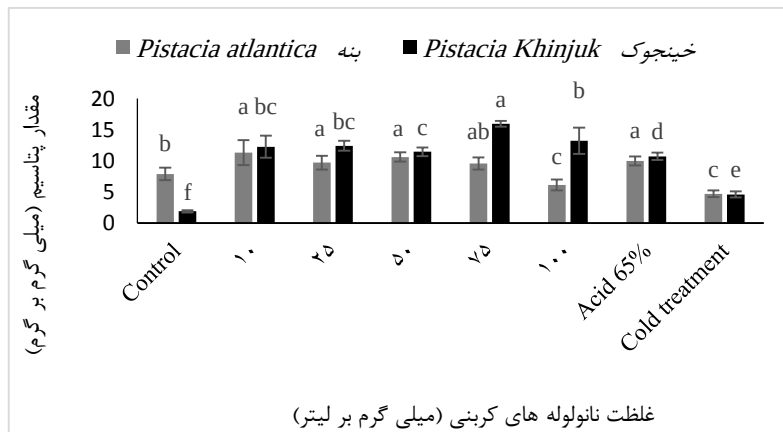
شکل ۳: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت کربن آلی برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

طبق نتایج، غلظت منیزیم برگ گونه بنه در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین میزان و در تیمار سرمادهی نیز کمترین مقدار را داشته است در سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد. در گونه خینجوک بیشترین میزان منیزیم در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و کمترین مقدار در تیمار شاهد و سرمادهی مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت منیزیم برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

براساس نتایج تحقیق مشخص شد که مقدار پتاسیم برگ گونه بنه در تیمارهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم بر لیتر دارای بیشترین مقدار بوده ولی در تیمارهای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن و سرمادهی کمترین مقادیر را داشتند. در گونه خینجوک نیز تیمار ۷۵ میلی گرم در لیتر دارای بیشترین مقدار پتاسیم و تیمار شاهد نیز کمترین مقدار پتاسیم را داشته است (شکل ۵).

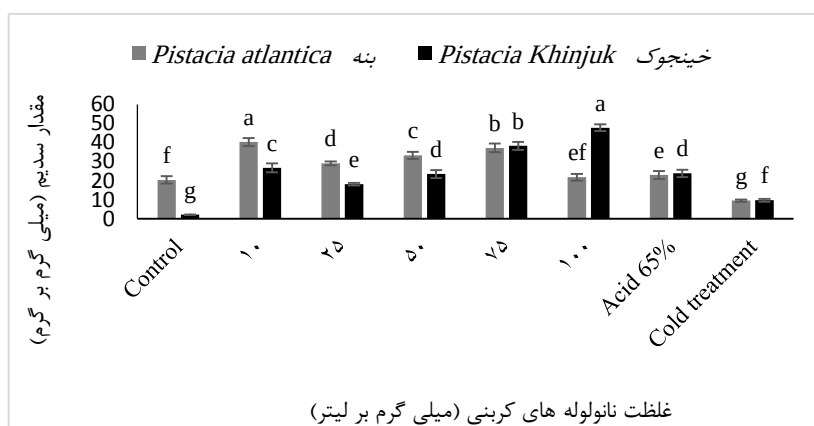


شکل ۵: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت پتاسیم برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

نتایج مربوط به بررسی تاثیر نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت سدیم نشان داد که در گونه بنه در تیمارهای ۱۰ میلی گرم نانولوله‌های کربنی بیشترین میزان مشاهده شد در مقابل در تیمار سرمادهی کمترین مقدار سدیم مشاهده شده

۱۷۴ / اثر پیش تیمار بذر با نانولوله‌های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی...

است. درخصوص گونه خینجوک نیز تیمارهای ۱۰۰ و شاهد به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۶).



شکل ۶: تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی و تیمارهای رایج بر غلظت سدیم برگ دو گونه بنه و خینجوک بعد از چهارماه در ۱۰ تکرار برای هر تیمار. اعداد نشان دهنده مقدار میانگین خطای معیار و حروف بالای هر ستون نشان دهنده میزان معنی‌داری در $\alpha=0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث

با توجه به نتایج پژوهش حاضر نانولوله‌های کربنی با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در گونه بنه و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر در گونه خینجوک طول ریشه، طول ساقه، وزن تر و خشک ریشه را افزایش دادند. بنابراین نانولوله‌های کربنی قادرند که ویژگی‌های رویشی ریشه و ساقه را تغییر بدهند که این یافته تحقیق با نتایج Khodakovskaya و همکاران (۲۰۰۹) و Lin & Xing (۲۰۰۷) مطابقت دارد. با این حال پاسخ گیاهان به نانولوله‌های کربنی متفاوت است. برای مثال Begum و همکاران (۲۰۱۴) اثر نانولوله‌های کربنی بر گیاهان اسفناج قرمز، کاهو، برنج، خیار، فلفل قرمز، بامیه و سویا را بررسی کردند و مشاهده کردند که در غلظت‌های بالا (۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) وزن تر ساقه، طول ریشه و ارتفاع ساقه نسبت به شاهد کاهش یافته است. در این تحقیق رشد ریشه تحت تاثیر نانولوله‌های کربنی قرار گرفته و به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمارهای اسید و سرما و همچنین شاهد بود. افزایش طول ریشه‌ها در تیمارهای نانولوله‌های کربنی در دو گونه پسته وحشی می‌تواند به دلیل تلاش این گونه‌ها به منظور جذب بیشتر آب باشد. نانولوله‌های کربنی باعث ایجاد رخنه در دیواره سلولی شده و مسیر ورود مواد غذایی به سلول‌های ریشه را تسهیل کرده و باعث طول‌تر شدن ریشه‌ها می‌شوند (Lin & Xing, 2007). نانوذرات باعث افزایش جذب عناصر غذایی، تشدید ساخت کلروفیل و تحریک سرعت فتوسنتز و در نتیجه افزایش وزن خشک در گیاهان می‌شود (بهداد، ۱۳۸۹). این امر باعث افزایش وزن

خشک گیاه می‌شود که در تحقیق حاضر این مساله در تیمارهای نانولوله‌های کربنی با غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر در گونه خینجوک مشاهده شد.

با توجه به نتایج این پژوهش در گونه بنه نانولوله‌های کربنی با غلظت ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر طول ریشه، طول ساقه، وزن تر و خشک ریشه را افزایش داد. این یافته‌ها با نتایج Khodakovskaya و همکاران (۲۰۰۹) و Lin & Xing (۲۰۰۷) همسو است. در گونه بنه غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربنی کمترین تاثیر را در بین تیمارهای نانوکربن بر صفات مورفولوژیک نونهال‌های بنه داشت این امر احتمالا به دلیل سمیت غلظت‌های بالای نانوکربن‌ها در سلول‌های ریشه باشد. Wang و همکاران (۲۰۱۲) اثر نانولوله‌های کربنی چند جداره ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را بر جوانه‌زنی و فیزیولوژی گیاه *Triticum aestivum* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که پس از هفت روز از قرار گرفتن بذور در محیط کشت نانولوله، رشد ریشه سریع‌تر و زی‌توده افزایش یافته بود اما جوانه‌زنی و طول ساقه با بذور شاهد تفاوتی نداشته بود. در تیمار نانولوله‌های کربنی مورد استفاده در پژوهش حاضر رشد ریشه به‌طور معنی‌داری بیش از تیمارهای رایج اسید و سرما و شاهد بود. افزایش رشد در سایر صفات رویشی گیاهچه‌ها در دو گونه پسته وحشی مشاهده شد. نکته قابل توجه افزایش طول ریشه در مقایسه با طول ساقه در بذرهایی بود که با غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر در گونه خینجوک و ۷۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در گونه بنه پرایم شده بودند. مانند گونه خینجوک، در گونه بنه نیز افزایش طول ریشه‌ها تحت تاثیر تیمارهای نانولوله‌های کربنی مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که نانولوله‌های کربنی سبب ارتقاء رشد ریشه شده و این امر می‌تواند به افزایش جذب رطوبت و دسترسی به منابع آب برای نهال‌ها منجر شود. (Lin & Xing, 2007). براساس نتایج تحقیق مشخص شد که تاثیر تیمار نانولوله‌های کربنی بر طول ساقه به اندازه طول ریشه قابل توجه نبود. همچنین مقایسه میزان رشد و زی‌توده گیاهچه‌ها نشان داد که همه تیمارهای نانولوله‌های کربنی موجب افزایش زی‌توده تر و خشک گیاهچه دو گونه بنه و خینجوک در مقایسه با تیمارهای اسید، سرما و شاهد شده بود. اما زی‌توده ریشه گیاهچه‌ها دارای تغییرات بیشتری نسبت به سایر تیمارها بود، به‌طوری که برخی تیمارها سبب افزایش تا چند برابری در زی‌توده ریشه در مقایسه با شاهد و اسید شده بود. به‌نظر می‌رسد یکی از اثرات تیمارهای نانولوله‌های کربنی افزایش طول ریشه به‌منظور جذب رطوبت بیشتر باشد. این موضوع در دو گونه پسته وحشی مورد بررسی مشاهده شد. پیش از این نیز اثرات نانولوله کربن بر جذب رطوبت بیشتر گزارش شده بود (Khodakovskaya et al., 2009; Ghodake et al., 2010). در گونه بنه تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی طول ساقه، طول ریشه و طول یقه را بیش از سایر تیمارها افزایش داده بود و در نتیجه وزن خشک ریشه و برگ نیز افزایش یافته بود که این مساله به دلیل تحریک فتوسنتز و افزایش ساخت کلروفیل (Thakkar et al., 2009) در این غلظت نانولوله‌های کربنی بود.

۱۷۶ / اثر پیش تیمار بذر با نانولوله‌های کربنی بر عملکرد رشد دو گونه پسته وحشی...

از اثرات مثبت نانوذرات بر گیاه می‌توان به تجمع عناصر غذایی بر سطح خود بیان کرد. نانوذراتی که سطح ویژه زیادی دارند پتانسیل زیادی برای نگهداری و حفظ عناصر غذایی برای استفاده گیاه دارند (Mazahernia, 2009). تیمارهای ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله‌های کربنی میزان غلظت عناصر غذایی پرمصرف (فسفر، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، سدیم و کربن آلی) را به میزان قابل توجهی در دو گونه پسته وحشی در این تحقیق افزایش داده بودند.

نتیجه‌گیری

در نگاه کلی تمامی تیمارهای نانولوله‌های کربنی اعمال شده توانسته بودند زی‌توده گیاهچه‌ها را در مقایسه با شاهد افزایش بدهند که به‌عنوان یک اثر مثبت و قابل ملاحظه از این تیمارها بیان می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که در رابطه با دو گونه پسته وحشی غلظت‌های (۱۰ و ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) صفات جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ها و زی‌توده تر و خشک و همچنین میزان جذب عناصر در برگ را به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر قرار داده‌اند بنابراین غلظت‌های بیشتر نانولوله‌های کربنی با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات دیگر هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ اثرگذاری پیشنهاد نمی‌گردد.

منابع

بهداد، ا. (۱۳۸۹). بررسی تأثیر آللوپاتی درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica* Podl.) در مراحل مختلف رشد و نمو بر جوانه‌زنی، رشد و برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهچه بروموس کپه داغی (*Bromus kopetdaghensis* Drobov). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چراغی، م.، عرفانی مقدم، ج.، مهربانی، ع.ا. (۱۳۹۴). واکنش‌های حیاتی بذر بنه (*Pistacia atlantica*) به پیش تیمار بذر،

خراش دهی و تیمارهای شیمیایی. بومشناسی جنگل‌های ایران ۳(۶): ۳۶-۴۵.

ریگی کاروانداری، ذ.، سحرخیز، م. ج.، رئوف فرد، ف.، زرافشار، م. (۱۳۹۸). اثر نانولوله‌های کربنی چندجداره بر تحریک ریشه‌زایی

قلمه‌های به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.). نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی ۱۴(۵۴): ۲۱-۳۱.

محمدپور، ف.، زرافشار، م.، قاسمی آقباش، ف. (۱۳۹۸). تأثیر تیمار نانولوله‌های کربنی بر جوانه‌زنی بنه (*Pistacia atlantica*

Desf.) و خینجوک (*Pistacia khinjuk* Stocks) و مقایسه آن با تیمارهای رایج. نشریه علمی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران

۲۷(۴): ۴۶۴-۴۷۴.

Bahrani, M., Yeganeh, M. and Heidari, B. (2010). Distribution of *Pistacia mutica* F & M as influenced by topographical factors and soil properties in mountain areas of western Iran, Journal of Ecology and Environmental Sciences, 36: 37-43.

- Begum, P., Ikhtari, R., & Fugetsu, B. (2014). Potential impact of multi-walled carbon nanotubes exposure to the seedling stage of selected plant species. *Nanomaterials*, 4(2), 203-221.
- Behboodi, B. (2003). Ecological distribution study of wild pistachios for selection of rootstock. *Options Mediterraneennes Series A*, 63: 61-67.
- Cañas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M. and Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9): 1922-1931.
- Ghodake, G., Seo, Y.D., Park, D. and Lee, D.S. (2010). Phytotoxicity of Carbon Nanotubes Assessed by *Brassica Juncea* and *Phaseolus Mungo*. *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics*, 5(2): 157-160.
- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N. and Triffault-Bouchet, G. (2013). Interaction between silver nanoparticles and plant growth. In: International symposium on new technologies for environment control, energy-saving and crop production in greenhouse and plant factory-greensys, Jeju, Korea, 6-11.
- Haghighi, M. and da Silva, J. A.T. (2014). The effect of carbon nanotubes on the seed germination and seedling growth of four vegetable species. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(4): 201-208.
- Inagaki, M. (2000). Old but new material: New carbons-control of structure and functions. Amsterdam, Elsevier: 1-29.
- Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K.A. and Wallin, H. (2013). Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, 7(1): 154.
- Jiang, Y., Hua, Z., Zhao, Y., Liu, Q., Wang, F. and Zhang, Q. (2013). The effect of carbon nanotubes on rice seed germination and root growth. In *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB)*, 250: 1207-1212.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. and Biris, A.S. (2009). Carbon Nanotubes Are Able to Penetrate Plant Seed Coat and Dramatically Affect Seed Germination and Plant Growth. *ACS NANO*, 10: 3221-3227.
- Khodakovskaya, M.V., De Silva, K., Biris, A.S., Dervishi E. and Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells, *ACS Nano*, 6: 2128-2135.
- Khot, L.R., Sankaran, S., Mari Maja, J., Ehsani, R. and Schuster, E.W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review, *Crop Protection*, 35: 64-70.

- Lahiani, M.H., Chen, J., Irin, F., Puretzky, A.A., Green, M.J. and Khodakovskaya, M.V. (2015). Interaction of carbon nanohorns with plants: Uptake and biological effects. *Carbon*, 81: 607-619.
- Lin, D. and Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2): 243-250.
- Mazahernia, S. (2009). Comparison of conventional iron oxide nanoparticles with municipal solid waste compost and granulated sulfur in iron and other nutrients in soil and wheat. Masters thesis, Ferdowsi University of Mashhad, (in Farsi).
- Srinivasan, C. and Saraswathi, R. (2010). Nano-agriculture-carbon nanotubes enhance tomato seed germination and plant growth. *Current science*, 99(3): 274-275.
- Thakkar, K.N., Snehit, S., Mhatre, M.S., Rasesh, Y. and Parikh, M.S. (2009). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine*, 6(2): 257-262.
- Tripathi, S. and Sarkar, S. (2015). Influence of water soluble carbon dots on the growth of wheat plant, *Applied Nanoscience*, 5: 609-616.
- Tripathi, S., Sonkar, S.K. and Sarkar, S., (2011). Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3: 1176-1181.
- Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K. and Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6): 1-10.

Effect of seed pretreatment with carbon nanotubes on growth performance of two wild pistachio species (*P.khinjuk Stocks* & *Pistacia atlantica Desf*)

F. Mohammadpour,¹ F. Ghasemi Aghbash,² M. Zarafshar,³ E. Ghanbary⁴

Received:2020.12.25

Accepted:2021.09.11

Abstract

The purpose of the current study was to investigate the effect of carbon nanotubes on morphological traits of two wild pistachio species and compare them with common treatments including cold and acid sulfuric 65% in a completely randomized design. The results showed that application of carbon nanotubes with concentrations of 25 and 75 mg / L significantly improved the morphological and biomass traits of the two species of wild pistachio in comparison with the acid and cold treatments. The highest increase in root, stem height and collar diameter was observed in the 25 mg / L treatment. The highest root length and dry and fresh root biomass were observed in *Khinjuk* under 75 mg/L nano carbon treatment. The highest concentration of leaf magnesium was observed in *P. atlantica* after 10 and in *P. Khinjuk* after 100 mg/L treatments. The phosphorus content in leaves of the two wild pistachio species was stable under the all treatments. The leaf potassium in *P. atlantica* was the highest under 10, 25, and 50 mg/L treatment and it was the highest in leaves of *P. Khinjuk* under 75 mg/L treatment. This research proved the positive impacts of carbon nanotubes on the growth of the wild Pistachio species.

Keywords: Cold treatment, Fresh and dry biomass, Morphology, Nutrient elements, Wild Pistachio.

1. M.Sc. Student of Forestry, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Malayer, Malayer, Iran

2. Assistant Prof., Department of Nature Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran

3. Assistant Prof., Research Division of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran.

(*Corresponding author: mehrdad.zarashar@areeo.ac.ir)

4. Ph. D graduated, expert of forest and range, Department of Natural Resources and Watershed Management in Kermanshah, Iran

جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده ال - آسپاراژیناز از گیاه مریم گلی باغی (*Salvia*

nemorosa L.

سمانه نریمانی^۱؛ مصطفی عبادی^{۲*}؛ محمد پاژنگ^۳؛ سعید ملائی^۴

چکیده

آنزیم ال - آسپاراژیناز، تجزیه آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز کرده و یکی از مهمترین آنزیم‌ها در صنایع دارویی و غذایی است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز از گیاه مریم گلی باغی و تعیین فعالیت این آنزیم در این قارچ‌ها است. در این پژوهش، گونه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت از برگ‌های سالم جداسازی گردید. سنجش کیفی آنزیم آسپاراژیناز روی محیط کشت آسپاراژین آگار و سنجش کمی آن در محیط کشت سیزپکس داکس به روش طیف نور سنجی با معرف نسلر انجام شد. بررسی‌های ریختی و مولکولی نشان داد جدایه‌ها به جنس‌های *Alternaria*، *Talaromyces*، *Stemphylium* و *Linnemannia* تعلق دارند. گونه‌های مختلف با ایجاد هاله صورتی تا قرمز رنگ نشان دادند قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز هستند. گونه *Alternaria alternata* با تولید ۲/۳۴ U/mg آسپاراژیناز، بهترین جدایه تولیدکننده آنزیم انتخاب شد و می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید آنزیم مطرح باشد.

واژه های کلیدی: ال - آسپاراژیناز، تبارزایشی، قارچ‌های اندوفیت، مریم گلی باغی، نسلریزاسیون

۱. دانشجوی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز *نویسنده مسئول m.ebadi@azaruniv.ac.ir
۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۴. استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

مقدمه

ال- آسپاراژیناز (ال- آسپاراژین آمیدوهیدرولاز E.C.3.5.1.1) آنزیمی است که هیدرولیز ال- آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز می‌کند (Dhanam & Kannan, 2013). آسپاراژیناز یکی از آنزیم‌های مهم درمانی در درمان انواع لوسمی‌ها نظیر لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لنفوسارکوما، لنفوما یهودچکین، لنفوما یغیرهودچکین و ملانوسارکوما است (Pieters et al., 2011). همچنین این آنزیم در صنایع غذایی جهت تولید مواد غذایی فاقد اکریل‌آمید کاربرد فراوانی دارد (Tareke et al., 2002; Xu et al., 2016). چندین میکروارگانیسم و برخی از گیاهان و جانوران دارای توانایی تولید آسپاراژیناز هستند؛ با این وجود تنها آنزیم‌های خالص‌شده از باکتری‌های *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* به شکل داروهای شیمی‌درمانی موثر برای درمان لوسمی حاد لنفوئیدی و برخی از نئوپلازی‌های بدخیم انسانی که وابسته به آسپاراژین هستند، در دسترس هستند. وربر و همکاران (Werber et al., 1995) نشان دادند که فعالیت آسپاراژیناز حاصل از دو باکتری مذکور، در محلول نمکی با اسمولاریته مشابه خون (۹/۰ درصد) به ترتیب ۴۰ و ۸۰ درصد کاهش می‌یابد. این امر به نوبه خود سبب افزایش دوز دارو و در نتیجه بروز حساسیت‌های شدید در برخی بیماران می‌گردد (Larson et al., 1998; Oettgen et al., 1970). بنابراین، یک نیاز مبرم برای یافتن آسپاراژینازهای جایگزین وجود دارد.

قارچ‌های اندوفیت به قارچ‌هایی اطلاق می‌شود که بدون ایجاد بیماری، تمام یا حداقل بخشی از زندگی خود را در داخل بافت سالم گیاهان بصورت همزیست زندگی می‌کنند (Hyde & Soyong, 2008). قارچ‌های اندوفیت از تنوع زیستی بالایی برخوردار بوده و در گروه‌های مختلف گیاهی اعم از آوندی و غیر آوندی گزارش شده‌اند (Strobel & Daisy, 2003; Weber, 2009). برخی از این قارچ‌ها، رشد میزبان و جذب مواد مغذی را افزایش داده و توانایی گیاه را در تحمل تنش‌هایی مانند خشکسالی و شوری بهبود می‌بخشند (Gupta et al., 2021). همچنین آنها با تولید متابولیت‌های ثانویه و القا تولید فیتوالکسین‌ها باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها، حشرات و گیاه‌خواران می‌شوند (Gao et al., 2010).

قارچ‌های اندوفیت به عنوان منبع بالقوه و جدیدی از ترکیبات فعال زیستی شناخته شده‌اند، بطوری‌که این ترکیبات دارای کاربردهای فراوانی در صنایع دارویی، غذایی و کشاورزی هستند. مطالعات متعددی در مورد خواص آنتی‌بیوتیکی، آنتی-ویروسی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت انجام شده است (Sandhu et al., 2014; Selim et al., 2012; Jalgaonwala et al., 2011). نتایج حاصل نشان داده که قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان دارویی منابع ارزشمندی برای مطالعه اندوفیت‌ها هستند چرا که قارچ‌های جدا شده از گیاهان دارویی از تنوع زیستی و پتانسیل بالایی برای تولید انبوهی از ترکیبات فعال زیستی برخوردار هستند.

گیاه مریم گلی با نام علمی *Salvia nemorosa* L. یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی از دیرباز برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود (Takeda, 1997; Ulubelen, 2003; Daskalova, 2004). مطالعات اخیر نشان داده

که این گیاه دارای ترکیبات ارزشمندی نظیر ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی است (Fotovvat et al., 2018; Tabei & Alizadeh, 2018; Heydari et al., 2020). برخی از این ترکیبات، ساختار فنلی دارند که تولید تجاری آن‌ها از طریق سنتز شیمیایی، پرهزینه و در برخی از موارد غیرممکن است و بنابراین شناسایی قارچ‌های اندوفیت این گیاه و بررسی حضور ترکیبات فعال در آن‌ها می‌تواند بسیار مفید واقع گردد.

با توجه به اهمیت آسپاراژیناز به‌عنوان یک آنزیم مهم در درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان و همچنین صنایع غذایی و نیاز روز افزون به این آنزیم، مطالعه برای شناسایی قارچ‌های تولید کننده این آنزیم امری بسیار ضروری است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی جدایه‌های اندوفیت قارچی از گیاه دارویی *S. nemorosa* و بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آسپاراژیناز است.

مواد و روش‌ها

جداسازی جدایه‌های قارچی

نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در این بررسی، خرداد سال ۱۳۹۸ از منطقه زنوز واقع در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و برای بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل شد. از هر بوته بصورت تصادفی تعداد ۵ عدد برگ تازه و سالم برداشته شد و به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شده و به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شست‌وشو داده شدند. سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه استریل شدند و بعد از آن با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد قطعات با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه استریل شدند و در آخر سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند و در زیر هود بیولوژیک بر روی کاغذ صافی خشک گردیدند. قطعات استریل شده در زیر هود بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (س. د. آ) (PDA: Potato Dextrose Agar) قرار داده شدند (در هر پلیت سه قطعه با فاصله مناسب از هم قرار داده شد) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری شدند. بعد از گذشت ۵ روز، جدایه‌های رشد کرده به محیط جدید س. د. آ منتقل شدند و با استفاده از روش کشت نوک ریشه، جدایه‌ها خالص شدند.

شناسایی ریختی و مولکولی جدایه‌ها

به منظور بررسی ویژگی‌های مربوط به پرگنه جدایه‌های قارچی، ابتدا تمامی جدایه‌ها به مدت هفت روز روی محیط کشت س. د. آ در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شدند. پس از طی مدت زمان معین، شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن، ویژگی‌های رشدی، ویژگی‌های مربوط به اسپورها، کنیدیوفر و غیره به منظور بهره‌گیری در شناسایی جدایه‌ها ارزیابی شدند. اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول‌های لاکتوفنل و لاکتوفنل-کاتن بلو تهیه شده و با میکروسکوپ نوری الیمپوس

(Olympus, Japan) مدل BH2 بررسی شدند. شناسایی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Perez & Schenck, 1990; Barnett & Hunter, 1998; Carris *et al.*, 2012) صورت گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز براث (س. د. ب) (PDB: Potato Dextrose Broth) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری شدند. سپس زیست توده قارچی با استفاده از کاغذ صافی استریل از محیط کشت جدا شد و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Ebadi *et al.*, 2014). واکنش PCR برای توالی ناحیه فاصله‌انداز رونویسی‌شونده داخلی (ITS) با پرایمرهای ITS1 و ITS4 انجام گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر Master mix، ۱۵ میکرولیتر آب، ۳ میکرولیتر DNA الگو و یک میکرولیتر از هر پرایمر در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی $94^{\circ}\text{C}-5'$ ، $35 \times (94^{\circ}\text{C}-1', 55^{\circ}\text{C}-1', 72^{\circ}\text{C}-1')$ و $72^{\circ}\text{C}-10'$ انجام شد. محصول PCR جهت تعیین ترادف به شرکت پیشگام ارسال شد و نتایج تعیین ترادف از طریق هم‌ردیفی توالی در بانک ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت. درخت تبارزایی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 بر پایه روش Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ تکرار Bootstarp ترسیم شد.

سنجش کیفی تولید آسپاراژیناز

به منظور بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آسپاراژیناز از محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار که شامل ۱ درصد آسپاراژین، ۰/۰۵ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۵ درصد سولفات منیزیم، ۰/۰۲ درصد کلرید سدیم، ۰/۱۲ درصد فنل رد و ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. در همین راستا، یک قطعه به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه فعال هر جدایه قارچی (کشت هفت روزه)، در مرکز محیط کشت حاوی محیط مذکور قرار داده شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز نگهداری گردید.

سنجش کمی تولید آسپاراژیناز

فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محیط کشت سیزپکس داکس به روش طیف نورسنجی با معرف نسلر انجام شد که این روش توسط Imada و همکاران (۱۹۷۳) پیشنهاد شده است. در این روش، میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز بر اساس میزان هیدرولیز آسپاراژین در محیط سنجیده می‌شود و میزان هیدرولیز آسپاراژین نیز از طریق اندازه‌گیری میزان آمونیاک آزاد شده در واکنش مشخص می‌گردد. بدین منظور، دو قطعه به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه فعال هر جدایه قارچی (کشت هفت روزه)، به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت س. ز. د تلقیح شد و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. جهت تعیین فعالیت آنزیم، ابتدا ۲ میلی‌لیتر از عصاره خام حاوی آنزیم به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی حاوی آنزیم از باقی مانده‌های سلولی (رسوب) جدا شده و جهت تعیین فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، ۵۰۰ میکرولیتر محلول آسپاراژین ۰/۰۴ مولار، ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (pH ۸) به ۲۰۰ میلی‌لیتر

محلول رویی اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار متوقف و با سانتریفیوژ به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، پروتئین‌های رسوبی حذف و از محلول رویی آن برای انجام واکنش نسلریزاسیون استفاده شد. به ۱۲۵ میکرولیتر محلول رویی، یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۲۵ میکرولیتر معرف نسلر اضافه شد و پس از دو دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف آمونیوم سولفات، میزان جذب به غلظت آمونیاک آزاد شده تبدیل شد. همچنین قابل ذکر است، یک واحد فعالیت آسپاراژینازی معادل مقداری از آنزیم است که بتواند یک میکرومول آمونیاک در یک دقیقه ایجاد نماید. سنجش محلول پروتئینی جهت یافتن غلظت پروتئین موجود در محلول به روش برادفورد و با استفاده از منحنی استاندارد آل‌بومین سرم گاوی (BSA) صورت گرفت (Pour Nouroozi, 2015).

قابل ذکر است جهت بررسی احتمال اثر مواد متابولیکی بر روی دامیده شدن آسپاراژین، در یک تست دیگر از سوسترای گلوتامین که مشابه آسپاراژین است استفاده شد و با واکنش نسلر میزان تولید آمونیاک در آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مواد متابولیکی (و آنزیمی) موجود در محیط کشت سلولی در شرایط مورد بررسی، گلوتامین را دامیده نکرده‌اند. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که فعالیت مشاهده شده در مورد آسپاراژین بر اثر فعالیت آنزیم آسپاراژیناز است.

اندازه‌گیری Km و Vmax آنزیم آسپاراژیناز

به منظور اندازه‌گیری پارامترهای سنتتیکی آنزیم، ثابت میکائیلیس- منتن (Km) و سرعت بیشینه آنزیم (Vmax) برای گونه‌ای که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود محاسبه شد. بدین منظور، غلظت‌های مختلف آمینواسید آسپاراژین در بافر Tris-HCl با pH معادل هفت تهیه شد و فعالیت آنزیم در آن غلظت‌ها اندازه‌گیری شد. سپس با رسم نمودارهای میکائیلیس- منتن و لینویر-برک، پارامترهای مدنظر اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل آماری اعداد و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS (ver. 17) و روش تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

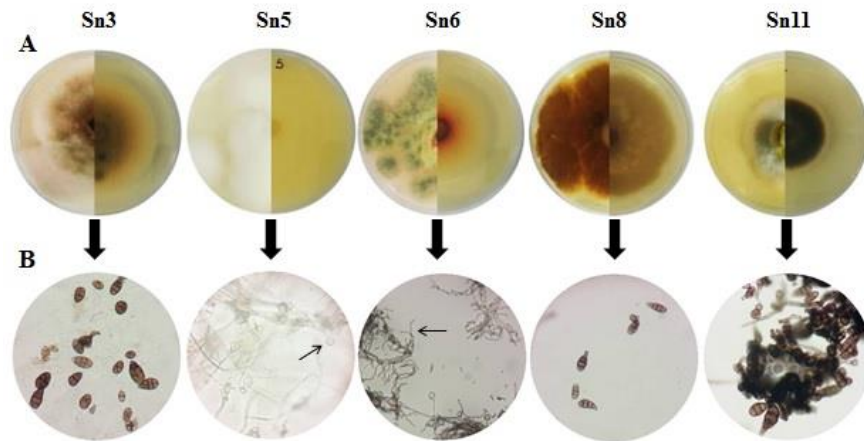
نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مریم گلی باغی با برخی از قارچ‌های اندوفیت دارای رابطه همزیستی است. بطور کلی ۲۷ جدایه از برگ‌های گیاه مورد مطالعه جداسازی شد که به لحاظ شکل و ظاهر پرگنه با یکدیگر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و با توجه به شباهت‌های ریختی، جدایه‌ها گروه‌بندی شدند و از هر گروه یک یا چند جدایه برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

بررسی خصوصیات ریختی نشان داد سرعت رشد و شکل پرگنه، رنگ سطح زیرین و فوقانی آن، نوع میسلیوم هوایی و همچنین نوع اسپور در جدایه‌های مورد مطالعه متفاوت است (جدول ۱، شکل ۱). با استفاده از کلیدهای شناسایی مشخص شد که جدایه‌ها به جنس‌های *Alternaria* و آرایه‌های شبیه به آن نظیر *Stemphylium*، *Penicillium* و *Linnemannia* تعلق دارند. ویژگی بارز جنس *Alternaria* داشتن زنجیره‌های کنیدیومی و کنیدیوم‌های چند سلولی با دیواره‌های طولی و عرضی است که در جدایه‌های Sn2، Sn3، Sn8 و Sn9 این ویژگی‌ها قابل تشخیص هستند (شکل ۱). جنس *Stemphylium* شباهت بسیار زیادی به جنس *Alternaria* داشته و تکثیر متوالی کنیدیوفور، اساسی‌ترین ویژگی ریخت‌شناسی در تفکیک این جنس از *Alternaria* است (جدایه Sn11). جنس *Linnemannia* دارای ریشه سنوسیتیک بوده و در مقایسه با جنس *Mucor*، این جنس دارای اسپورانژیوسپورهای کوچکتر، تعداد کمتر و فاقد کلوملا شناخته می‌شود (جدایه Sn5). جدایه Sn6 نیز با توجه به ویژگی‌های ریختی پرگنه و همچنین دارا بودن کنیدیوم‌های تک سلولی شباهت بالایی به جنس *Penicillium* داشت.

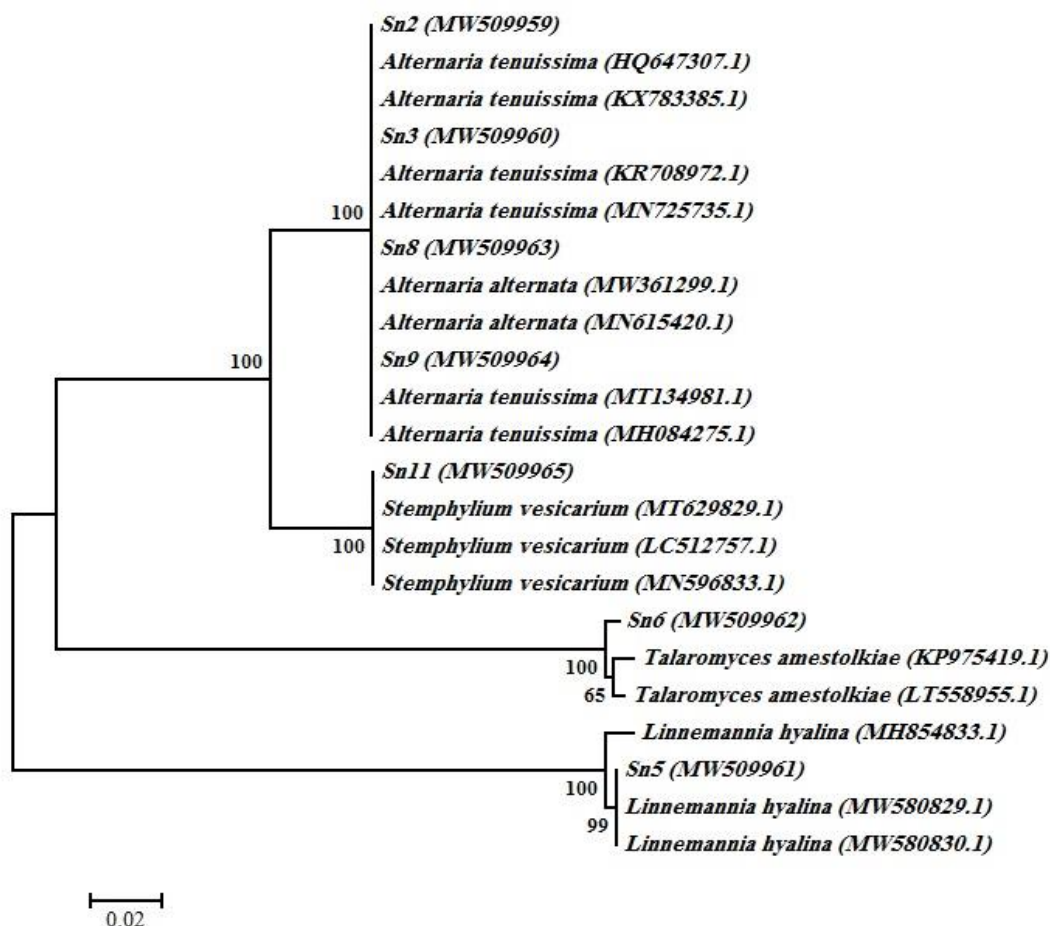
جدول ۱: خصوصیات ریختی جدایه‌های قارچی مورد مطالعه روی محیط کشت س. د. آ پس از گذشت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

خصوصیات ریخت شناسی						
قطر پرگنه (میلی متر)	شکل پرگنه	رنگ سطح زیرین	رنگ سطح فوقانی	نوع میسلیوم هوایی	نوع اسپور	
۳۸	دایره‌ای	خاکستری	خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی	Sn2
۳۷	دایره‌ای	خاکستری	سفید خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی	Sn3
۷۰	دایره‌ای	نخودی	سفید	پنبه ای	اسپورانژیوسپور	Sn5
۴۳	نامنظم	هلویی	سبز	متراکم	کنیدیوم تک سلولی	Sn6
۴۸	نامنظم	قهوه‌ای	قهوه‌ای	متراکم	کنیدیوم چند سلولی	Sn8
۴۰	دایره‌ای	خاکستری	خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی	Sn9
۲۹	دایره‌ای	سبز تیره	سفید	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی	Sn11



شکل ۱: A: سطح پشتی و رویی برگ‌های جدایه‌های قارچی روی محیط س. د. آ (کشت ۷ روزه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس). B: اسپورهای تولید شده توسط هر جدایه بر روی محیط س. د. آ

برای ناحیه ژنومی rDNA-ITS یک توالی به طول حدود ۶۵۰ جفت باز تکثیر شد. تعیین توالی ناحیه ITS و مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی با استفاده از روش NJ، نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه در چهار کلاد اصلی قرار گرفتند (شکل ۲). در این تبارنما، جدایه‌های Sn8، Sn3، Sn2 و Sn9 با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد متعلق به دو گونه *Alternaria* *tenuissima* و *A. alternata* بودند. جدایه Sn5 با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد همراه با جدایه‌های تیپ گونه *Linnemannia hyalina* در یک کلاد دیگر قرار گرفت. همچنین، تبارزایی جدایه‌های Sn6 و Sn11 نشان داد این گونه‌ها با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد به ترتیب متعلق به *Talaromyces amestolikai* و *Stemphylium vesicarium* بودند. توالی‌های مورد مطالعه با شماره دسترسی MW509959-65 در بانک ژنی NCBI ثبت گردید.



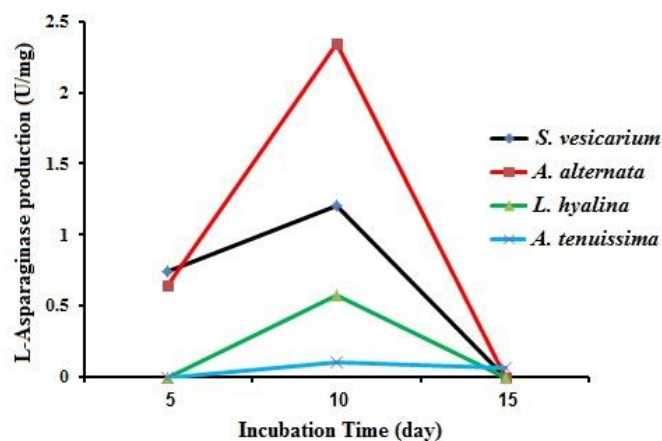
شکل ۲: درخت تبارزاییی مربوط به نواحی ITS جدایه‌های اندوفیتی مورد مطالعه با روش Neighbor-Joining و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap

نتایج غربالگری توانایی جدایه‌ها برای تولید آنزیم آسپاراژیناز نشان داد که تمامی گونه‌ها بجز گونه *T. amestolkiae* هاله قرمز مایل به صورتی بر روی محیط حاوی فنل رد ایجاد کردند (شکل ۳). با تولید آسپاراژیناز خارج سلولی توسط این گونه‌ها، آسپاراژین موجود در محیط به آسپارتیک اسید و آمونیاک تجزیه و محیط قلیایی می‌گردد. بدلیل وجود فنل قرمز، محیط کشت در شرایط قلیایی به صورتی تا قرمز تغییر رنگ می‌دهد و هاله قرمز نشانه تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط گونه‌ها است (شکل ۳).



شکل ۳: سنجش کیفی تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط قارچ‌های اندوفیت حاصل از گیاه *S. nemorosa*

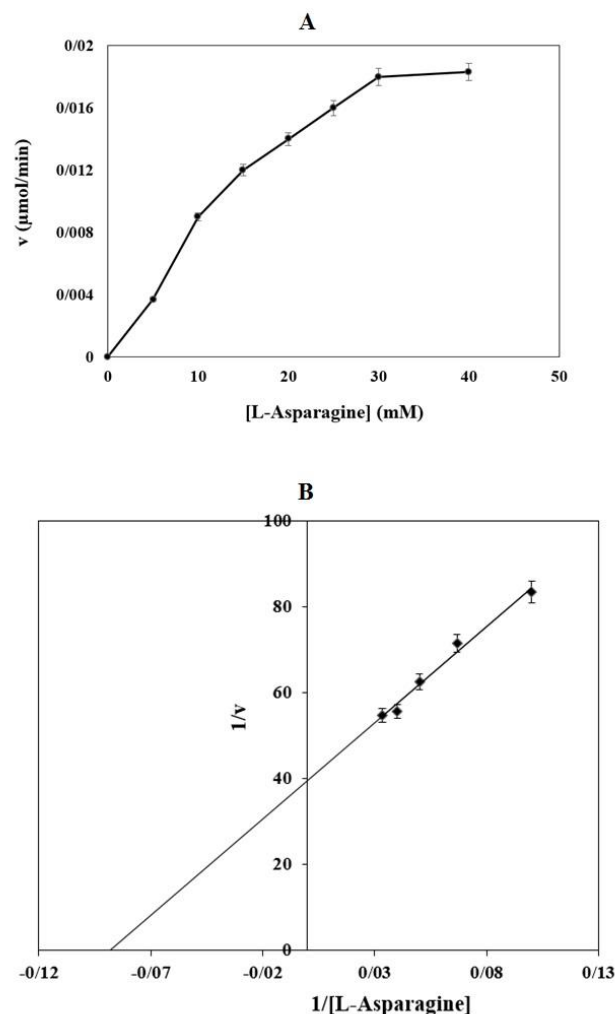
بر اساس نتایج مرحله قبل، توان تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط چهار گونه *A. alternata*، *L. hyalina*، *A. tenuissima* و *S. vesicarium* در طی روزهای مختلف در محیط سیزپکس داکس حاوی آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ نشان دهنده فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده برای این چهار گونه بعد از مدت پنج، ده و پانزده روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس است. بر اساس نتایج حاصل بعد از طی ۵ روز گونه‌های *A. alternata* و *S. vesicarium* با تولید ۲/۳۴ و ۱/۲۵ U/mg به ترتیب دارای بیشترین میزان تولید آنزیم بودند. حداکثر تولید آنزیم توسط گونه‌های مختلف در روز دهم مشاهده شد و گونه *A. alternata* با تولید ۲/۳۴ U/mg آنزیم به عنوان گونه منتخب برای ادامه مطالعات انتخاب گردید.



شکل ۴: میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های منتخب تولیدکننده آسپاراژیناز طی روزهای مختلف.

ویژگی‌های سنتتیکی آنزیم مربوط به گونه *A. alternata*، در غلظت‌های مختلف از سوپسترا بررسی شد و نتایج آن بصورت نمودارهای میکائلیس-منتن و لینویر-برک در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. پارامترهای V_{max} و K_m نیز با

استفاده از نمودارهای مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد مقدار K_m حاصل برای آنزیم برابر با $24/27$ میلی‌مولار و مقدار V_{max} حاصل برابر با $0/025$ میکرومول بر دقیقه بود.



شکل ۵- نمودارهای میکائیلیس- منتن (A) و لینویر- برک (B) مربوط به آنزیم تولید شده توسط جدایه *Sn3* (*A. alternata*) در غلظت‌های مختلف آل- آسپاراژین

بحث

شناسایی قارچ‌ها بدلیل تنوع بالای آن‌ها و همچنین شباهت مورفولوژیکی بین گونه‌های مختلف امری دشوار است. بنابراین علاوه بر شناسایی مورفولوژیک قارچ‌ها، استفاده از تبارزایی مولکولی برای شناسایی دقیق گونه‌های قارچی بسیار حائز اهمیت است. سیستم‌های بارکدگذاری DNA از یک منطقه استاندارد کوتاه (بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ جفت پایه) برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌کنند. ناحیه ITS یکی از مارکرهای مولکولی مهم با بالاترین احتمال شناسایی صحیح است که بطور قابل ملاحظه‌ای برای گروه وسیعی از قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Lacap et al., 2003). در این پژوهش، با توجه به نتایج آنالیز تبارزایی، جدایه‌های *Sn5*، *Sn6* و *Sn11* در کلادهای مجزا قرار گرفتند و جایگاه دقیق تاکسونومیکی آنها بر اساس ناحیه ITS میسر شد.

در حالی که، جدایه‌های Sn2، Sn3، Sn8 و Sn9 که متعلق به دو گونه *A. tenuissima* و *A. alternata* بودند در یک کلاذ قرار گرفتند و بنابراین، ناحیه ITS اگرچه توانست جایگاه تاکسونومیکی این جدایه‌ها را نشان دهد، ولی قادر به تفکیک دو گونه مذکور از هم نبود. مشابه به این یافته، Zhao و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که بر روی گونه‌های مختلف *Alternaria* انجام دادند تمایز میان *A. tenuissima* و *A. alternata* بر اساس ناحیه ITS امکان‌پذیر نیست و صفات مورفولوژیکی برای تشخیص این دو گونه از هم می‌تواند بسیار مفید باشد. آنها نشان دادند رنگ سطح پشتی پرگنه گونه‌های *A. tenuissima* و *A. alternata* در محیط س. د. آ به ترتیب سبز زیتونی و خاکستری تا قهوه‌ای تیره است. همچنین زنجیره کنیدیومی گونه *A. alternata* دارای دو تا سه شاخه جانبی بوده درحالی که زنجیره کنیدیومی گونه *A. tenuissima* با یک یا دو شاخه جانبی همراه است. بنابراین، با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی، در این مطالعه جدایه Sn8 متعلق به گونه *A. tenuissima* و جدایه‌های Sn2، Sn3 و Sn9 متعلق به گونه *A. alternata* تشخیص داده شد. به غیر از گونه *L. hyalina* (متعلق به شاخه Mucoromycota) سایر گونه‌های بدست آمده در این مطالعه متعلق به شاخه Ascomycota بودند، بطوری که در مطالعات قبلی نیز چیرگی گونه‌های شاخه Ascomycota به عنوان اندوفیت گیاهان نشان داده شده‌است.

در مطالعات پیشین گونه *L. hyalina* به عنوان اندوفیت از گیاهان مختلفی نظیر *Elaeocarpus sphaericus* و *Arabidopsis thaliana* جداسازی شده‌است. در این مطالعات نشان داده شد که *L. hyalina* هم در سنتز فیتوهورمون‌هایی نظیر اندول استیک اسید (IAA) موثر بوده و باعث افزایش رشد گیاه میزبان می‌شود و هم باعث مهار بیماری ایجاد شده توسط پاتوژن می‌گردد (Shukla et al., 2012; Johnson et al., 2019; Ozimek & Hanaka, 2021).

در مطالعه‌ای که بر روی ترکیب جوامع اندوفیتی گیاه *Aristolochia chilensis* در اکوسیستم خشک صورت گرفت گونه‌های *S. vesicarium* و *T. amestolkiae* به عنوان اندوفیت جداسازی و شناسایی شدند (Guevara-Araya et al., 2020). در مطالعات مختلف حضور ترکیبات فعال نظیر مروتروپنوئید و خواص ضدباکتریایی و ضد التهابی گونه *T. amestolkiae* نشان داده شده‌است (Chen et al., 2016; Chen et al., 2018; Fu et al., 2020). مطالعات گسترده‌ای در مورد جداسازی و شناسایی گونه‌های *A. alternata* و *A. tenuissima* از گیاهان مختلف صورت گرفته و خواص بیولوژیکی متعددی نظیر آنتی‌اکسیدان، ضدباکتریایی، سمیت سلولی، آفت کش و فعالیت پروتئازی برای آنها نشان داده شده است (Fang et al., 2012; Wu et al., 2014; Bhagat et al., 2016; Fernandes et al., 2009; Sudharshana et al., 2019). نتایج نشان داد بجز گونه *T. amestolkiae*، سایر گونه‌ها دارای توانایی تولید آسپاراژیناز بودند. در مطالعات قبلی نیز توانایی تولید آسپاراژیناز توسط برخی از اندوفیت‌های گیاهان دارویی *A. alternata* و *S. vesicarium* نشان داده شده بود (Moharram et al., 2016; Hatamzadeh et al., 2020).

نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌است که تولید حداکثری آنزیم، به عوامل مختلفی مانند منبع کربن و میزان pH محیط کشت و نیز دما و زمان انکوباسیون وابسته است. در کنار بررسی این عوامل، خالص سازی کامل آنزیم جهت مقایسه دقیق عوامل

و همچنین مطالعه پایداری و نیمه عمر آنزیم ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش پس از غربال سازی جدایه‌ها، با توجه به کوتاه بودن زمان تولید و بیش‌ترین میزان تولید آنزیم، گونه *A. alternata* به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید آسپاراژیناز معرفی می‌شود و با توجه به اهمیت و کاربرد آنزیم آسپاراژیناز در صنایع دارویی و غذایی، امکان استفاده از نتایج پژوهش حاضر برای مطالعات بعدی وجود دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بدلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

- Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). The Illustrated Genera of Imperfect Fungi, fourth edition. Aps Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 218 p.
- Bhagat, J., Kaur, A., Kaur, R., Yadav, A.K., Sharma, V., Chadha, B.S. (2016). Cholinesterase inhibitor (Altenuene) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: optimization, purification and characterization. Journal of applied microbiology, 121(4): 1015-25.
- Carris, L.M., Little, C.R., Stiles, C.M. (2012). Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor.
- Chen, S., Ding, M., Liu, W., Huang, X., Liu, Z., Lu, Y., Liu, H., She, Z. (2018). Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1. Phytochemistry, 146: 8-15.
- Chen, S., Liu, Y., Liu, Z., Cai, R., Lu, Y., Huang, X., She, Z. (2016). Isocoumarins and benzofurans from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* possess α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities. RSC advances, 6(31): 26412-20.
- Daskalova, T. (2004). On some specificities of seed formation in *Salvia nemorosa* (Lamiaceae). Phytologia Balcanica, 10: 79-84.
- Dhanam, J.G., Kannan, S. (2013). L-asparaginase- Types, perspectives and applications. Advanced Biotech, 13(5): 1-5.
- Ebadi, M., Riahi, H., Zare, R. (2014). Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP-PCR markers. Mycologia Iranica, 1(1): 19-26.
- Fang, Z.F., Yu, S.S., Zhou, W.Q., Chen, X.G., Ma, S.G., Li, Y., Qu, J. (2012). A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire. Chinese Chemical Letters, 23(3): 317-20.

- Fernandes, M.D., Pfenning, L.H., Costa-Neto, C.M., Heinrich, T.A., Alencar, S.M., Lima, M.A., Ikegaki, M. (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(4): 677-85.
- Fotovvat, M., Radjabian, T., Saboora, A. (2018). HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran. Records of Natural Products, 13(1).
- Fu, Y., Li, C., Zhu, J., Zhang, L., Wang, Y., Chen, Q., Xu, L., Zhang, S., Fang, Y., Liu, T. (2020). A new meroterpenoid from endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* CS-O-1. Biochemical Systematics and Ecology, 93: 104186.
- Gao, F.K., Dai, C.C., Liu, X.Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African Journal of Microbiology Research, 4 (13): 1346-1351.
- Guevara-Araya, M.J., Vilo, C., Urzúa, A., González-Teuber, M. (2020). Differences in community composition of endophytic fungi between above-and below-ground tissues of *Aristolochia chilensis* in an arid ecosystem. Revista Chilena de Historia Natural, 93:1-9.
- Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P.M., Watt, M. and Roessner, U. (2021). Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: current knowledge, perspectives and future directions. Plant and Soil, 461(1): 219-244.
- Hatamzadeh, S., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotouhifar, K.B., Hemmati, K., White, J.F., Taliei, F. (2020). Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. Peer-reviewed Journal, 8: e8309.
- Heydari, H.R., Chamani, E., Esmailpour, B. (2020). Cell line selection through gamma irradiation combined with multi-walled carbon nanotubes elicitation enhanced phenolic compounds accumulation in *Salvia nemorosa* cell culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 142(2): 353-367.
- Hyde, K.D., Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity, 33: 163-173.
- Jalgaonwala, R.B., Mohite, B.V., Mahajan, R.T. (2011). Natural products from plant associated endophytic fungi: a review. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1: 21-32.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. Journal of General Microbiology, 76: 85-99.
- Johnson, J.M., Ludwig, A., Furch, A.C., Mithöfer, A., Scholz, S., Reichelt, M., Oelmüller, R. (2019). The beneficial root-colonizing fungus *Mortierella hyalina* promotes the aerial growth of Arabidopsis and activates calcium-dependent responses that restrict *Alternaria brassicae*-Induced disease development in roots. Molecular Plant-Microbe Interactions, 32(3):351-63.

- Lacap, D.C., Hyde, K.D., Liew, E.C.Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers*, 12: 53-66.
- Larson, R.A., Fretzin, M.H., Dodge, R.K., Schiffer, C.A. (1998). Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 12: 660-665.
- Moharram, A., Zohri, A.N., Seddek, N. (2016). L-Asparaginase production by endophytic fungi isolated from *Withania Somnifera* in Egypt. *SS International Journal of Multidisciplinary Research*, 2: 30-40.
- Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K., Leeper, R.D., Tallal, L., Tan, C.C., et al. (1970). Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer*, 25: 253-278.
- Ozimek, E., Hanaka, A. (2021). Mortierella Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. *Agriculture*, 11(1): 7.
- Pieters, R., Hunger, S.P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., et al. (2011). L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 117(2): 238-249.
- Perez, Y., Schenck, N. (1990). A unique code for each species of VA mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 82: 256-260.
- Pour Nouroozi, R. (2015). Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. *International Electronic Journal of Medicine*, 4: 11-17.
- Sandhu, S.S., Kumar, S., Aharwal, R.P. (2014). Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus communis* linn and their antibacterial activity. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 4 (3): 611-618.
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 31-82.
- Shukla, A.K., Yongam, Y., Tripathi, P. (2012). Distribution of endophytic fungi in different parts of rudraksh (*Elaeocarpus sphaericus*) plants. *Microbes: diversity and biotechnology*. New Delhi: Daya Publishing House, 37-42.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 491-502.
- Sudharshana, T.N., Venkatesh, H.N., Nayana, B., Manjunath, K., Mohana, D.C. (2019). Anti-microbial and anti-mycotoxigenic activities of endophytic *Alternaria alternata* isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: molecular characterisation and bioactive compound isolation. *Mycology*, 10(1): 40-8.
- Tabei, S. M., Alizadeh, A. (2018). Phytochemical constituents and antimicrobial activity of *Salvia*. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(4): 847-854.

- Takeda, Y., Zhang, H., Matsumoto, T., Otsuka, H., Oosio, Y., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., Sun, H., Sezik, E. and Yesilada, E. (1997). Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*, 44(1): 117-120.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated food stuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17): 4998-5006.
- Ulubelen, A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64(2): 395-399.
- Weber, D. (2009). Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In: Anke, T., Weber, D. (eds). *The Mycota*. Vol. XV, Physiology and Genetics selected basis and applied aspects springer- Verlag, Berlin, Germany, pp. 153-195.
- Werber, G., Ahlke, E., Nowak-Göttl, U., Jürgens, H., Verspohl, E.J., Boos, J. (1995). Asparaginase activities in vitro are highly sensitive to different buffer conditions. In: Büchner T., Schellong G., Ritter J., et al., editors. *Acute Leukemias VI*. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg, 512-516.
- Wu, W.B., Yue, G.C., Huang, Q.L., Sun, L.L., Zhang, W. (2014). A new compound from an endophytic fungus *Alternaria tenuissima*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(7): 777-82.
- Xu, F., Oruna-Concha, M.J., Elmore, J.S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, 210: 163-171.
- Zhao, J., S. W. Bao, G. P. Ma, and X. H. Wu. (2016). Characterization of *Alternaria* species associated with watermelon leaf blight in Beijing municipality of China. *Journal of Plant Pathology*, 135-138.

Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from *Salvia nemorosa* L.

S. Narimani¹, M. Ebadi², M. Pazhang³, S. Mollaei⁴

Received: 2021.6.7

Accepted: 2021.7.19

Abstract

L-asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of asparagine into aspartic acid and ammonia and is one of the most important enzymes in the pharmaceutical and food industries. The goal of this study was the isolation and identification of asparaginase-producing endophytic fungi from *Salvia nemorosa* and the determination of their enzyme activities. In this study, different species of endophytic fungi were isolated from healthy leaves. A qualitative assay of asparaginase enzyme was performed on asparagine agar medium and its quantitative assay was performed on Czapekdox's medium by spectroscopic method with Nessler reagent. Morphological and molecular investigations indicated that the isolates belonged to genera of *Alternaria*, *Stemphylium*, *Talaromyces*, and *Linnemannia*. Different species were shown to be able to produce the asparaginase by creating a pink to a red color zone. *Alternaria alternata* was selected as the best enzyme-producing, isolated by producing 2.34 U/mg asparaginase, and could be considered as a potential source for enzyme production.

Keywords: Endophytic fungi, L-asparaginase, Nesslerization, Phylogenetic, , *S. nemorosa*.

1. MSC, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz (*Corresponding author: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)

3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz

4. Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz

Content

1- Increase of growth parameters, pigmentation and some primary metabolites in <i>Lepidium sativum</i> L. seedlings under salinity stress using β -carotene and Gallic acid M Babaei, L Shabani *, S. Hashemi Shahraki	6
2- The effect of fertile biofertilizer 2 and potassium phosphate on the development of vegetative and reproductive organs of <i>Arabidopsis thaliana</i> L Basiri, S. Jafari Marandi,*,S.Arbabian, A. Majd, M.A.Malboobi, E.	24
3- Application of humic acid on improving the vegetative and reproductive growth of pistachio cultivar Akbari Z. Pakkish, H. Asghari , s. Mohammadrezakhani*	50
4-Investigation of effective factors on optimization of biopolymer production of polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) by Plackett-Burman method and optimization of productivity by high cell density technique N. Sinaei, D. Zare*, M. Azin	68
5- Study of allelopathic effect of aqueous extract of various organs of <i>Fumaria parviflora</i> on morphological, physiological and biochemical charateractics of <i>Lolium rigidum</i> Abdollah Ataei, Ebrahim Gholamalipour Alamdari *, Zeinab Avarseji, Ali Rahemi Karizaki	94
6- Evaluation of heritability for oil and protein contents of sesame (<i>Sesamum indicum</i> L.) lines under different irrigation regimes and mycorrhizal fungi E. Gholinezhad, R. Darvishzadeh, A. Abhari	113
7-Study of effective factors on biological removal of uranium by live microalgae <i>Chlorella vulgaris</i> p.Mohamadi.N.Javanmardi, P.Tajer Mohamad ghazvini	133
8-Effect of <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> in combination with neemarin and silica nanoparticles in the control of second instar larvae of sugar beet, <i>Spodoptera exigua</i> Hb. (Lep.: Noctuidae) in laboratory condition Majid Alimohamadian, Shahram Aramideh*, Shahram Mirfakhrai, Maryam Frozan.....	148
9- Effect of seed pretreatment with carbon nanotubes on growth performance of two wild pistachio species (<i>P.khinjuk Stocks & Pistacia atlantica Desf</i>) F. Mohammadpour, F. Ghasemi Aghbash, M. Zarafshar, E. Ghanbary	164
10-Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from <i>Salvia nemorosa</i> L. S. Narimani, M. Ebadi, M. Pazhang, S. Mollaei	180

Journal of Applied Biology

Winter 2021

Alzahra University - Vice Chancellery for Research Chief

Editor: M. Soudi, Professor of Alzahra University

Director in charge: M. Seifali, Assistant Professor of Alzahra University

Associate Editor: P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

Associate Editor: A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

Editorial Boards

M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University

N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences

F. Darvishi, Professor of Alzahra University

M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University

T. Valinassabpouri, Research Professor of Iranian Fisheries Science Research Institute

H. Ejtehad, Professor at Ferdowsi University of Mashhad

M. Ranjbar, Professor at Bu Ali Sina University

A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University

Z. Minochehr, Associate Professor Genetic Research Center of Tehran University

P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

International Editorial Board

H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn

Sh. Shahabi, Professor, Research Director of Highland Pharmaceutical Company and Associate Professor of South West Nechrothy Medical College

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research

English& Persian Editor: Masoumeh Aslanzadeh

Printing and Binding: Alzahra University Publishing

Circulation: 10 copies

Publication Frequency:

Quarterly Price: 10000 Rls

In order to have access to the table of Contents and abstracts contact:

Address: Alzahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak

Sq, Tehran, 1993891176, Iran.

Tel/Fax:021- 85692205

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

ISSN: 1607- 9884

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir