

۱. ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی بر میزان کاهش میکوتوکسین زیرالنون
- فاطمه آدمی قمصری، مریم تاج آبادی ابراهیمی،* مریم باقری ورزنه، علیرضا ایرانبخش، عباس اخوان سپهی
۲. بررسی اثرات پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بر رشد، ترکیب بدن و بیان ژن‌های رشد و اشتها فیل ماهی (*Huso huso*)
- محمودرضا ابراهیم‌نژادعربی، سیدمهدی حسینی‌فرد،* رضا چنگیزی، صابر وطن‌دوست و شایان قبادی
۳. هیپرگلوبولینمی و افزایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز میزبانان واسط آلوده به انگل زئونوتیک *لینگواتولا سراتا*
- علیرضا البرزی،* ماندانا حسینی، سمیه بهرامی، مسعود قربانپور، محمدرضا تابنده
۴. مدلسازی مطلوبیت زیستگاه غاز پیشانی سفید (*Anser albifrons* Scopoli, 1769) در ایران
- فاطمه بیگلری قوچان عتیق، آریتا فراشی،* میترا شریعتی نجف‌آبادی
۵. بررسی و مقایسه اثر پرایمر در ارزیابی ساختار جوامع باکتریایی خاک مناطق نیمه خشک با روش Illumina Miseq
- مریم تیموری، پریسا محمدی،* عادل جلیلی، رقیه زارعی
۶. ژئوبوتانی جنس *Onosma* L. (Boraginaceae) در بخش میانی زاگرس مرکزی: رویکرد حفاظتی
- فرزانه خواجه‌ئی نسب، احمدرضا محرابیان،* محمدجواد نیکجوین
۷. اثر عصاره‌های آبی و الکلی گیاه گزنه دوپایه بر رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای
- الهه ریاضی، فرشاد رخشنده رو،* وحید عبدوسی
۸. تاثیر عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار (*Polygonum bistorta* L) بر غلظت گلوکز خون موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده
- با استرپتوزوتوسین
- الهام صالحی،* مجید مروتی شریف‌آباد، مهدیه کریمی، مهناز سازی زواره
۹. تاثیر جنسیت، طول و وزن بر تغییرات کیفیت لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)
- مجید محمدنژاد،* رها فدایی راینی
۱۰. اثر چهار هفته ورزش و مکمل دهی اولئوروپین بر رفتارهای اضطراب و افسردگی در مدل حیوانی بیماری پارکینسون
- معصومه مکوندی چشمه چنار، عبدالحسن دولاح،* مریم رفیعی راد

بسم الله الرحمن الرحيم
فصلنامه علمی مجله زیست شناسی کاربردی

بهار ۱۴۰۱

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.lsc.gov.ir

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

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

وضعیت اعمال موارد:

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 زیست‌شناسی کاربردی در برابر مقاله‌های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
- الزامیست نویسنده مسئول مقاله یکی از اعضای محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها یا موسسات تحقیقاتی باشد. از این‌رو ایمیل نویسنده مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
- در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به‌عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
- مقاله قبلاً به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور همزمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
- 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.

نگارش :

- مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرند.
- هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد که همراه عنوان و واژه‌های کلیدی انگلیسی در انتهای مقاله آورده شود.
- مقاله کامل دارای عنوان فارسی، نام و آدرس نویسندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری(اختیاری)، منابع، عنوان، آدرس، چکیده انگلیسی و واژه‌های کلیدی انگلیسی می باشد.
- تمام نمودارها، نقشه‌ها و شکل‌ها رنگی باشند (سیاه و سفید نباشند). زیرنویس و توضیحات مربوط به شکل‌ها و جدول‌ها در مقاله‌های فارسی، به هر دو زبان فارسی و انگلیسی ذکر شوند. این قسمت با قلم B-Nazanin با اندازه فونت ۱۰ و انگلیسی با قلم Times New Roman و اندازه فونت ۱۰ آماده شود. بعد از واژه شکل از خط تیره و بعد از واژه Figure از نقطه استفاده شود. کلمات شکل تا آخر شماره به فارسی با خط تیره باید بولد باشد و به لاتین Figure. باید بولد باشد.
- تمامی جداول و نوشته‌های روی شکل‌ها به انگلیسی تنظیم شوند.
- مثال: شکل ۱- درصد حذف کنگو رد در محلول ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگ با غلظت‌های مختلف نمک.
- **Figure 1.** Congo red removal percentage at ۶۰۰ mg/l dye solution with different salt concentrations.
- تایپ مقاله با نرم افزار Microsoft Office Word 2007 باحاشیه ۲/۵ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل‌ها و بالانویس و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم در پایین و وسط صفحه با اندازه فونت ۱۲ 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 اندازه فونت ۹. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده مسئول سمت راست آن عدد باشد. (Akbari^{1*})
- نشانی نگارندگان: وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد.
- چکیده باید شامل هدف، مقدمه، پارامترها و 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 حداقل ۱۵۰ کلمه باشد.
- واژگان کلیدی فارسی **Bold** : ۱۲ و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.
- متن فارسی: اندازه فونت ۱۲ و در انگلیسی اندازه فونت 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 گسترده انگلیسی: (مشاهده شیوه تنظیم چکیده گسترده انگلیسی)
- چکیده انگلیسی: اندازه فونت ۱۰ نازک و در یک پاراگراف باشد.
- واژگان کلیدی انگلیسی: اندازه فونت ۱۰ و bold باشند.
- شماره صفحه: پایین وسط با اندازه 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 با سه خط افقی رسم شود (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).
- اندازه 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 اندازه فونت ۱۱ Bold علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با اندازه فونت ۸ نازک نوشته شوند.
- مرجع نویسی در متن:
- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003).
- منابع با دو نگارنده: نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, ۲۰۰۱).
- منابع با بیش از دو نگارنده: تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al* (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (et 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:

- بخش منابع علمی تحت عنوان References قید شده و تماماً به صورت انگلیسی ذکر شوند. عبارت (In Persian.) حتماً برای مقالات فارسی ذکر شود.
- بدون شماره بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و نیم سانی متر تورفتگی داشته باشند.
- عنوان مجلات کامل نوشته شوند.
- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده اند به جای ذکر سال از عبارت (Inpress) استفاده شود.
- تمامی منابع به زبان انگلیسی باشد.

نشریات:

الف) با یک نویسنده:

Wilson, R.G.J.)1981(. Weed control in established dryland Alfalfa) *Medicago sativa*). Weed science, 29: 615-618.

ب) با دو نویسنده:

Pline, W.A. and Wilcut, J.W. (2007). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Agriculture Food and Chemistry, 50: 506–512.

ج) با بیش از دو نویسنده:

Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998). Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posremergrnce herbicides. Weed Technology, 3: 424-428.

د) بهتر است سایت به عنوان مرجع مورد استفاده قرار نگیرد ولی در صورت اضطرار حتماً تاریخ مشاهده و دسترسی ذکر شود.

کتاب

الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، حرف اول نام(سال انتشار)نام کتاب. تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات.

ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، نام کتاب، تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک است و سپس شهر محل انتشار.

Ahrens, W.H. (1994). Herbicide Handbook. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America 224 Pp. losAngeles.

ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود.

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

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

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

Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005). Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – Peroxidase activity of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World 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/Projectsummary.htm>. Accessed August 23, 2001.

-استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه html 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. ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی برمیزان کاهش مایکوتوکسین زیرالنون
فاطمه آدمی قمصری، مریم تاج آبادی ابراهیمی*، مریم باقری ورزنه، علیرضا ایرانبخش، عباس اخوان سپهی ۷
۲. بررسی اثرات پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بر رشد، ترکیب بدن و بیان ژن‌های رشد و اشتها فیل ماهی (*Huso huso*)
محمودرضا ابراهیم‌نژادعربی، سیدمهدی حسینی‌فرد*، رضا چنگیزی، صابر وطن‌دوست و شایان قبادی..... ۲۸
۳. هیپرگلوبولینمی و افزایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز میزبانان واسط آلوده به انگل زئونوتیک *لینگواتولا سراتا*
علیرضا البرزی*، ماندانا حسینی، سمیه بهرامی، مسعود قربانپور، محمدرضا تابنده ۴۴
۴. مدلسازی مطلوبیت زیستگاه غاز پیشانی سفید (*Anser albifrons Scopoli*, 1769) در ایران
فاطمه بیگلری قوچان عتیق، آریتا فراشی*، میترا شریعتی نجف‌آبادی..... ۶۰
۵. بررسی و مقایسه اثر پرایمر در ارزیابی ساختار جوامع باکتریایی خاک مناطق نیمه خشک با روش Illumina Miseq
مریم تیموری، پریسا محمدی*، عادل جلیلی، رقیه زارعی ۷۸
۶. ژئوبوتانی جنس *Onosma* L.(Boraginaceae) در بخش میانی زاگرس مرکزی: رویکرد حفاظتی
فرزانه خواجه‌نوبی نسب، احمدرضا محرابیان*، محمدجواد نیکجویان ۹۷
۷. اثر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دویا به رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای
الهه ریاضی، فرشاد رخشنده‌رو*، وحید عبدوسی..... ۱۳۱
۸. تاثیر عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار (*Polygonum bistorta* L) بر غلظت گلوکز خون موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین
الهام صالحی*، مجید مروتی شریف‌آباد، مهدیه کریمی، مهناز سازی زواره..... ۱۵۴
۹. تاثیر جنسیت، طول و وزن بر تغییرات کیفیت لاشه ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)
مجید محمدنژاد*، رها فدایی راینی..... ۱۶۵
۱۰. اثر چهار هفته ورزش و مکمل دهی اولئوروپین بر رفتارهای اضطراب و افسردگی در مدل حیوانی بیماری پارکینسون
معصومه مکوندی چشمه چنار، عبدالحسن دولاح*، مریم رفیعی راد ۱۷۸

ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی بر میزان کاهش مایکوتوکسین زیرالنون

فاطمه آدمی قمصری،^۱ مریم تاج آبادی ابراهیمی^{۲*}، مریم باقری ورزنه،^۳

علیرضا ایرانبخش،^۴ عباس اخوان سپهری^۵

چکیده

مقدمه: زیرالنون یکی از مهمترین و فراوانترین سموم قارچی است که باعث آلودگی مواد غذایی و خوراک دام و طیور شده و آسیب‌های جدی به انسان و دام وارد می‌کند. پژوهش حاضر به بررسی اثر جاذب آلی حاوی چهار سویه لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) بومی ایران و دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر کاهش مایکوتوکسین زیرالنون پرداخته است. **روش ها:** با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (*high-performance liquid chromatography* یا *HPLC*) اثر عوامل مختلف و هم‌افزایی سویه‌ها مورد سنجش قرار گرفت. **نتایج و بحث:** بر اساس نتایج، جاذب آلی بررسی شده می‌تواند مایکوتوکسین زیرالنون را جذب کرده و مقدار آن را در نمونه کاهش دهد. همچنین جاذب حرارت دیده و فعال در محیط کشت بهترین جذب را داشتند. بررسی ارزیابی هم‌افزایی سویه‌ها نیز کاهش بیشتر سم نسبت به هریک از سویه‌ها به تنهایی را نشان داد. بنابراین، جاذب آلی مورد مطالعه جهت کنترل و کاهش آلودگی مایکوتوکسین زیرالنون پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، جذب، دیواره سلولی مخمر، سموم، لاکتوباسیلوس

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول: M.tajabadi@iauctb.ac.ir)

۳. استادیار، گروه کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST)، تهران، ایران

۴. استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی متابولیت‌های سمی هستند که توسط برخی قارچ‌ها تولید می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها در صورت بلعیده شدن غذای آلوده به این سموم، به اندام‌های انسان و حیوان نیز آسیب می‌رسانند (Kemboi *et al.*, 2020). در کشورهای در حال توسعه، بیش از ۴/۵ میلیارد نفر در معرض سطح بالایی از آلودگی غذایی به مایکوتوکسین قرار دارند (Hassan *et al.*, 2015). عوامل مختلفی در بروز و شدت علائم آلودگی با سموم قارچی در دام نقش دارد. از عمده‌ترین عواملی که دخیل هستند می‌توان به مقدار سم، مدت زمانی که حیوان در معرض آن سم قرار دارد، جنس و گونه و نژاد حیوان، وضعیت فیزیولوژیکی حیوان (آبستنی، سن، بیماری، استرس و غیره)، جیره‌ی مورد استفاده، وضعیت مواد مغذی موجود در آن و وجود سموم قارچی در خوراک اشاره نمود. آفلاتوکسین (aflatoxin)، زیرالنون (zearalenone)، داکسی‌نیوالنول (deoxynivalenol)، فومونیسین (fumonisin) و اکراتوکسین (ochratoxin) مهمترین مایکوتوکسین‌های کشاورزی هستند. از آنجا که سموم قارچی ترکیباتی با ماهیت پیچیده هستند و به دلیل سمیت زیاد و فراوانی در غلات و محصولات غذایی یکی از خطرناک‌ترین سموم برای سلامتی انسان و حیوانات به خصوص دام و طیور محسوب می‌شوند (Franco *et al.*, 2011) لذا باید به نحوی در مزارع مدیریت شوند که مضرات اقتصادی ناشی از آنها به حداقل برسد (Galvano *et al.*, 2001; Whitlow, 2005; Binder, 2007).

زیرالنون (zearalenone) با مخفف ZEA و نام دیگر F2-toxin نیز شناخته می‌شود. این سم یک متابولیت ثانویه است که توسط قارچ‌های جنس فوزاریوم (*Fusarium*) از جمله *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. roseum*، *F. moniliforme*، *F. oxysporum*، *F. semitectum*، *F. equiseti* و *F. crookwellense* تولید می‌شود. این قارچ‌ها در محصولات کشاورزی مانند ذرت، برنج، گندم، جو، کنجد، جو دوسر و سویا رشد می‌کنند و در انواع خوراک دام و طیور حضور دارند. قارچ *Fusarium graminearum* عمده‌ترین قارچ مولد مایکوتوکسین زیرالنون است و در سطح جهان به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماریزای قارچی غلات و حبوبات شناخته شده است که خسارات زیادی به صنعت کشاورزی وارد می‌کند (Kabak *et al.*, 2006).

مایکوتوکسین زیرالنون دارای فعالیت استروژنی قوی است و در حیوانات عوارضی مانند کاهش مصرف خوراک، کاهش تولید شیر، افزایش سلول‌های پیکری شیر (somatic cell count)، درد شکم، تورم غدد پستانی، آتروفی تخمدان، سقط جنین، مرده‌زایی، تورم و عفونت واژن، پرولاپس واژن و رکتوم، کاهش مقدار هورمون لوتئینی و پروژسترون و تغییر مورفولوژی بافت رحم، کاهش میل جنسی، آتروفی بیضه، کاهش کیفیت اسپرم، بروز صفات جنسی ماده در حیوانات جوان نر به علت کاهش ترشح تستوسترون و ناباروری را ایجاد می‌کند (Coppock *et al.*, 1990; Towers *et al.*, 1995; Whitlow, 2005; Gaskill, 2008).

آلودگی خوراک و مواد غذایی با میکوتوکسین‌ها یک مسئله مهم ایمنی خوراک است که منجر به ضرر اقتصادی زیادی می‌شود. در نتیجه، روش‌های مختلفی برای کاهش و کنترل آلودگی قارچی وجود دارد. بطور کلی عوامل سم‌زدایی را می‌توان به دو گروه مختلف تقسیم کرد: (۱) جاذب‌ها (۲) اصلاح‌کننده‌های میکوتوکسین. این دو گروه نحوه عملکرد متفاوتی دارند. جاذب‌های میکوتوکسین، سم را در روده جذب می‌کنند، در نتیجه با اتصال جاذب به سم، کمپلکس سم-جاذب تشکیل شده، سم غیر فعال می‌گردد و از دستگاه گوارش خارج می‌شود. در حالی که اصلاح‌کننده‌های میکوتوکسین، سم را به متابولیت‌های غیر سمی و یا با سمیت کمتر تبدیل می‌کنند (He & Zhou, 2010; Devreese et al., 2014).

یکی از بهترین روش‌ها برای کاهش و کنترل آلودگی قارچی خوراک و مواد غذایی، استفاده از میکروارگانیسم‌ها است. چرا که بدون استفاده از مواد شیمیایی مضر و محدودیت‌ها و مشکلاتی که سایر روش‌ها دارند، استفاده از میکروارگانیسم‌ها بعنوان جاذب آلی، با حفظ ارزش غذایی مواد غذایی و خوراک‌های آلوده، برای کاهش و حذف میکوتوکسین‌ها روش مناسبتری است (Armando et al., 2012). با توجه به توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد برخی قارچ‌ها، جذب و حذف چندین میکوتوکسین از جمله سم زیرانون، این باکتری‌ها می‌توانند نامزدهای خوبی برای کنترل زیستی آلودگی قارچی خوراک باشند (Franco et al., 2011). باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها می‌تواند در جهت بهبود ایمنی خوراک به دلیل توان بالقوه آنها در کاهش سطح آلودگی میکوتوکسین‌ها استفاده شوند (Haskard et al., 2001). فعالیت اتصال باکتری‌های اسید لاکتیک به میکوتوکسین‌ها را می‌توان به عنوان معیاری در انتخاب پروبیوتیک‌ها در نظر گرفت. پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان و پروتئین‌های لایه خارجی دیواره سلولی از عوامل شناخته شده اتصال به میکوتوکسین‌ها هستند (Niderkorn et al., 2009; Piotrowska, 2014).

پژوهش حاضر به بررسی کاهش آزمایشگاهی میکوتوکسین زیرانون توسط جاذب آلی حاوی چند سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بومی ایران و جدا شده از محصولات لبنی و تخمیری و دیواره سلولی مخمر با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف و همچنین ارزیابی اثر هم‌افزایی سویه‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (high-performance liquid chromatography یا HPLC) پرداخته است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد مطالعه، شامل (*Lactobacillus brevis* TD10، *Lactobacillus brevis* TD4 (IBRC-10790)، (*Lactobacillus paracasei* TD3 (IBRC-10781)، (*Lactobacillus casei* T2 (IBRC-10783) و (*Saccharomyces cerevisiae* 10784) بومی ایران و دیواره سلولی مخمر تهیه شده از شرکت تک ژن زیست می‌باشد.

آماده‌سازی جاذب آلی

یک گرم پودر منجمد شده‌ی هر یک از چهار سویه لاکتوباسیلوس (نگهداری پودر در یخچال 4°C) در شرایط استریل به ظروف شیشه‌ای حاوی ۱۵ ml محیط کشت MRS broth استریل با pH خنثی به طور جداگانه اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 گرماگذاری شدند. از دیواره سلولی مخمر نیز سوسپانسیونی با غلظت نهایی $150\text{ }\mu\text{g/ml}$ تهیه گردید.

بررسی میزان کاهش سم زیرالنون توسط لاکتوباسیلوس‌های فعال در محیط کشت MRS broth

مقدار ۱ ml از کشت فعال شده هر باکتری بطور جداگانه در ۱۰ ml محیط کشت MRS broth استریل تخلیق شد. پس از گرماگذاری (گرمخانه شیکردار 37°C ، ۱۲۰ rpm) و رسیدن به غلظت نهایی 10^9 cfu/ml ، سم زیرالنون (cas no:17924-92) (۴ خریداری شده از شرکت Merck آلمان، (نگهداری در فریزر -20°C) با غلظت اولیه ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر (part per billion) یا ppb)، معادل با حد مجاز این سم در خوراک دام به نمونه‌های فوق اضافه شد (Karlovsky *et al.*, 2016). برای باکتری برتر با بیشترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، جذب در غلظت دو برابر حد مجاز سم (۱۰۰۰ ppb) مورد بررسی قرار گرفت (Karlovsky *et al.*, 2016).

محیط MRS broth بدون باکتری حاوی هر دو غلظت سم نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌ها پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری (گرمخانه شیکردار 37°C ، ۱۲۰ rpm) در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت سانتریفوژ شدند (5°C ، ۲۰ min، $14000\times\text{g}$). سپس مایع رویی نمونه‌ها پس از سانتریفوژ و عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر جمع آوری و مقدار سم باقی مانده در محیط توسط HPLC اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد منفی شامل یک گرم پودر باکتری‌ها (هر کدام جداگانه) در ۱۰ ml محیط کشت MRS broth تهیه و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد.

بررسی میزان کاهش سم زیرالنون توسط جاذب آلی حرارت دیده و حرارت ندیده در محلول

بافرسفات سالین (phosphate buffered saline یا PBS)

مقدار ۱۰ ml از کشت فعال شده هر باکتری بطور مجزا سانتریفوژ (5°C ، ۲۰ min، $14000\times\text{g}$) شدند. سپس رسوب سلولی هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه با غلظت نهایی 10^9 cfu/ml به ۱۰ ml محلول PBS استریل اضافه و سم زیرالنون با غلظت

اولیه ۵۰۰ ppb به نمونه‌های فوق اضافه گردید. میزان جذب و کاهش سم در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

جهت بررسی نمونه‌های حرارت دیده، رسوب سلولی هر یک از باکتری‌ها در دمای 121°C به مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند و پس از رسیدن به دمای محیط با غلظت نهایی 10^9 cfu/ml به ۱۰ ml محلول PBS استریل اضافه و سم زیرالنون با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb به نمونه‌های فوق افزوده گردید. برای باکتری با بهترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، جذب در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) مورد بررسی قرار گرفت.

از دیواره سلولی مخمر سوسپانسیونی با غلظت $150 \mu\text{g/ml}$ در محلول PBS استریل تهیه شد و تحت شرایط فوق الذکر اتوکلاو شد. سپس سم زیرالنون با غلظت‌های فوق و به طور مجزا به سوسپانسیون اضافه گردید. محلول PBS استریل حاوی غلظت ذکر شده از سم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

تمام نمونه‌های فوق پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری (37°C ، ۱۲۰ rpm)، در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت، سانتریفیوژ شدند (5°C ، ۲۰ min، $14000 \times g$). سپس مایع رویی پس از عبور از فیلتر سرنگی $0.22 \mu\text{m}$ میکرومتر جمع آوری و مقدار سم باقی مانده در محیط توسط HPLC سنجش گردید.

بررسی اثر هم‌افزایی باکتری‌های جاذب بر میزان کاهش سم زیرالنون

دو سویه لاکتوباسیلوس با بهترین جذب در محلول PBS و محیط کشت MRS broth به منظور تجزیه و تحلیل اثر هم‌افزایی آنها بر میزان کاهش سم زیرالنون به طور جداگانه انتخاب شدند.

L. brevis TD4 و *L. paracasei* TD3 به محلول PBS و *L. brevis* TD4 و *L. brevis* TD10 به محیط کشت MRS broth، با غلظت نهایی 10^9 cfu/ml اضافه شدند. سپس سم زیرالنون با غلظت ۵۰۰ ppb به نمونه‌های فوق اضافه گردید. سوسپانسیون تمام نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (گرماخانه شیکردار دمای 37°C ، ۱۲۰ rpm). نمونه‌ها تحت شرایط یکسان سانتریفیوژ شدند (5°C ، ۲۰ min، $14000 \times g$). مایع رویی پس از سانتریفیوژ در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت جمع آوری و میزان سم باقی مانده در نمونه توسط دستگاه HPLC سنجیده شد.

تعیین میزان سم زیرالنون توسط HPLC

جهت ارزیابی میزان سم باقی مانده در نمونه‌ها از سیستم HPLC مجهز به آشکارساز Gilson 151 UV-Vis. نرم افزار Gilson 712 (Middleton Inc. Gilson) و ستون C18 (۲۵۰×۴/۶ mm, ۵ °C) استفاده شد. فاز متحرک شامل ترکیب استونیتریل (با درجه HPLC، مرک آلمان) و آب دو بار تقطیر با نسبت (v/v) ۵۵:۴۵ تهیه شد و دستگاه در حالت ایزوکراتیک با سرعت جریان ۱ ml/min و دمای ستون ۳۰ °C تنظیم شد. تزریق با حجم ۵۰ μl و تشخیص سم زیرالنون در طول موج ۲۳۶ nm انجام گردید (Vega et al., 2017).

منحنی استاندارد

منحنی استاندارد سم زیرالنون بر اساس رقت‌های متوالی صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ ppb و از طریق تزریق سه تکرار به دستگاه HPLC رسم شد و معادله خط با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد.

اعتبارسنجی روش HPLC

جهت محاسبه دقت روش (Precision)، غلظت ۵۰۰ ppb از محلول استاندارد سم زیرالنون تهیه و اندازه‌گیری شش بار در یک روز (intra-day) و در سه روز متوالی (inter-day) انجام شد. سپس انحراف استاندارد نسبی (RSD) بر اساس معادله ۱ مربوطه محاسبه گردید.

$$RSD (\%) = \frac{\text{انحراف معیار}}{\text{میانگین}}$$

معادله ۱)

در بررسی حساسیت (sensitivity)، حد تشخیص یا LOD (Limit of Detection) و حد تعیین مقدار یا LOQ (Limit of Quantification) تعیین شد. LOD، کمترین غلظتی است که در یک ماتریکس قابل تشخیص است ولی به دقت قابل اندازه‌گیری نیست و LOQ، کمترین غلظتی است که با دقت و صحت قابل قبول، قابل اندازه‌گیری است. به این منظور، با استفاده از رقت سریال محلول‌های استاندارد سم، LOD و LOQ بر اساس معادلات ۲ و ۳ محاسبه شد که در آن STEYX معادله بازگرداندن خطای استاندارد Y پیش بینی شده به ازای هر X در منحنی استاندارد و Slope شیب خط معادله محاسبه شده بر اساس غلظت‌های مختلف سم است.

$$LOD = 3.3 \times \left(\frac{STEYX}{Slope} \right)$$

معادله ۲)

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{STEYX}{Slope} \right)$$

معادله ۳)

همچنین محدوده بازیافت (Recovery) از محلول‌های حاوی غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ از سم استاندارد بر اساس معادله ۴ بدست آمد:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{مقدار اندازه گیری شده پس از اضافه کردن سم استاندارد}}{\text{مقدار اولیه اندازه گیری شده سم در نمونه} + \text{مقدار اضافه شده از سم استاندارد}} \times 100$$

معادله ۴)

همچنین طبق معادله ۵، میزان جذب و کاهش سم نسبت به مقدار اولیه محاسبه و تعیین گردید (Vega et al., 2017).

$$\text{درصد جذب} = 100 - \left(\frac{\text{عدد سطح زیر پیک نمونه (area)}}{\text{عدد سطح زیر پیک شاهد (area)}} \times 100 \right)$$

معادله ۵)

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار GraphPad Prism 6 استفاده گردید. مقایسات بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون t جفت شده و آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین شد.

نتایج و بحث

کنترل و کاهش آلودگی قارچی خوراک دام و طیور و مواد غذایی در سراسر دنیا بسیار با اهمیت است. به این منظور در بین انواع روش‌های موجود، روش بیولوژیکی، به طور ویژه استفاده از ارگانسیم‌ها می‌تواند مناسب و موثر باشد.

هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی آزمایشگاهی اثر جاذب آلی شامل *Lactobacillus casei* T2 (IBRC-10783)

Lactobacillus brevis TD4، *Lactobacillus brevis* TD10 (IBRC-10781)، (IBRC-10790)

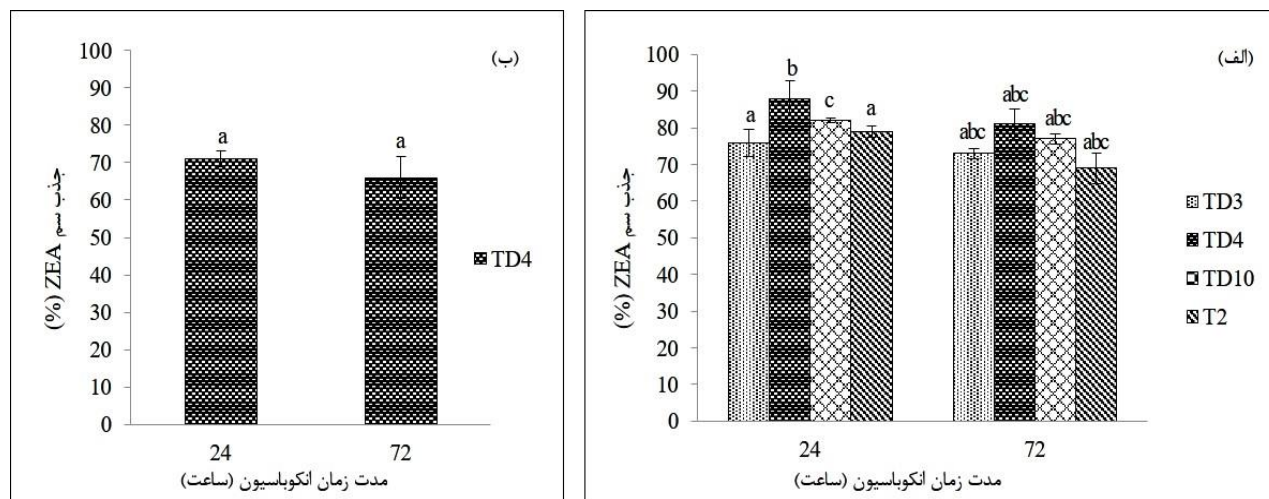
Lactobacillus paracasei TD3 (IBRC-10784) بومی ایران جدا شده از محصولات لبنی و تخمیری و دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* می‌باشد. اثر هم‌افزایی باکتری‌های مذکور با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف مانند مدت زمان گرماگذاری (صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت)، حالت جاذب (زنده، حرارت دیده و فعال) و غلظت سم (۵۰۰ ppb و ۱۰۰۰ ppb) بر میزان جذب و کاهش مایکوتوکسین زیرالنون، با استفاده از روش HPLC بررسی گردید.

نتایج مقدار کاهش سم زیرالنون و میزان جذب

بهترین جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb سم (معادل با حد مجاز خوراک دام) در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری به ترتیب با میزان ۸۸ و ۸۱ درصد توسط *L.brevis* TD4 مشاهده شد (شکل ۱. الف).

در بررسی غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb معادل با دو برابر حد مجاز خوراک دام) نیز میزان کاهش سم توسط *L.brevis* TD4 پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری به ترتیب ۷۰ و ۶۵ درصد بدست آمد. در هر دو غلظت اولیه و دو برابر سم، با گذشت زمان انکوباسیون، اختلاف معنی‌داری در میزان جذب سم توسط هر یک از سویه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱. ب).

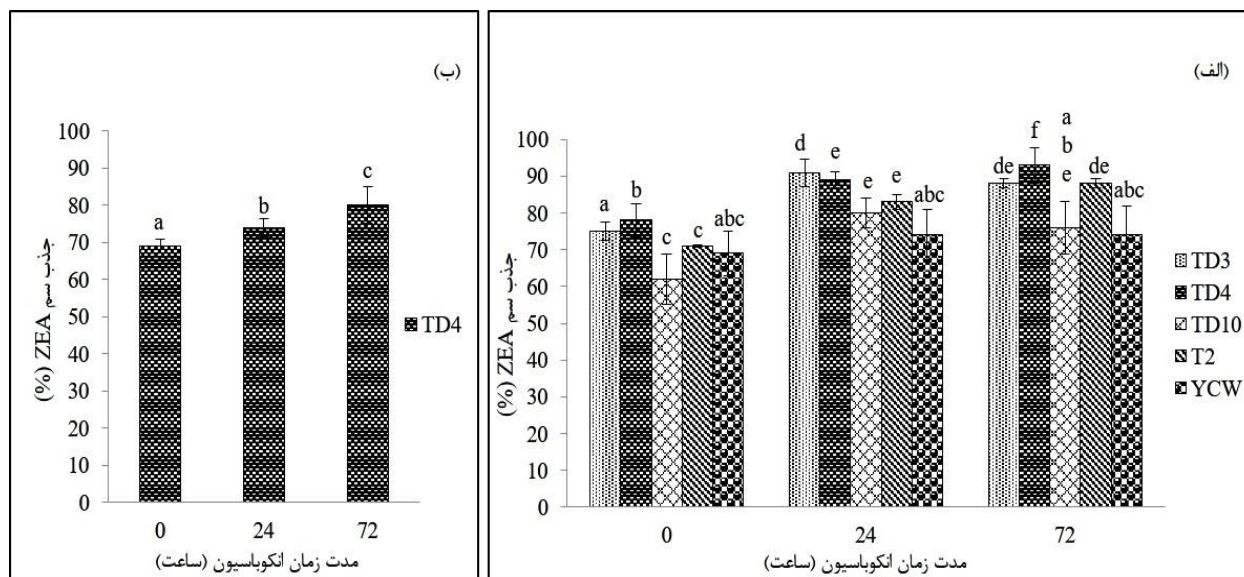
در تحقیق حاضر، ارزیابی مدت زمان گرماگذاری بعنوان پارامتر مهم در میزان جذب و کاهش سم زیرالنون نشان داد که بیشترین میزان کاهش سم توسط سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری می‌باشد که در زمان ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با زمان ۲۴ ساعت نشان نداد. در هر دو غلظت اولیه و دو برابر سم، با گذشت زمان انکوباسیون، اختلاف معنی‌داری در میزان جذب سم توسط هر یک از سویه‌ها مشاهده نشد. بررسی دو سویه باکتری اسید لاکتیک در محیط کشت MRS broth حاوی سم زیرالنون، پس از گرماگذاری در فواصل زمانی صفر تا ۱۲۰۰ دقیقه و سنجش میزان سم باقی مانده در محیط نشان داد که این سویه‌ها قادر به جذب و کاهش معنی‌دار سم مذکور بودند. بیشترین میزان کاهش سم زیرالنون در محلول PBS و نیز در محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (Zou et al., 2012; Vega et al., 2017; Król et al., 2018) که با نتایج تحقیق حاضر در توافق است.



شکل ۱- الف) نمودار مقایسه‌ی میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های فعال (سویه‌های TD3, TD4, TD10, T2) در محیط کشت MRS broth در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. ب) میزان کاهش سم توسط *L. brevis* سویه TD4 در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

Figure 1. A) The comparative chart of the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the active bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) in MRS broth medium for 24 and 72 hr incubation time. B) The reduction of toxin with twice concentration (1000 ppb) by *L. brevis* TD4 for 24 and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

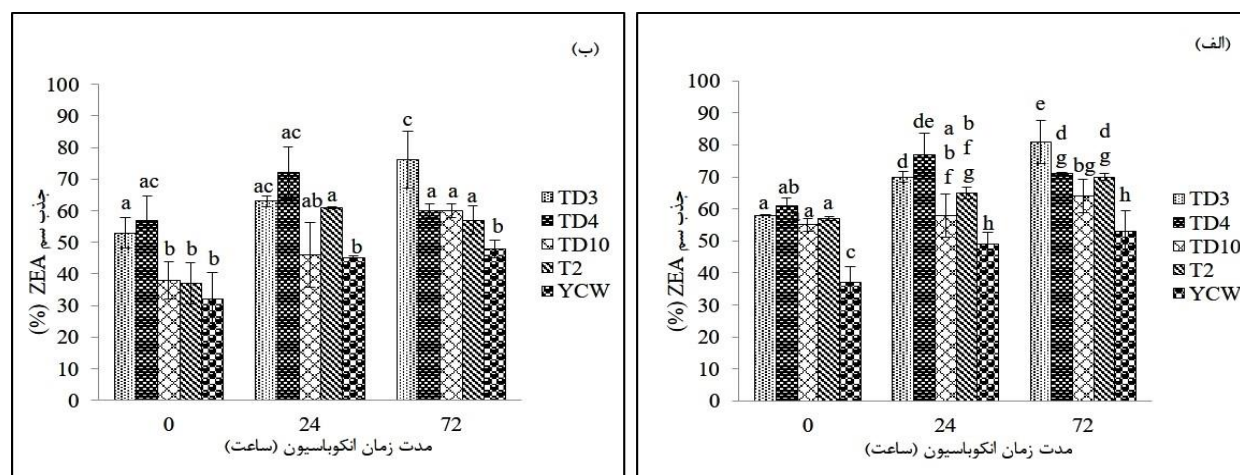
جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سویه‌های کشته شده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت دیده، با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb نشان داد *L. brevis* TD4 در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت به ترتیب با میزان ۷۸ و ۹۳ درصد و *L. paracasei* TD3 در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری با میزان جذب ۹۱ درصد، بهترین میزان کاهش سم را نسبت به سایرین داشتند (شکل ۲. الف). میزان جذب در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) توسط *L. brevis* TD4 بعنوان سویه برتر با بهترین میزان کاهش سم در غلظت اولیه، در صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۹ درصد، ۷۳ درصد و ۷۷ درصد بدست آمد (شکل ۲. ب). در هر دو غلظت اولیه و دو برابر سم در بین سویه‌های کشته شده، در سویه TD4 با افزایش زمان انکوباسیون میزان جذب بطور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت.



شکل ۲- الف) نمودار مقایسه‌ی زمان گرماگذاری بر میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های کشته شده (سویه‌های TD3, TD4, TD10, T2) و دیواره سلولی مخمر (YCW) حرارت دیده در محلول PBS. ب) میزان کاهش سم توسط *L. brevis* TD4 در غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

Figure 2. A) The comparative chart of the incubation time with adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the killed bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) and the heated yeast cell wall (YCW) in PBS solution. B) The reduction of toxin with twice concentration (1000 ppb) by *L. brevis* TD4 for 0, 24, and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$).

بهترین جذب و کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده در محلول PBS با غلظت اولیه سم ۵۰۰ ppb در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت گرماگذاری به ترتیب با میزان ۶۱ و ۷۷ درصد توسط *L. brevis* TD4 و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری توسط *L. paracasei* TD3 با میزان ۸۱ درصد مشاهده شد (شکل ۳. الف). (Piotrowska (۲۰۱۴) و Chlebicz & Ślizewska (۲۰۲۰)، میزان سم‌زدایی زیرالنون را توسط باکتری اسید لاکتیک و مخمر *S. cerevisiae* با روش HPLC بررسی کردند و کاهش غلظت سم در محلول PBS توسط باکتری‌ها و مخمر را پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری نشان دادند. در بررسی غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb) نیز میزان کاهش سم توسط *L. brevis* TD4 در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب با میزان ۵۸ درصد، ۷۲ درصد و ۵۷ درصد و نیز توسط *L. paracasei* TD3 در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۳ درصد، ۶۳ درصد و ۷۶ درصد بدست آمد که اختلاف معنی‌داری در میزان جذب توسط TD3 بین زمان صفر و ۷۲ ساعت ($P < 0.05$) مشاهده شد (شکل ۳. ب).



شکل ۳- الف) نمودار مقایسه‌ی میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb توسط باکتری‌های زنده (سویه‌های TD3 TD4, TD10, T2 و دیواره سلولی مخمر (YCW) حرارت ندیده در محلول PBS در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعته گرماگذاری. ب) غلظت دو برابر سم (۱۰۰۰ ppb). حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

Figure 3. A) The comparative chart of the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb by the live bacteria (T2, TD10, TD4, and TD3 strains) and unheated yeast cell wall (YCW) in PBS solution for 0, 24, and 72 hr incubation time. B) The twice concentration (1000 ppb) of toxin. The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

در مطالعه حاضر، میزان کاهش سم زیرالنون توسط سویه‌های کشته شده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده در محلول PBS به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از سویه‌های زنده لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده مشاهده شد که ممکن است به سبب تغییر شکل دیواره سلول و نیز افزایش اندازه منافذ دیواره و در نتیجه جایگیری بهتر سم در بین اجزای دیواره و کاهش بیشتر سم در محلول باشد. بیشترین کاهش سم توسط سلول‌های زنده و کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس در محلول PBS در زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری مشاهده شد که با زمان ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت اما هر دو زمان نسبت به زمان صفر معنی‌دار ($P < 0.05$) بودند که می‌تواند به دلیل پایداری اتصال کمپلکس جاذب-سم باشد. بنابراین مشاهده گردید مدت زمان گرماگذاری در میزان جذب سم توسط جاذب اثر دارد. با افزایش مدت زمان گرماگذاری میزان کاهش سم افزایش یافته است بطوری که پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری میزان کاهش سم بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از صفر ساعت گرماگذاری بدست آمد. در حالی که میزان کاهش سم زیرالنون توسط سلول‌های کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس در محلول PBS با سلول‌های فعال سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بدست نیامد. بنابراین بهترین میزان کاهش سم، توسط سویه‌های کشته شده و فعال در محیط کشت مشاهده شد.

سه باکتری *L. plantarum*، *L. brevis* و *L. sanfranciscensis* غیرفعال شده با حرارت میزان کاهش بیشتری از مایکوتوکسین اکراتوکسین A را در محلول PBS نسبت به سلول‌های زنده دارند؛ به طوری که این اتصال تا حدی برگشت پذیر است که می‌تواند به دلیل خاصیت آگریز بودن دیواره سلولی باکتری‌های مذکور باشد (Piotrowska, 2014). همچنین در مطالعه Čvek و همکارانش (۲۰۱۲)، سلول‌های کشته شده سویه‌های لاکتوباسیلوس توانایی بیشتری برای کاهش سم زیرالنون نسبت به سلول‌های زنده در محلول PBS و فعال در محیط کشت نشان دادند.

مهمترین اجزاء دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک عبارتند از زنجیره پپتیدوگلیکان، پلی‌ساکارید و پروتئین‌ها (Haskard et al., 2001; Niderkorn et al., 2006). این اجزاء دیواره سلولی عمدتاً وظیفه چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک به سموم را به عهده دارند (Hathout & Aly, 2014). Niderkorn و همکاران (۲۰۰۹)، Hathout & Aly (۲۰۱۴) و Piotrowska (۲۰۱۴)، ایجاد پیوند بین ترکیبات کربوهیدراتی بویژه گلوکان، پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان، پروتئین، اسید تیکوئیک و بخش‌های آب‌گریز دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک با بخش‌هایی از مایکوتوکسین که از نظر ساختمانی مناسب اتصال است را عامل جذب آن بیان نمودند. بر اساس مطالعه Niderkorn و همکارانش (۲۰۰۹)، با حذف پپتیدوگلیکان در باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله *L. lactis*، اتصال به مایکوتوکسین فومونیسین انجام نمی‌گیرد که این امر در مورد سایر مایکوتوکسین‌ها نیز می‌تواند صدق کند. این اجزا در اوایل چرخه رشد باکتری‌ها سنتز می‌شود در حالی که اتصال در مرحله تأخیر مشاهده شد. به علاوه بیشترین میزان اتصال در پایان مرحله نمایی از چرخه رشد بدست آمد.

غیرفعال شدن توسط حرارت تأثیر زیادی بر توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در حذف مایکوتوکسین دارد (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Franco et al., 2011). پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک همچون *Lactobacillus rhamnosus* توانایی اتصال و کاهش سم زیرالنون در شرایط آزمایشگاهی را دارند (Haskard et al., 2001; Niderkorn et al., 2006; Garcia et al., 2018). *L. acidophilus* CIP 76.13T سلول‌های *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP 101027 و *B1*، اکراتوکسین A و داکسی‌نیوالنول از محیط کشت MRS broth و محلول PBS در طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ °C را دارند. صرف نظر از محیط، سلول‌های غیرفعال در اثر حرارت، به طور قابل توجهی سبب کاهش بیشتر مایکوتوکسین نسبت به سلول‌های زنده شدند. نتایج حاصل از این یافته‌ها حاکی از آن است که استفاده از سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جهت کاهش آلودگی ناشی از مایکوتوکسین‌ها در صنعت خوراک می‌تواند امکان‌پذیر باشد (Ragoubi et al., 2021).

L. plantarum و *L. lactic* *L. brevis* *L. casei* می‌توانند میکوتوکسین زیرالنون را در محیط کشت MRS broth

در دمای °C ۳۷ و پس از مدت زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری کاهش دهند. باکتری‌های تیمار شده با حرارت در مقایسه با سلول‌های زنده در محلول PBS قادر به حذف میزان بیشتری از سم هستند (Zou et al., 2012). *Lactobacillus paracasei* جدا شده از کشت آغازگر خمیر ترش قادر به کاهش و سم‌زدایی سم زیرالنون از طریق اتصال سطحی و تجزیه آنزیمی از محیط مایع است (Hassan et al., 2015).

در پژوهش حاضر، میزان کاهش سم زیرالنون توسط دیواره سلولی مخمر حرارت ندیده و حرارت دیده در محلول PBS در صفر ساعت به ترتیب ۳۷ و ۶۹ درصد، در ۲۴ ساعت ۴۹ درصد و ۷۴ درصد و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری ۵۳ و ۷۴ درصد مشاهده شد. دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* مورد بررسی، جذب قابل توجهی از سم زیرالنون را دارد که احتمالاً به دلیل ماهیت ساختاری و ترکیبات موجود در دیواره است که می‌تواند به همراه سویه‌های لاکتوباسیلوس در میزان جذب بیشتر و بهتر سم مؤثر باشد. در مطالعه حاضر، مقایسه‌ی میزان جذب و کاهش سم زیرالنون توسط دیواره سلولی حرارت دیده و حرارت ندیده نشان داد که حرارت اثر معنی‌داری در جذب سم داشته است؛ بطوری که میزان کاهش سم توسط دیواره سلولی مخمر حرارت دیده بطور معنی‌داری، بیشتر از دیواره سلولی حرارت ندیده است. اتصال مخمر *S. cerevisiae* به میکوتوکسین زیرالنون به شرایط فیزیولوژیکی و محیطی مانند سطح آبگریزی دیواره سلول مرتبط است و بهترین جذب پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (Kregiel et al., 2012) که با نتایج حاصله در پژوهش حاضر مطابقت دارد. دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* در شرایط آزمایشگاهی، توانست سم زیرالنون را در خوراک آلوده جذب کند (Kurochkina & Krasnoshtanova, 2020).

بتا گلوکان و مانان دیواره‌ی سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به جذب و کاهش میکوتوکسین زیرالنون است (Liu et al., 2021). اتصال مشابه با باکتری‌های اسید لاکتیک در مخمر *S. cerevisiae* نشان داده شده است. بتا گلوکان دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به اتصال به سم زیرالنون بوده و سم موجود در محیط را کاهش می‌دهد (Shetty & Jespersen, 2006).

پدیده‌ی اتصال میکوتوکسین آفلاتوکسین، یک پدیده‌ی فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می‌افتد. که از طریق اتصال (کلاته کردن) به مولکول‌های آفلاتوکسین و حذف آن از دستگاه گوارش انجام می‌شود. پلی‌ساکاریدها و مانوالیگوساکارید استخراج شده از دیواره‌ی سلولی مخمر *S. cerevisiae* قادر به جذب آفلاتوکسین بوده بدون اینکه تغییری در ساختارش ایجاد شود. Yiannikouris و همکارانش (۲۰۰۶)، نشان دادند که B-(1,3and1,6)-D-glucans قسمت‌های جدا شده در دیواره سلولی مخمر که بوسیله عصاره‌گیری قلیایی به دست آمده قادرند زیرالنون را با تمایل بیش از ۵۰ درصد جذب نماید.

در چندین تحقیق پیرامون بررسی دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* بعنوان اتصال دهنده مایکوتوکسین، میان‌کنش بین β -D-glucans و مایکوتوکسین ZEA عامل اتصال بیان شده است. نتایج بدست آمده از روش 1H-NMR نشان داد که پیوندهای شیمیایی همچون پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی در اتصال و جذب دیواره سلولی مخمر به ZEA نیز نقش دارند (Yiannikouris *et al.*, 2004a, b, 2006).

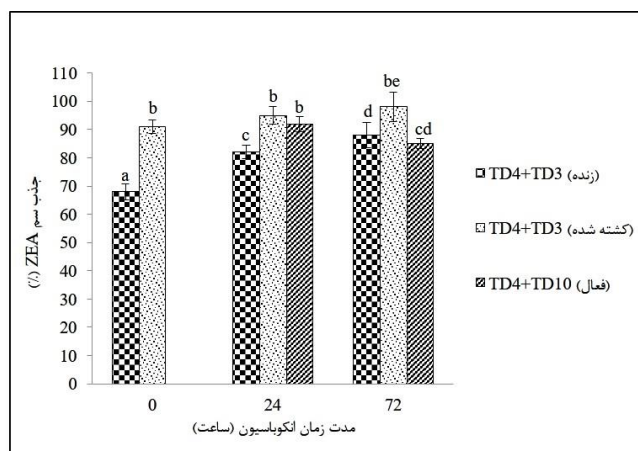
مانوپروتئین‌ها، گلوکان، پروتئین‌های لایه خارجی دیواره سلولی مخمر پویا بوده و در اتصال به مایکوتوکسین نقش دارند. تفاوت در کربوهیدرات دیواره سلولی و محتوای کیتین در بین سویه‌های مخمر در میزان اتصال با اهمیت است (Niderkorn *et al.*, 2009). تعادل بین گروه‌های قطبی و آبگریز موجود در دیواره سلولی مخمر و مایکوتوکسین سبب اتصال می‌گردد. همچنین ساختار سه بعدی اجزای دیواره سلولی مخمر به ویژه D-glucans، شباهت مولکولی هندسی اتصال دهنده و سم، فعل و انفعالات آگریزی بین واحدهای گلوکز در یک مارپیچ واحد در D-glucans و ZEA بعنوان عامل کلیدی در بازده جذب است (Freimund *et al.*, 2003).

در مطالعه حاضر، بررسی اثر غلظت سم زیرالنون بعنوان یک پارامتر مهم دیگر در میزان جذب نشان می‌دهد سویه‌های لاکتوباسیلوس و دیواره سلولی مخمر قادر به جذب و کاهش قابل توجهی از سم در غلظت بالاتر (دو برابر حد مجاز خوراک دام) هستند. اگر چه با افزایش غلظت سم میزان جذب کاهش غیر معنی‌داری یافت.

بررسی پارامترهای مختلف نشان می‌دهد که میزان جذب و کاهش مایکوتوکسین‌ها به عوامل مختلفی از جمله غلظت سم، مدت زمان گرماگذاری، نوع جاذب، محیط و غلظت جاذب بستگی دارد (Čvek *et al.*, 2012). اگر چه مکانیسم سم‌زدایی مایکوتوکسین‌ها بطور کامل مشخص نشده است اما می‌توان از طریق دو عامل تجزیه و یا غیرفعال شدن سم توسط جاذب‌ها توضیح داده شوند. میزان تمایل اتصال باکتری‌های اسید لاکتیک و دیواره سلولی مخمر به عنوان جاذب مایکوتوکسین‌ها به سموم با یکدیگر متفاوت است که می‌تواند به دلیل اختلاف در ساختمان شیمیایی و سایر خصوصیات مایکوتوکسین‌ها باشد (Franco *et al.*, 2011; Čvek *et al.*, 2012).

با مقایسه میزان کاهش سم توسط باکتری‌ها، دو سویه با بهترین میزان جذب و کاهش سم در هر محیط، جهت بررسی اثر هم‌افزایی انتخاب شدند. در این بررسی، میزان کاهش سم زیرالنون توسط ترکیب دو سویه TD3 و TD4 به حالت زنده در محلول PBS در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۷ درصد، ۸۲ درصد و ۸۸ درصد مشاهده شد. میزان جذب ترکیب دو سویه TD3 و TD4 به حالت کشته شده در صفر ساعت ۹۰ درصد، در ۲۴ ساعت ۹۳ درصد و در ۷۲ ساعت ۹۸ درصد بدست آمد. ترکیب دو سویه TD4 و TD10 به حالت فعال در محیط کشت MRS broth در ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۹۷ درصد و ۹۵ درصد

بهترین جذب را نشان دادند (شکل ۴). در ارزیابی اثر هم‌افزایی باکتری‌ها در تحقیق حاضر، مشاهده شد ترکیب دو باکتری *L. TD3* و *paracasei* و *L. brevis* TD4 در محلول PBS و *L. brevis* TD4 و *L. brevis* TD10 در محیط کشت MRS broth میزان بیشتری از سم زیرالنون را در مقایسه با هر یک از باکتری‌ها به تنهایی کاهش دادند. بنابراین می‌توان گفت دو باکتری اثر یکدیگر را در جذب و کاهش سم زیرالنون تقویت کردند. در ترکیب دو سویه TD3 و TD4 زنده در محلول PBS با افزایش زمان انکوباسیون میزان جذب بطور معنی‌داری افزایش یافت. علاوه بر ترکیب دو سویه کشته شده TD3 و TD4 پس از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون، بیشترین میزان جذب را نشان دادند ($P < 0.05$). ترکیب سویه‌های لاکتوباسیلوس مطالعه حاضر بر میزان جذب سم زیرالنون پیش‌تر توسط محققین مورد ارزیابی قرار نگرفته است. ترکیب سه سویه *L. fermentum*، *L. reuteri* و *L. plantarum* جهت ارزیابی میزان جذب آفاتوکسین B1 و اکراتوکسین A موجود در ذرت آلوده، افزایش جذب و کاهش بیشتر سموم را نسبت به هریک از سویه‌ها به تنهایی نشان دادند (Zielińska & Fabiszewska, 2017).



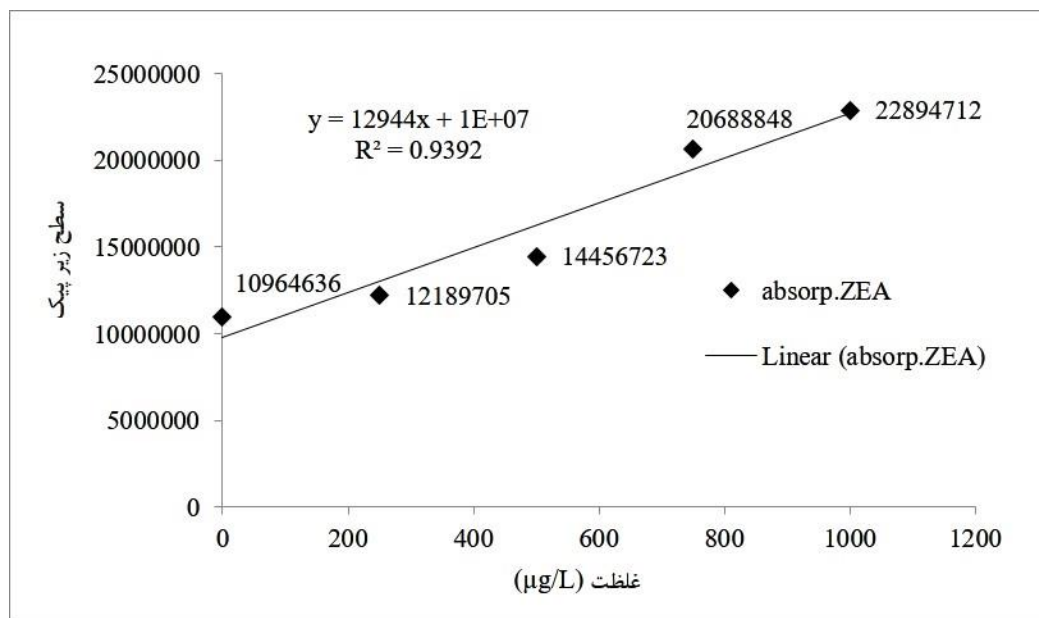
شکل ۴- نمودار مقایسه‌ای اثر هم‌افزایی سلول‌های زنده *Lactobacillus brevis* سویه TD4 و *Lactobacillus paracasei* سویه TD3 در محلول PBS و سلول‌های فعال *Lactobacillus brevis* سویه TD4 و TD10 در محیط کشت MRS broth بر میزان جذب و کاهش سم ZEA با غلظت اولیه ۵۰۰ ppb در مدت زمان صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت گرماگذاری. حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

Figure 4. The comparative chart of the synergistic effect of the live cells of *Lactobacillus brevis* TD4 and *Lactobacillus paracasei* TD3 in PBS solution and the synergistic effect of the active cells of *Lactobacillus brevis* TD4 and TD10 in MRS broth medium on the adsorption and reduction of ZEA toxin with initial concentration of 500 ppb for 0, 24, and 72 hr incubation time. The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$).

باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک از جمله لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یک استراتژی پاکسازی و یا کنترل ارزان، ایمن و امیدوار کننده پیشنهاد شده است که می‌تواند با کاهش آلودگی مایکوتوکسین‌ها امنیت و سطح کیفیت مواد غذایی را بهبود بخشند (Zielińska & Fabiszewska, 2017). استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک بعنوان پروبیوتیک و نیز به عنوان کنترل کننده زیستی آلودگی‌های قارچی خوراک حیوانات و انسان، می‌تواند مفید باشد (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Franco et al., 2011).

معتبرسازی روش HPLC

منحنی استاندارد برای پنج غلظت صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ ppb از سم زیرالنون رسم شد و معادله خط بدست آمد (شکل ۵). در مطالعه حاضر، عرض از مبدا بالای به دست آمده ناشی از صفر نبودن سیگنال است، اگر چه در زمان انجام آزمایش عواملی همچون کالیبره بوده دستگاه، صفر بودن دستگاه دتکتور و دقت در تهیه غلظت‌های استاندارد بررسی شده است. از طرف دیگر صفر نبودن سیگنال برای همه نمونه‌های مورد بررسی یکسان بوده و در منحنی کالیبراسیون جهت محاسبه کلیه نتایج منظور شده است.



شکل ۵- نمودار استاندارد مایکوتوکسین زیرالنون

Figure 5. The calibration curve of zearalenone mycotoxin

ضریب همبستگی (R^2) سم زیرالنون به میزان 0.9392 به دست آمد. محاسبه دقت روش (Precision) به وسیله معیار تکرارپذیری در یک روز (intra-day) و در سه روز متوالی (inter-day) انجام شد. در ارزیابی دقت روش، انحراف معیار نسبی (RSD) سم زیرالنون در یک روز و در سه روز متوالی به ترتیب 3.05 و 5 درصد محاسبه شد. مقادیر LOQ و LOD برای سم زیرالنون به ترتیب $116/13$ ppb و $38/32$ ppb و محدوده بازیافت (Recovery) $85-110$ درصد به دست آمد.

نتیجه گیری کلی

در مطالعه حاضر، ارزیابی توانایی جذب مایکوتوکسین زیرالنون توسط چند سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بومی ایران از جمله *L. brevis* TD10 (IBRC-M10781) *L. brevis* TD4 (IBRC-M10790) *L. casei* T2 (IBRC-M10783) *L. paracasei* TD3 (IBRC-M10784) و دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* به روش HPLC نشان می دهد که این جاذب آلی با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف قادر به کاهش مایکوتوکسین زیرالنون بوده و می تواند به عنوان یک جاذب مایکوتوکسین برای کنترل و کاهش مایکوتوکسین زیرالنون استفاده شود و جهت بررسی اثر بخشی آن در خوراک دام آزمایشات درون تنی در دام پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه دوره دکترای تخصصی میکروبیولوژی مصوب و دفاع شده در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر عبدالامیر قدکساز برای حمایت و مشاوره مفید اعلام دارند.

منابع

- Aguilar-Uscanga, B. and François, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology, 37: 268-274.
- Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C.A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcero, A.M. and Cavaglieri, L.R. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. Journal of Applied Microbiology, 113: 256-264.
- Binder, E.M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Anim Feed Sci Technol, 133: 149-166.

- Chlebicz, A. and Ślizewska, K. (2020). In Vitro Detoxification of Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fumonisin, T-2 Toxin and Zearalenone by Probiotic Bacteria from Genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12: 289-301.
- Coppock, R., Mostrom, M., Sparling, C., Jacobsen, B. and Ross, S. (1990). Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Veterinary and Human Toxicology*, 32: 246-248.
- Čvek, D., Markov, K., Frece, J., Friganović, M., Duraković, L. and Delaš, F. (2012). Adhesion of zearalenone to the surface of lactic acid bacteria cells. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 7: 49-52.
- Devreese, M., Antonissen, G., De Backer, P. and Croubels, S. (2014). Efficacy of active carbon towards the absorption of deoxynivalenol in pigs. *Toxins*, 6: 2998-3004.
- Franco, T.S., Garcia, S., Hirooka, E.Y., Ono, Y.S. and dos Santos, J.S. (2011). Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J Appl Microbiol*, 111: 739-748.
- Freimund, S., Sauter, M. and Rys, P. (2003). Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *Journal of environmental science and health*, 38:243-255.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A. and Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of food protection*, 64: 120-131.
- Garcia, S.O., Feltrin, A.C.P. and Garda-Buffon, J. (2018). Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35: 1819-1831.
- Gaskill, C. (2008). Veterinary toxicology—basic and clinical principles. *The Canadian Veterinary Journal*, 49: 591.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2001). Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 67: 3086-3091.
- Hassan, Y.I., Zhou, T. and Bullerman, L.B. (2015). Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International*, 22: 79-90.
- Hathout, A.S. and Aly, S.E. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*, 64: 905-919.
- He, J. and Zhou, T. (2010). Patented techniques for detoxification of mycotoxins in feeds and food matrices. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 2: 96-104.
- Kabak, B., Dobson, A.D. and Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46: 593-619.
- Karlovsy, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I.P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T. and Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32: 179-205.
- Kemboi, D.C., Antonissen, G., Ochieng, P.E., Croubels, S., Okoth, S., Kangethe, E.K., Faas, J., Lindahl, J.F. and Gathumbi, J.K. (2020). A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. *Toxins*, 12: 222.
- Kregiel, D., Berłowska, J. and Ambroziak, W. (2012). Adhesion of yeast cells to different porous supports, stability of cell-carrier systems and formation of volatile by-products. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28: 3399-3408.

- Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., Walczak, J. and Buszewski, B. (2018). Microbiology neutralization of zearalenone using *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium* sp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410: 943-952.
- Kurochkina, A.S. and Krasnoshtanova, A.A. (2020). Study of the sorption capacity of soluble forms of yeast beta-glucan. *Butlerov Communications*, 63: 43-50.
- Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S.A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y. and Wang, Y. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International journal of biological macromolecules*, 173: 445-456.
- Nafezi, m., Tajabadi Ebrahimi, m. and Eidi, m. (2015). Investigation of the Probiotic effect of Iranian Native *Lactobacillus paracasei* against Toxicity Induced by Aflatoxin B1 in vivo. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 18: 72-80.
- Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D. P. (2006). Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 849-856.
- Niderkorn, V., Morgavi, D. P., Aboab, B., Lemaire, M and Boudra, H. (2009). Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 977-985.
- Piotrowska, M. (2014). The adsorption of ochratoxin a by *Lactobacillus* species. *Toxins (Basel)*, 6: 2826-2839.
- Ragoubi, C., Quintieri, L., Greco, D., Mehrez, A., Maatouk, I., D'Ascanio, V., Landoulsi, A. and Avantaggiato, G. (2021). Mycotoxin Removal by *Lactobacillus* spp. and Their Application in Animal Liquid Feed. *Toxins (Basel)*, 13.
- Shetty, P.H. and Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in food science & technology*, 17: 48-55.
- Towers, N., Sprosen, J. and Webber, W. (1995). Zearalenone metabolites in cycling and non-cycling cows: In: *A Toxinology and Food Safety*. Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand.
- Vega, M.F., Dieguez, S.N., Riccio, B., Aranguren, S., Giordano, A., Denzoin, L., Soraci, A.L., Tapia, M.O., Ross, R., Apás, A. and González, S.N. (2017). Zearalenone adsorption capacity of lactic acid bacteria isolated from pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48: 715-723.
- Whitlow, L., 2005. Molds and mycotoxins in feedstuffs—Prevention and treatment. *Proceedings—Florida Ruminant Nutrition Symposium*, pp. 123-142.
- Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., François, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G. and Jouany, J.P. (2006). Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -d-Glucans. *Biomacromolecules*, 7:1147-1155.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J.P. (2004a). Alkali Extraction of β -d-Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3666-3673.

- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J.P. (2004b). Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67:1195-1200.
- Zielińska, K.J. and Fabiszewska, A.U. (2017). Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34: 9.
- Zou, Z.-Y., He, Z.-F., Li, H.-J., Han, P.-F., Meng, X., Zhang, Y., Zhou, F., Ouyang, K.-P., Chen, X.-Y. and Tang, J. (2012). In vitro removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 21: 1677-1683.

In vitro evaluation of the effect of the organic adsorbent on the reduction of mycotoxin Zearalenone

F. Adami Ghamsari,¹M. Tajabadi Ebrahimi^{*},²M. Bagheri Varzaneh,³

A. Iranbakhsh,⁴A. Akhavan Sepahi⁵

Received: 2021.03. 12

Accepted: 2021.08.24

Abstract

Zearalenone (ZEA) is one of the most important and abundant fungal toxins that cause contamination of food and feed of livestock and poultry as well as serious damage to humans and livestock. The present study investigated the effect of organic adsorbent containing four strains of native Lactobacillus and the yeast cell wall of Saccharomyces cerevisiae on the reduction of the ZEA mycotoxin. Using high-performance liquid chromatography (HPLC), the effects of different factors including incubation time, temperature, as well as synergism of the strains were measured. Based on the obtained results, the investigated organic adsorbent can adsorb the mycotoxin ZEA and reduce its amount in the sample. Also, the heated and culture medium activated adsorbents possessed the best absorption. Evaluation of synergistic strains showed a greater reduction of the toxin than each strain alone. Therefore, the studied organic adsorbent is proposed to control and reduce mycotoxin ZEA contamination.

Keywords: Adsorption, Lactobacillus, Probiotic, Toxins, Yeast cell wall

¹PhD Graduate, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Associate professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran ^{*}(corresponding author: M.tajabadi@iauctb.ac.ir)

³Assistant professor, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

⁴Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵Associate professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Teheran, Iran

بررسی اثرات پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بر رشد، ترکیب بدن و بیان ژن‌های رشد و اشتها فیل ماهی (*Huso huso*)

محمودرضا ابراهیم‌نژادعربی^۱، سیدمهدی حسینی‌فرد^{۲*}، رضا چنگیزی^۳، صابر وطن‌دوست^۲، شایان قبادی^۲

چکیده

مقدمه: این تحقیق با هدف بررسی اثرات افزایش پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بر فاکتورهای رشد، مقدار کپی برداری ژن‌های IGF، GH و گرلین، و ترکیب بدن فیل ماهی (*Huso huso*) انجام شد. تعداد ۸۴۰ قطعه بچه فیل ماهی با میانگین وزنی 5 ± 30 گرم در ۱۲ تانک ۲۴۰۰ لیتری با تعداد ۷۰ عدد در هر تانک توزیع شدند و با سطوح مختلف ۰ (شاهد)، ۳۰۰ (تیمار ۱)، ۴۰۰ (تیمار ۲) و ۵۰۰ (تیمار ۳) میلی‌گرم پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره پرورش زیست‌سنجی به منظور ارزیابی فاکتورهای رشد و نمونه‌برداری از بافت مغز، معده و کبد برای ارزیابی بیان ژن‌های مذکور انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان مصرف پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا در جیره، وزن بدن، نرخ رشد ویژه و کارایی پروتئین افزایش یافت و بالاترین مقدار در تیمار ۳ (۵۰۰ میلی‌گرم) بود که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$). همچنین کپی برداری ژن‌های مطالعه شده روند افزایشی را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($P < 0.05$) و بیشترین میزان کپی برداری در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد. در ارتباط با ترکیب شیمیایی بدن نیز کمترین میزان پروتئین در تیمار ۳ بود اما در میزان پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بین شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). به منظور بهبود شرایط رشد فیل ماهی استفاده از ۵۰۰ mg پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی کنجاله کانولا در کیلوگرم جیره غذای پرورشی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، فاکتورهای رشد، فیل ماهی، کنجاله کانولا

۱. دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۲. استادیار گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. (*نویسنده مسؤول: sm_hosseinfard@yahoo.com)

مقدمه

فیل ماهی یکی از مهمترین گونه‌های خانواده بزرگ تاس‌ماهیان است که به دلیل ارزش شمندی گوشت و خاویار از نظر اقتصادی بسیار برای کشور ایران حائز اهمیت است. امروزه به دلیل صید بی‌رویه، کاهش زیستگاه‌های طبیعی، عفونت‌ها و بیماری‌ها و وجود بسترهای آلوده تخم‌ریزی در مسیر رودخانه‌ها، این گونه نیز در میان لیست گونه‌های به شدت در معرض خطر قرار گرفته است (Ahmdifar *et al.*, 2011). غذا یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده در افزایش موفقیت آبی‌پروری است که بخش عمده‌ای از هزینه‌های مزارع پرورش را شامل می‌شود. بنابراین استفاده از یک جیره غذایی متعادل و مناسب که هم نیاز غذایی آبزیان را تامین کند و هم از هزینه‌های اجرایی کارگاه پرورش بکاهد امری بسیار مهم تلقی می‌شود. وجود پروتئین، مواد معدنی، ویتامین‌ها و مواد انرژی‌زا در جیره غذایی برای رشد، تولیدمثل و دیگر عملکردهای فیزیولوژیک ضروری است (Webster & Lim, 2002).

پروتئین یکی از مهمترین و گران‌ترین مواد مغذی موجود در جیره بوده که نقش به‌سزایی در افزایش رشد دارد همچنین کیفیت گوشت تولید شده تا حد زیادی بستگی به پروتئین مصرفی ماهی دارد. اگرچه افزایش پروتئین جیره باعث بهبود عملکرد رشد می‌شود، هزینه تولید جیره را نیز افزایش می‌دهد (Ahmad, 2008). بنابراین در طول دوره پرورش ماهی تعیین میزان پروتئین مورد نیاز به منظور به دست آوردن بهترین بازده غذایی جهت صرفه‌جویی در هزینه‌ها و کاهش ورود نیتروژن به اکوسیستم آبی، که یکی از مهمترین فاکتورها در مدیریت آبی‌پروری است، امری ضروریست (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010). مشتقات حاصل از دانه‌های روغنی می‌توانند منبع مناسبی برای تامین پروتئین و انرژی غذای آبزیان باشند. افزایش استفاده از پروتئین‌های گیاهی در تغذیه آبزیان می‌تواند هزینه‌های استفاده از آرد ماهی را کاهش دهد (Jayant *et al.*, 2021).

امروزه در بسیاری از نقاط جهان استفاده از کنجاله کانولا به عنوان یک مکمل پروتئینی ارزان قیمت نسبت به سایر منابع پروتئینی گیاهی از جمله سویا و منابع پروتئینی حیوانی در تغذیه دام، طیور و آبزیان مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. کانولا یکی از مهمترین دانه‌های روغنی است که کنجاله آن دومین فرآورده پروتئینی بعد از کنجاله سویا محسوب می‌شود و ۱۳ درصد از تولید جهانی کنجاله‌های پروتئینی (۲۵۳/۲۷ میلیون تن) را به خود اختصاص داده است. علی‌رغم ترکیب پروتئین مناسب کنجاله کانولا برای تغذیه انسان و حیوانات، وجود برخی ترکیبات ضدتغذیه‌ای مانند گلوکوزینولات‌ها، اسید فیتیک، سیناپین و تانن استفاده از این محصول را محدود کرده است (Hernández *et al.*, 2020). روش‌های مختلفی جهت به حداقل رساندن آثار منفی این مواد گزارش شده است که به تازگی هیدرولیز *in vitro* به دلیل کارایی بالا، مقدار آنزیم مصرفی کمتر و چالش در پیش روی ایمنی غذایی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (Carter & Sajjadi, 2011). در سال‌های اخیر با استفاده از علم بیوتکنولوژی تولید فرآورده‌های غذایی که دارای ارزش تغذیه‌ای بوده و سلامت مصرف کننده را تضمین می‌کند، شناخته شده است. یکی از این فرآورده‌ها،

پروتئین هیدرولیز شده است که سبب تولید پپتیدها با وزن ملکولی پایین با قابلیت جذب بالا و محلول در آب خواهد شد. پپتیدها که نخستین بار در سال ۱۸۸۰ میلادی توسط ناگلی به عنوان محرک رشد باکتریایی در یک محیط کشت معرفی شدند، با اندازه کوچک نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای متابولیک موجود زنده ایفا خواهند کرد (Wang et al., 2017). هیدرولیز پروتئین سبب تولید پپتیدهایی می‌شود که دارای وزن ملکولی متفاوت هستند و قابلیت جذب و انحلال بیشتری در آب دارند از این رو می‌توانند سبب بهبود عملکرد رشد و تقویت سیستم ایمنی شوند (Ovissipour et al., 2012). گرلین یک پپتید محرک اشتها در معده است که اخیراً شناسایی شده و به لیست پپتیدهای تنظیمی دستگاه گوارش اضافه شده است. این هورمون محرکی برای رهاسازی هورمون رشد و افزایش اشتهاست همچنین دارای نقش‌های متعدد فیزیولوژیکی دیگر است که مهم‌ترین فاکتور برای تنظیم ترشح گرلین، تغذیه است (Jönsson, 2013). غده هیپوفیز، هورمون رشد را تولید می‌کند که ترشح آن توسط هورمون‌های مترشح‌ه از هیپوتالاموس تنظیم می‌شود. هورمون رشد به گیرنده آن در اندام هدف که عمدتاً کبد است، متصل می‌شود و منجر به ساخت و آزادسازی IGF-I می‌شود. IGF-I آزاد شده، در تنظیم ساخت پروتئین، لیپید، کربوهیدرات، متابولیسم مواد معدنی در سلول‌ها، تمایز و تکثیر سلول‌ها و سرانجام رشد بدن شرکت می‌کند. فعالیت IGF-I توسط گیرنده‌های آن تسهیل می‌شود. بافت‌های مختلف از جمله مغز، عضله، کبد و روده نیز به طور موضعی قادر به تولید IGF-I هستند، ولی اندام اصلی تولیدکننده IGF-I کبد است (Bertucci et al., 2019). هورمون اصلی تنظیم کننده رشد حیوانات، هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولین است. هورمون رشد از غده هیپوفیز می‌تواند با فعالیت مستقیم بر روی بافت هدف از جمله بافت ماهیچه‌ای و استخوان، رشد را تحریک کند (Nebo et al., 2017). با توجه به اینکه IGF-I مسئول نهایی رشد در بدن است، بررسی آن یکی از بهترین روش‌ها برای مطالعات بیولوژیکی رشد است.

هدف از این پژوهش - بررسی اثر پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بر فاکتورهای رشد، ترکیب بدن و بیان ژن‌های GH، Ghrelin و IGF فیل ماهی است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این تحقیق تعداد ۸۴۰ قطعه بچه فیل ماهی (*Huso huso*) از کارگاه تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه و در ۱۲ تانک پرورشی با حجم آب حدود ۲۴۰۰ لیتر با تراکم ۷۰ قطعه در هر تانک با میانگین وزنی 5 ± 30 گرم به سالن پرورش ماهی منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل زدایی با آب نمک ۲ در صد به مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس، غذادهی نشدند. سازگاری اولیه با تراکم ۷۰ عدد ماهی در هر مخزن ۲۴۰۰ لیتری متصل به پمپ

هوا به مدت یک هفته انجام شد. طی این مدت روزانه ۵۰ در صد آب مخازن با آب شهری کلرزدایی شده، تعویض شد و همه روزه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب جهت تامین شرایط اپتیمم اندازه گیری می شد.

طرح آزمایش و مدیریت مخازن

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه تغذیه شده با صفر، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم پروتئین هیدرولیز شده کانولا در کیلوگرم به جیره تجاری، با چرب نمودن سطح جیره با روغن ماهی (به مقدار یکسان برای تمامی جیره ها) اضافه شد (Ostaszewska *et al.*, 2010).

تهیه غذا، مکمل غذا و غذادهی

مکمل غذایی استفاده شده در این آزمایش، پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا بود که از شرکت توسعه و کشت دانه های روغنی تهیه شد و سپس در ۴ سطح ۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، به جیره پایه (شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران) با آغشته کردن سطح جیره با روغن ماهی (به مقدار یکسان برای تمام جیره ها)، اضافه و پس از خشک شدن و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل شد. لازم به ذکر است ماهیان به منظور تصحیح میزان غذا بر اساس بیومس، در ابتدا و انتهای دوره و همچنین در طول دوره آزمایش و در فواصل زمانی ۱۴ روز، زیست سنجی می شدند. غذادهی بر اساس ۵ درصد وزن بیومس زنده موجود در تانک، به صورت دستی انجام می شد. میزان غذای مورد نیاز، هر روز طی ۳ وعده از ساعت ۹ صبح تا ۱۴ در اختیار ماهی ها قرار می گرفت. پس از هشت هفته تغذیه، زیست سنجی نهایی انجام شد و فاکتورهای رشد اندازه گیری شد (Yıldız *et al.*, 2018).

افزایش وزن بدن = وزن نهایی - وزن اولیه

نرخ رشد ویژه = لگاریتم (وزن نهایی - لگاریتم وزن اولیه / طول دوره پرورش) × ۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی = مقدار کل غذای خورده شده / مقدار کل وزن اضافه شده

کارایی پروتئین = مقدار وزن اضافه شده / درصد پروتئین جیره

بقا = تعداد ماهیان بعد از دوره پرورش - تعداد ماهیان ابتدای دوره پرورش

ترکیب شیمیایی لاشه

در پایان دوره آزمایش به منظور آنالیز تقریبی ترکیب لاشه، تعداد ۳ عدد ماهی از هر تانک به طور تصادفی صید و پس از جدا کردن امعاء و احشاء و سر و باله، فیله به دست آمده کاملاً چرخ شد و پس از کدگذاری به فریزر 20°C - منقل شدند. تجزیه شیمیایی ترکیب لاشه بر اساس روش‌های استاندارد AOAC به شرح زیر انجام شد (Yıldız et al., 2018):

رطوبت: با قرار دادن نمونه‌ها در دمای 105°C درجه سانتی‌گراد و توزین آن پس از خشک شدن و رسیدن به وزن ثابت، به مدت ۲۴ ساعت.

پروتئین: میزان ازت کل با استفاده از روش کج‌دال تعیین گردید و با اعمال ضریب $6/25$ مقدار پروتئین محاسبه شد.

چربی: با استفاده از روش سوکسله و از طریق حل کردن چربی در اتر اندازه‌گیری شد.

خاکستر: از طریق سوزاندن نمونه در دمای 550°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و توزین پس از خنک شدن.

نمونه برداری از بافت برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن

تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار بصورت تصادفی انتخاب و ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک (300 میلی‌گرم بر لیتر) بی‌هوش شدند (Mohseni et al., 2014) و پس از آن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل و به سرعت بافت‌های مذکور جمع‌آوری و به داخل تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده شدند. تیوپ‌ها بلافاصله به تانک ازت منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر -80°C نگهداری شدند (Yarahmadi et al., 2014).

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA در مطالعات بیان ژن یکی از حساس‌ترین مراحل انجام کار است که باید با حفظ شرایط استریل و حفظ دمای نمونه‌ها بتوان RNA با کیفیت مناسب استخراج شود. در این آزمایش استخراج RNA براساس روش Awad و همکاران (Awad et al., 2010) توسط ماده هضم‌کننده RNA-Xplus (سینا ژن، ایران) انجام شد.

انجام Real time PCR: در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ 20 میکرولیتر بود. برای ساخت مستر 10 میکرولیتر بافر سایبر گرین، 1 میکرولیتر آغازگر پیش رونده ژن هدف، 1 میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف، $0/2$ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز و $6/4$ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. هر ویال مخصوص PCR، محتوی 2 میکرولیتر cDNA و 18 میکرولیتر مستر بود و مراحل آن در دستگاه، شامل مرحله واسرشت به مدت 10 دقیقه

(۹۵ °C)، مرحله اتصال به مدت ۱۵ ثانیه (۹۵ °C) و مرحله طویل شدن به مدت ۳۰ دقیقه برای ژن های مذکور در دمای ۵۹ °C و همچنین به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ °C انجام شد (Awad et al., 2010).

طراحی پرایمر: طبق جدول ۱ جهت مطالعه بیان ژن از پرایمرهای اختصاصی ژن های هدف و رفرنس که بر اساس توالی های موجود در بانک ژن NCBI طراحی شدند استفاده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای (IGF و Ghrelin و GH) و ژن رفرنس (RPL)

Primer sequencing of IGF, Ghrelin, GH and RPL Gene				
شماره دسترسی	دمای ذوب	طول قطعه (جفت باز)	توالی	نام پرایمر
AB517597.1	59	200	TGTGGCTCTCATGAGGGAT	GH-F
			CTGCATTTTCATCACTTTTCAGG	GH- R
AB512770.1	59	190	GACACGCTTTGTGTGTGGAG	IGF- F
			ACTCGTTCACGATGCCCCCTGTGGTG	IGF- R
AM055940.1	59	210	AAGATGACACGTCGAGATTCAGAA	Ghre-F
			GACCATCTTGTATTGAAAGCATCC	Ghre-R
HQ449564	59	167	GTGGTCAAACCTCCGCAAGA	RPL- F
			GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	RPL- R

تجزیه و تحلیل داده ها

بیان کمی ژن های IGF, Ghrelin و GH با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ توسط نرم افزار اکسل انجام شد (Livak & Schmittgen, 2001). تجزیه و تحلیل داده ها مشتمل بر فاکتورهای رشد، ترکیب بدن و بیان ژن پس از هشت هفته در تابستان ۱۳۹۸ همراه با اتمام عملیات میدانی تحقیق صورت پذیرفت. در این تحقیق از طرح فاکتوریل استفاده شد. در ابتدا نرمال بودن داده ها توسط آزمون کلموگروف- اسمیرنوف بررسی گردید. تجزیه و تحلیل داده ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه one way- ANOVA و مقایسه میانگین بین تیمارها به دلیل معنی دار شدن تفاوت ها در سطوح آزمایش براساس آزمون چند دامنه دانکن انجام شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی فاکتورهای رشد

نتایج به دست آمده از ارزیابی عملکرد رشد حاصل از پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا در جدول شماره ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که میزان وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و کارایی پروتئین در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم پروتئین هیدرولیز شده کانولا مقدار بیشتری داشته که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها و گروه شاهد داشت ($P<0.05$). بین جیره‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P>0.05$) اما این دو گروه با شاهد اختلاف معنی دار است ($P<0.05$). بیشترین ضریب تبدیل غذایی در گروه شاهد و کمترین میزان در تیمار ۵۰۰ میلی گرم بود که اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها داشت ($P<0.05$). میزان بقا نیز با افزایش میزان پروتئین در جیره افزایش یافت.

جدول ۲- نتایج حاصل از سطوح مختلف پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا در جیره

Result for deferent protein level of hydrolyzed canola meal in diet

عملکرد رشد	شاهد	تیمار ۱ (۳۰۰ میلی گرم)	تیمار ۲ (۴۰۰ میلی گرم)	تیمار ۳ (۵۰۰ میلی گرم)	SEM	p-value
وزن اولیه (گرم)	29.98±0.02	29.97±0.05	30.06±0.11	29.81±0.05	0.005	0.89
وزن نهایی (گرم)	278.34±2.89 ^c	294.71±15.13 ^b	301.59±3.69 ^b	321.90±2.15 ^a	0.976	0.00
افزایش وزن (گرم)	248.36±2.90 ^c	264.74±15.08 ^b	271.53±3.68 ^b	292.09±2.16 ^a	0.980	0.01
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	828.23±10.10 ^c	883.21±49.06 ^b	903.29±12.28 ^b	979.62±7.87 ^a	3.391	0.01
ضریب تبدیل غذایی	1.08±0.03 ^a	0.98±0.05 ^b	0.94±0.02 ^b	0.88±0.01 ^c	0.004	0.00
نرخ رشد ویژه	3.97±0.01 ^c	4.08±0.08 ^b	4.11±0.02 ^b	4.24±0.01 ^a	0.006	0.02
کارایی پروتئین	1.76±0.05 ^c	1.91±0.11 ^b	2.03±0.04 ^b	2.16±0.03 ^a	0.009	0.01
شاخص وضعیت	0.48±0.01 ^a	0.45±0.03 ^{ab}	0.42±0.00 ^{bc}	0.40±0.01 ^c	0.001	0.04
طول کل نهایی	38.60±1.36 ^b	40.28±1.46 ^{ab}	41.33±1.12 ^{ab}	42.89±1.11 ^a	0.097	0.04
بقا (درصد)	98	99	99	100	0.044	0.84

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده معنی دار بودن داده‌ها است

ترکیب شیمیایی بدن

نتایج به دست آمده از آنالیز لاشه طبق جدول شماره ۳ نشان داد که با افزایش مصرف پروتئین در جیره، محتوای پروتئینی لاشه کاهش یافته است اما این کاهش در سطح معنی دار مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین میزان خاکستر، رطوبت و چربی نیز در تیمارها و گروه شاهد باهم اختلاف معنی داری نداشتند ($P>0.05$).

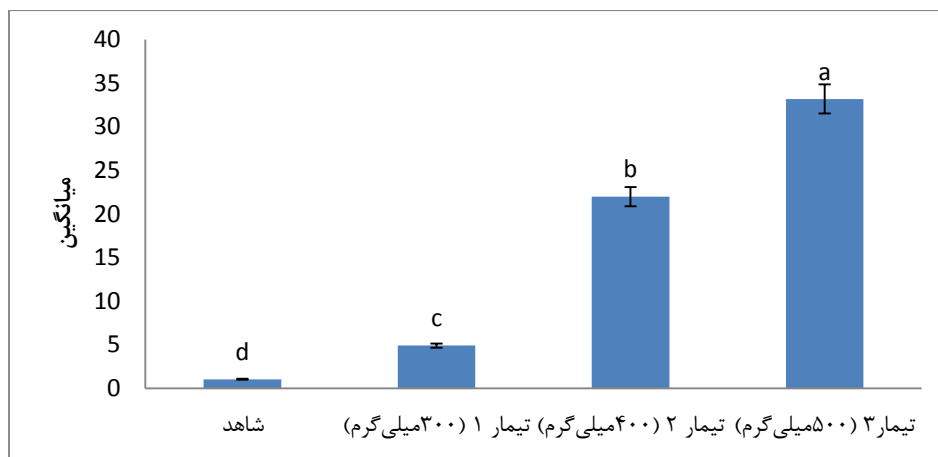
جدول ۳- آنالیز شیمیایی ترکیب لاشه نمونه های آزمایشی

Body composition test						
ردیف	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر	SEM	p-value
شاهد	19.02±0.12	11.48±0.22	65.22±6.32	2.8±0.06	0.015	0.67
تیمار ۱ (۳۰۰ میلی گرم)	18.85±0.21	11.85±0.30	65.73±7.41	2.45±0.03	0.011	0.89
تیمار ۲ (۴۰۰ میلی گرم)	18.97±0.16	11.36±0.39	65.45±7.21	2.13±0.01	0.014	0.45
تیمار ۳ (۵۰۰ میلی گرم)	18.95±0.21	11.89±0.41	65.33±5.63	2.36±0.02	0.003	0.53

عدم نمایش حروف معنی داری نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری می باشد

نتایج به دست آمده از بیان ژن

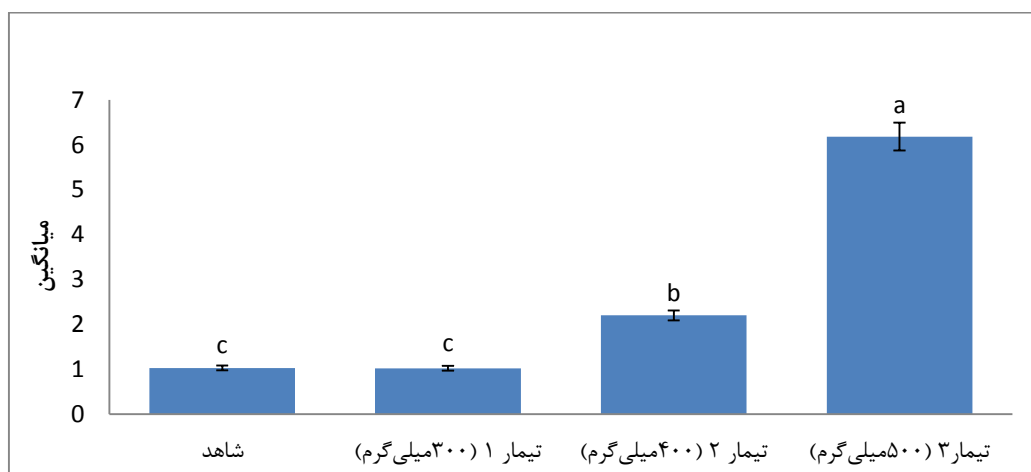
نتایج به دست آمده از بیان ژن گرلین در نمودار ۱ خلاصه شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین میزان بیان این ژن در تیمار ۳ (۵۰۰ میلی گرم) وجود دارد که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها و گروه شاهد دارد ($P<0.05$). نمودار بیانگر روند افزایشی میزان بیان، همراستا با افزایش پروتئین مصرفی در جیره است. کمترین میزان بیان این ژن در گروه شاهد مشاهده می شود.



نمودار ۱- نتایج حاصل از ارزیابی بیان نسبی ژن گرلین

Chart1. Gherlin Gene assessment

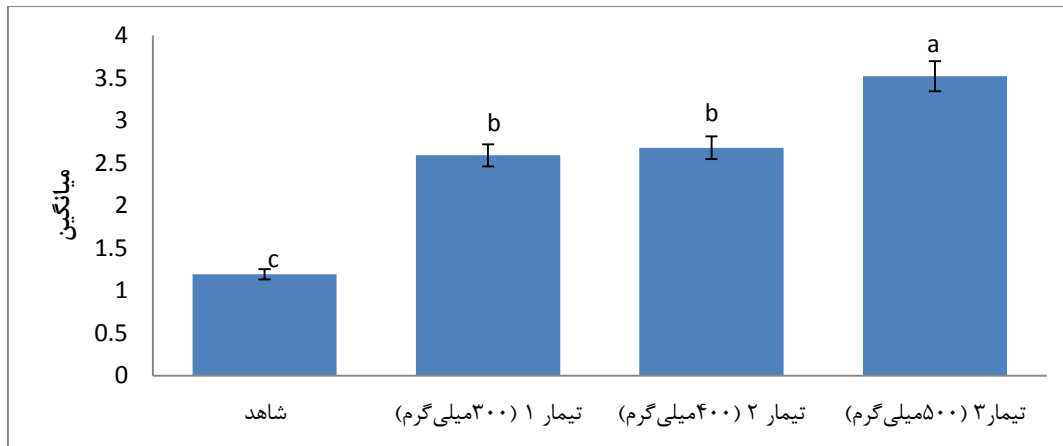
نمودار ۲ نشان دهنده میزان بیان ژن رشد است. بالاترین مقدار بیان نسبی این ژن در گروه ماهیان تغذیه شده با بالاترین سطح پروتئین حاصل از کنجاله کانولا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و گروه شاهد داشت ($P < 0.05$). بین تیمار ۳۰۰ میلی گرم و شاهد اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن رشد وجود نداشت و به‌طور کلی با افزایش میزان مصرف پروتئین در جیره میزان بیان ژن رشد روندی افزایشی نشان داد.



نمودار ۲- نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن رشد

Chart 2. Growth Gene assessment

میزان بیان ژن فاکتور شبه انسولینی در نمودار ۳ خلاصه شده است. مقدار بیان این ژن نیز الگویی مشابه با ژن گرلین و رشد را نشان داد. بالاترین سطح بیان ژن IGF در تیمار ۵۰۰ میلی گرم و کمترین سطح بیان در شاهد بود و بین تیمار ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$).



نمودار ۳- نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن IGF

Chart 3. IGF Gene assessment

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اضافه کردن پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا تاثیر مثبتی بر فاکتورهای رشد و همچنین بیان ژنهای مرتبط با اشتها، رشد و فاکتور شبه انسولینی داشت. به طوریکه بالاترین سطح استفاده از پروتئین (۵۰۰ میلی گرم) بیشترین میزان افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی را نشان داد که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$). فیل ماهی یک گونه گوشتخوار است و لذا جهت انجام فعالیت های آنابولیک (تولید بافت و رشد) و فعالیت های کاتابولیک به پروتئین، چربی و کربوهیدرات احتیاج دارند. در واقع چرخه تولید انرژی از پروتئین از طریق آمین زدایی صورت می گیرد که این امر موجب افزایش ترکیبات آمونیاکی موجود در خون می شود و در نتیجه کاهش کارایی اکسیژن رسانی از خون به بافت ها را به دنبال دارد و روند سوخت و ساز و رشد را تحت تاثیر قرار می دهد (Lemarié et al., 2004). به طور کلی انتظار می رود که استفاده از منابع پروتئین گیاهی به جای منابع پروتئینی دریایی در رژیم غذایی ماهیان گوشتخوار دارای اثرات منفی بر رشد و تغذیه باشد. بنابراین حفظ رشد و کارایی تغذیه با استفاده از عناصر غذایی گیاهی در سطح بالا در ماهیان گوشتخوار امری دشوار است زیرا این منابع در محتوای تغذیه ای تفاوت هایی باهم دارند که ممکن است احتیاجات غذایی گونه را برآورده نکند (Jayant et al., 2021).

پروتئین کنجاله کانولا به عنوان یک جایگزین بالقوه برای آرد ماهی موضوع مورد تحقیق برای بسیاری از پژوهش های انجام شده روی ماهیان گونه گوشتخوار بوده است (Drew et al., 2007, Carter & Sajjadi, 2011, Ngo et al., 2016, Mohammadi et al., 2020). همچنین پروتئین به دست آمده از کانولا یک منبع با کیفیت و قابل دسترس برای جانوران آبی در مقایسه با آرد ماهی تولید شده است و ارزش تغذیه ای کنجاله کانولا بستگی به نسبت آرد ماهی به محتوای روغنی باقیمانده و سطح گلوکوزینولات دارد

(Jayant *et al.*, 2021). در صورت وجود مقادیر زیادی گلوکوزینولات که یکی از عوامل ضد تغذیه‌ای است اثرات نامطلوبی از جمله، عدم تمایل به گرفتن غذا، بزرگ شدن غده تیروئید، کاهش سطح هورمون‌های ترشح شده از تیروئید به پلازما، ناهنجاری‌هایی در اندام‌های کلیه و کبد و حتی مرگ به وجود می‌آید (Collins *et al.*, 2013). گزارشات متعددی در ارتباط با قابلیت هضم و ارزش غذایی کانولا برای گونه‌های مختلف آبزیان وجود دارد. پژوهشی در ارتباط با قابلیت هضم پروتئین کانولا در جیره ماهی باس نواری نشان داد، هنگامی که سطح فیبر، گلوکوزینولات، سیناپین، کربوهیدرات و فیتات در کانولا کاهش پیدا کند قابلیت هضم پروتئین و میزان انرژی افزایش می‌یابد. مقدار بالای پروتئین و مقدار کم عوامل ضد تغذیه‌ای و کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم موجود در پروتئین استخراج شده از کانولا نسبت به گیاه کانولا باعث افزایش قابلیت هضم پروتئین و افزایش رشد در ماهی باس نواری شد (Ramena *et al.*, 2020).

در این مطالعه نیز درجه هیدرولیز پروتئین تاثیر مثبتی در به وجود آوردن دی و تری پپتیدها و متعاقبا بهبود عملکرد رشد داشت. پپتیدها می‌توانند قبل از هیدرولیز شدن به آمینواسید در تنظیم فعالیت آنزیم‌های هضمی و جذب مواد مغذی در روده نقش مهمی ایفا کنند و از این طریق باعث افزایش رشد شوند (Ostaszewska *et al.*, 2010). Gui و همکاران (Gui *et al.*, 2010) بیان داشتند که استفاده از ۱۰ و ۵۰ گرم پروتئین هیدرولیز شده تخم کتان در جیره ماهی کپور باعث بهبود عملکرد رشد، درصد افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی شد، همچنین عنوان کردند که تغذیه ماهیان کپور با مقادیر بالاتر از ۵۰ گرم پروتئین هیدرولیز شده اثرات زیان‌باری را به دنبال نخواهد داشت آن‌ها اظهار کردند که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین به دلیل داشتن وزن ملکولی کمتر از پروتئین قادرند فعالیت بیشتری داشته و با دیگر ترکیبات غذایی واکنش داشته باشند. Collins و همکاران (Collins *et al.*, 2013) بیان کردند که دفع نیترژن در ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پروتئین هیدرولیز شده بالاتر از ماهیانی است که با جیره حاوی آرد ماهی تغذیه شدند و این امر به دلیل سرعت هضم و جذب جیره حاوی پروتئین هیدرولیز شده است که هم می‌تواند روی رشد اثرات مثبتی داشته باشد و هم منجر به افزایش کاتابولیسم آمینو اسیدها و افزایش میزان آن‌ها در پلازما شود. مطالعاتی در ارتباط با جایگزین کردن پروتئین‌های گیاهی در جیره در سطح بهینه به جای آرد ماهی و تاثیر مثبت آن بر عملکرد رشد ماهی انجام شده است در این مطالعات تاکید بسیاری بر جایگزینی تا سطح بهینه شده است چرا که گزار شاتی نیز مبنی بر تاثیر منفی بر عملکرد رشد به هنگام استفاده از پروتئین گیاهی بالاتر از سطح اپتیمم وجود دارد. با افزایش پروتئین جیره مقداری از پروتئین در مسیر تولید انرژی هدر رفته و در نتیجه شاخص‌های رشد را کاهش می‌دهد. زیرا با افزایش سطح پروتئین جیره، آمینو اسیدهای اضافه موجود در غذا به طور مستقیم در بدن ذخیره نمی‌شوند و صرف تولید انرژی می‌گردند. در این تحقیق استفاده از پروتئین کنجاله کانولا باعث بهبود نرخ رشد در فیل ماهی شد. می‌توان چنین اذعان نمود که استفاده از پروتئین کنجاله

کانولا قادر است کمبود هیستیدین و تریپتوفان آرد ماهی را جبران کند به طوریکه این دو ماده به خوبی یکدیگر را تکمیل می کنند. Przybył و همکاران (Przybył *et al.*, 2006) گزارش کردند که جایگزینی آرد ماهی با منبع پروتئین گیاهی (کنجاله کانولا و کنسانتره سویا) در جیره غذایی تاس ماهی استرلیاد می تواند تا ۵۰ درصد پروتئین مورد نیاز جیره را تامین کند. همچنین شغائی پور و همکاران نشان دادند که جایگزین کردن پروتئین کنجاله کانولا به جای آرد ماهی در جیره غذایی ماهی قزل آلا تا سطح ۳۰ درصد هیچ تاثیر منفی بر وزن نهایی و شاخص های رشد ایجاد نکرد. بنابراین استفاده از پروتئین کنجاله کانولا با توجه به قابلیت دسترسی آسان و ارزان تر بودن نسبت به آرد ماهی می تواند جایگزین مناسبی باشد (Shafaeipour *et al.*, 2008).

نتایج به دست آمده از آنالیز لاشه نیز حاکی از این بود که با افزایش سطح مصرف پروتئین هیدرولیز شده در جیره، محتوای پروتئینی بدن کاهش یافته است. با هیدرولیز شدن پروتئین، پپتیدها و آمینواسیدهایی با وزن ملکولی پایین تر از پروتئین بوجود می آیند که می توانند به راحتی با متصل شده به دیگر ترکیبات مغذی غذا در بسیاری از واکنش های تغذیه ای شرکت کنند و محتوای پروتئینی بدن را افزایش دهند اما در این تحقیق با افزایش سطح پروتئین هیدرولیز شده مقدار پروتئین لاشه کاهش یافته که این امر می تواند ناشی از عدم بالانس اسید آمینه های بوجود آمده از هضم و جذب سریع پروتئین جیره باشد (Drew *et al.*, 2007).

GH و IGF از طریق برهمکنش پیچیده ای بین ترکیبات مختلف می توانند نقش مهمی در تحریک رشد داشته باشند. سطوح GH موجود در پلاسما باعث افزایش ترشح IGF کبدی می شود که این امر ارتباط مثبتی با میزان نرخ رشد دارد (Sissener *et al.*, 2013). IGF هورمونی مهم با عملکردهای بیولوژیک متعدد از جمله تنظیم متابولیسم سلولی، تسریع رشد سلول، تقسیم و تمایز سلول، بهبود توسعه جنین، تنظیم رشد و تنظیم فشار اسمزی است. همچنین هورمونی بسیار مهم در رشد و تولیدمثل ماهی محسوب می شود (Delgadin *et al.*, 2018). میزان بیان این هورمون در پرستاناران و پرندگان به تغذیه بستگی دارد در واقع برای ترشح هورمون رشد دو نوع رسپتور GHR-I و GHR-II وجود دارد که رسپتور I نقش اصلی را در ترشح هورمون رشد ایفا می کند و عملکرد این رسپتور در ماهیان گوشتخوار تحت تاثیر تغذیه قرار می گیرد از طرفی نیز نقش اساسی در تنظیم ترشح IGF دارد. میزان بیان GH و IGF و سطح این دو هورمون در پلاسما می تواند تحت تاثیر عواملی از جمله غذاگیری، محتوا و منبع پروتئین و پروفایل اسید آمینه قرار گیرد و متعاقباً رشد را تحت تاثیر قرار دهد (Sissener *et al.*, 2013). بنابراین می توان چنین استنباط کرد که افزایش بیان GH و IGF نیز به طور مستقیم تحت تاثیر مثبت پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا قرار گرفته اند. گرلین تحت تاثیر غده هیپوفیز و مسئول تحریک ترشح هورمون رشد است اگرچه در این تحقیق پروتئین کنجاله کانولا باعث افزایش میزان بیان گرلین شده است. اما نوع مکانیسم اثرگذاری این مکمل بر بیان ژن گرلین هنوز مشخص نیست طبق مطالعه چن و همکاران (Chen *et al.*, 2020) می توان چنین استنباط کرد افزایش گرلین با افزایش هورمون رشد همراه است و همچنین افزایش بیان ژن گرلین

نتیجه افزایش تمایل ماهی به غذاگیری است. چون ترکیباتی همچون ساپونین کانولا که باعث ایجاد مزه تلخ غذا می‌شود کاهش یافته همچنین به دلیل حذف فیبر و فیتات از کانولا نیز میزان خوش خوراکی غذا و به تبع افزایش قابلیت هضم مواد مغذی و بهبود ضریب تبدیل غذایی نیز از اثرات مثبت استفاده از پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا است.

به طور کل از این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از ۵۰۰ mg پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی کنجاله کانولا در کیلو گرم در جیره ماهیان گوشتخوار که به در صد بالایی از پروتئین در جیره غذای خود نیاز دارند می‌تواند بهبود عملکرد رشد را از طریق بیان ژن‌های مرتبط با رشد و اشتها به دنبال داشته باشد. لذا میتوان این عنصر را به عنوان یک ماده مغذی مناسب به پرورش دهندگان ماهی پیشنهاد نمود و به عنوان یک راهکار مناسب و مقرون به صرفه جهت دستیابی به افزایش رشد در ماهیان استفاده شود هر چند ارائه یک نتیجه گیری نهایی در این راستا نیاز به مطالعات گسترده ای در ابعاد گوناگون به ویژه از نقطه نظر فیزیولوژیکی دارد.

منابع

- Abdel-Tawwab, M.; Ahmad, M. H.; Khattab, Y. A. E. and Shalaby, A. M. E. (2010). Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 298(3): 267-274.
- Ahmad, M. (2008). Response of African Catfish, *Clarias gariepinus*, to Different Dietary Protein and Lipid Levels in Practical Diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39: 541-548.
- Ahmdifar, E.; Akrami, R.; Ghelichi, A. and Mohammadi Zarejabad, A. (2011). Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*, 20(5): 447-451.
- Awad, A. M.; Abd El-Hamid, H. S.; Abou Rawash, A. A. and Ibrahim, H. H. (2010). Detection of reticuloendotheliosis virus as a contaminant of fowl pox vaccines. *Poultry Science*, 89(11): 2389-2395.
- Bertucci, J. I.; Blanco, A. M.; Sundarajan, L.; Rajeswari, J. J.; Velasco, C. and Unniappan, S. (2019). Nutrient Regulation of Endocrine Factors Influencing Feeding and Growth in Fish. *Frontiers in endocrinology*, 10: 83-83.
- Carter, C. G. and Sajjadi, M. (2011). Low fishmeal diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using soy protein concentrate treated with graded levels of phytase. *Aquaculture International*, 19(3): 431-444.
- Chen, B.; Xiao, W.; Zou, Z.; Zhu, J.; Li, D.; Yu, J. and Yang, H. (2020). Ghrelin gene single nucleotide polymorphisms and their effects on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth. *Aquaculture Reports*, 18: 100469.
- Collins, S. A.; Øverland, M.; Skrede, A. and Drew, M. D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*, 400-401: 85-100.

- Delgadín, T. H.; Simó, I.; Pérez Sirkin, D. I.; Di Yorio, M. P.; Arranz, S. E. and Vissio, P. G. (2018). *Cichlasoma dimerus* responds to refeeding with a partial compensatory growth associated with an increment of the feed conversion efficiency and a rapid recovery of GH/IGFs axis. *Aquaculture Nutrition*, 24(4): 1234-1243.
- Drew, M. D.; Ogunkoya, A. E.; Janz, D. M. and Van Kessel, A. G. (2007). Dietary influence of replacing fish meal and oil with canola protein concentrate and vegetable oils on growth performance, fatty acid composition and organochlorine residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 267(1): 260-268.
- Gui, D.; Liu, W.; Shao, X. and Xu, W. (2010). Effects of different dietary levels of cottonseed meal protein hydrolysate on growth, digestibility, body composition and serum biochemical indices in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology*, 156(3): 112-120.
- Hernández, C.; Olmeda-Guerrero, L.; Chávez-Sánchez, M. C.; Ibarra-Castro, L.; Gaxiola-Cortez, G. and Martínez-Cárdenas, L. (2020). Nutritional evaluation of canola meal as fish meal replacement for juvenile spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*): Effects on growth performance, hematological parameters, body composition, and nutrient digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 269: 114683.
- Jayant, M.; Sahu, N. P.; Deo, A. D.; Gupta, S.; Rajendran, K. V.; Garg, C. K.; Meena, D. K. and Wagde, M. S. (2021). Effective valorization of bio-processed castor kernel meal based fish feed supplements concomitant with oil extraction processing industry: A prolific way towards greening of landscaping/environment. *Environmental Technology & Innovation*, 21: 101320.
- Jönsson, E. (2013). The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 187: 79-85.
- Lemarié, G.; Dosdat, A.; Covès, D.; Dutto, G.; Gasset, E. and Person-Le Ruyet, J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229(1): 479-491.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. – *Methods* 25: 402-408
- Mohammadi, M.; Imani, A.; Farhangi, M.; Gharaei, A. and Hafezieh, M. (2020). Replacement of fishmeal with processed canola meal in diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Growth performance, mucosal innate immunity, hepatic oxidative status, liver and intestine histology. *Aquaculture*, 518: 734824.
- Mohseni, M.; Pourali, H. R.; Kazemi, R. and Bai, S. C. (2014). Evaluation of the optimum dietary protein level for the maximum growth of juvenile beluga (*Huso huso* L.1758). *Aquaculture Research*, 45(11): 1832-1841.
- Nebo, C.; Overturf, K.; Brezas, A.; Dal-Pai-Silva, M. and Portella, M. C. (2017). Alteration in expression of atrogenes and IGF-1 induced by fasting in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *International Aquatic Research*, 9(4): 361-372.
- Ngo, D. T.; Wade, N. M.; Pirozzi, I. and Glencross, B. D. (2016). Effects of canola meal on growth, feed utilisation, plasma biochemistry, histology of digestive organs and hepatic gene expression of barramundi (Asian seabass; *Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 464: 95-105.
- Ostaszewska, T.; Kamaszewski, M.; Grochowski, P.; Dabrowski, K.; Verri, T.; Aksakal, E.; Szatkowska, I.; Nowak, Z. and Dobosz, S. (2010). The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155(1): 107-114.

- Ovissipour, M.;Safari, R.;Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B. (2012). Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Visceral Protein. Food and Bioprocess Technology, 5(2): 460-465.
- Przybył, A.;Mazurkiewicz, J. and Rożek, W. (2006). Partial substitution of fish meal with soybean protein concentrate and extracted rapeseed meal in the diet of sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology, 22(s1): 298-302.
- Ramena, Y.;Rawles, S. D.;Lochmann, R.;Gaylord, T. G.;McEntire, M. E.;Farmer, B. D.;Baumgartner, W.;Webster, C. D.;Beck, B. H.;Green, B. W. and Barnett, L. M. (2020). Growth, nutrient retention, innate immune response, and intestinal morphology of juvenile, soy-naïve hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M. chrysops* fed commercial-type, soy-based, ideal protein, fish meal replacement diets. Aquaculture, 522: 735150.
- Shafaeipour, A.;YAVARI, V.;Falahatkar, B.;Maremmazi, J. G. and Gorjipour, E. (2008). Effects of canola meal on physiological and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Nutrition, 14(2): 110-119.
- Sissener, N. H.;Hemre, G.-I.;Espe, M.;Sanden, M.;Torstensen, B. E. and Hevrøy, E. M. (2013). Effects of plant-based diets on glucose and amino acid metabolism, leptin, ghrelin and GH-IGF system regulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition, 19(3): 399-412.
- Wang, J.;Yan, X.;Lu, R.;Meng, X. and Nie, G. (2017). Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review. Aquaculture and Fisheries, 2(5): 193-206.
- Webster, C. D. and Lim, C. (2002). Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture, CABI.
- Yarahmadi, P.;Kolangi Miandare, H.;Farahmand, H.;Mirvaghefi, A. and Hoseinifar, S. H. (2014). Dietary fermentable fiber upregulated immune related genes expression, increased innate immune response and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, 41(2): 326-331.
- Yıldız, M.;Eroldoğan, T. O.;Ofori-Mensah, S.;Engin, K. and Baltacı, M. A. (2018). The effects of fish oil replacement by vegetable oils on growth performance and fatty acid profile of rainbow trout: Re-feeding with fish oil finishing diet improved the fatty acid composition. Aquaculture, 488: 123-133.

The effects of hydrolyzed canola meal protein on growth, body composition and expression of growth genes, and appetite of beluga fish (*Huso huso*)

M. Ebrahimnezhadarabi¹, S.M. Hoseinifard^{*}, R. Changizi¹, S. Vatandoust¹, Sh. Ghobadi¹

Received: 19.1.2021

Accepted: 29.6.2021

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of increasing the hydrolyzed protein of canola meal on growth factors, expression of GH, IGF, and ghrelin genes, and body composition of beluga (*Huso huso*) juvenile. For this purpose, 840 juveniles beluga with an average weight of 30 ± 5 grams were distributed in 12 tanks, 70 in each tank. Each tank has a capacity of 2400 liters. Canola meal hydrolyzed protein was fed with different levels of 0 (control), 300 (treatment 1), 400 (treatment 2), and 500 (treatment 3) mg of protein for 8 weeks. At the end of the breeding period, a bioassay was performed to evaluate growth factors and the expression of the genes by biopsy of brain, stomach, and liver tissues. The results showed that with increasing the amount of hydrolyzed protein in the canola meal of the diet, body weight, specific growth rate and protein efficiency increased and the highest value was in treatment 3 (500 mg) which has a significant difference from other groups ($P < 0.05$). Also, the expression of all 3 genes showed an increasing trend and the difference between treatments and the control was significant ($P < 0.05$). The highest expression was observed for all three genes in the 500 mg treatment. Regarding the chemical composition of the body, the lowest amount of protein was in treatment 3, but there was no significant difference in the amount of protein, fat, ash, and moisture between the control and other treatments ($P > 0.05$). In general, hydrolyzed canola protein can positively affect growth performance in beluga fish.

Keywords: Beluga fish, Body chemical composition, Gene expression, Hydrolyzed protein

¹Department of Aquaculture, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

²Department of Veterinary, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. (* Corresponding Author: sm_hosseinifard@yahoo.com)

۱. دانشیار، بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. (*نویسنده مسئول (a.alborzi@scu.ac.ir)
۲. دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی، بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳. دانشیار، بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴. استاد، بخش ایمنی‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۵. دانشیار، بخش بیوشیمی، گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

سراتا در ایران وجود دارد. همچنین این انگل باعث ایجاد تغییرات در پروتئین‌های سرم نشخوارکنندگان کوچک آلوده می‌شود. احتمالاً در آلودگی به این انگل استرس اکسیداتیو ایجاد شده و باعث آسیب به ساختار گویچه قرمز و افزایش ناپایداری اسمزی آن‌ها می‌گردد.

واژه های کلیدی: لینگواتولا سراتا، میزبانان واسط، ناپایداری اسمزی غشا، هیپرگلوبولینمی

مقدمه

لینگواتولا سراتا (*Linguatula serrata*) شبه بندپایی از راسته پنتاستومیدا (Pentastomida) و انگلی زئونوز (Zoonosis) با گسترش جهانی است که اولین بار توسط فرولیچ (Frohlich) در سال ۱۷۸۹ گزارش شد. فرم بالغ این انگل در دستگاه تنفسی و به ویژه حفرات بینی سگ‌سانان (میزبان نهایی) یافت می‌شود. تخم‌ها از طریق ترشحات بینی این حیوانات خارج شده و سپس توسط علفخواران (میزبان واسط) همراه با آب و علوفه بلعیده می‌شوند. لاروها در روده‌ی این حیوانات از تخم خارج شده و به غدد لنفاوی مزانتر، کبد و ریه مهاجرت کرده و به نوچه (nymph) تبدیل می‌شوند (Gjerde, 2013., Shamsi et al., 2017). انسان‌ها می‌توانند به عنوان میزبان واسط و نهایی تصادفی برای این انگل عمل کنند و این بدان معناست که هر دو مرحله لارو و بالغ می‌توانند انسان را آلوده کنند (Koehsler et al., 2011). در انسان، مانند سایر میزبان‌های واسط، انگل به طور عمده در غدد لنفاوی مزانتر زندگی می‌کنند. اما اعضای دیگر مانند کبد، روده، به ندرت مغز، چشم و غدد پروستات نیز ممکن است آلوده شوند (Islam et al., 2018). شایعترین شکل بیماری لینگواتولوز انسان به عنوان سندرم هالزون (Halzoun syndrome) یا سندرم مارارا (Marrara syndrome) شناخته می‌شود که با خوردن نوچه‌های لینگواتولا سراتا موجود در اندام‌های میزبان واسط (به ویژه کبد و یا غدد لنفاوی خام و یا کم پخته) ایجاد می‌گردد و در نتیجه منجر به ایجاد لینگواتولوز نازوفارنژیال (nasopharyngeal) همراه با علائم فارنژیت، ترشح بزاق، دیسفاژی و سرفه می‌شود که همگی این علائم باعث ازدیاد حساسیت نوع I می‌شوند (Razavi et al., Hajipour & Tavassoli, 2019). علاوه بر این انسان‌ها نیز از طریق خوردن تخم انگل همراه با آب و سبزیجات آلوده، به لینگواتولوز احشایی مبتلا می‌شوند (al., 2004). (Anaraki et al., 2008, Siavashi et al., 2002).

با توجه به اینکه نوچه‌ی این انگل ارگان‌های مهمی مانند غدد لنفاوی، کبد و ریه را مورد تهاجم قرار می‌دهد، تصور می‌شود که این انگل با حضور فیزیکی و احتمالاً ترشحات خود بر کارکرد سیستم لنفاوی، خون و بافت‌ها تأثیر بگذارد. یکی از عوامل بیوشیمیایی مهم در سیستم گردش خون، پروتئین‌ها هستند. انگل‌ها با تهاجم به بافت‌های هدف، اختلال در نفوذ پذیری غشاء سلول‌ها و یا با تولید فرآورده‌ها و ترشحات خود به طور مستقیم و یا غیرمستقیم غلظت پروتئین‌های سرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین در

بسیاری از موارد، مکانیسم تغذیه و مهاجرت عوامل انگلی مسئول تغییرات بیوشیمیایی در خون هستند (Qamar & Maqbool, 2012). تقریباً تمام پروتئین‌های سرم به جز ایمونوگلوبولین‌ها توسط سلول‌های کبدی تولید و ترشح می‌شوند (Eckersall, 2008). پروتئین‌ها بر حفظ ساختار اسمزی کلونیدی، تعادل اسید و باز و بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی مؤثر هستند. برخی از آنها به عنوان حامل لیپیدها، هورمون‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی در سیستم گردش خون عمل می‌کنند و در تنظیم فعالیت سلولی و سیستم ایمنی بدن نقش دارند (Anderson & Anderson, 2002). مهمترین پروتئین‌های سرم شامل آلبومین، ایمونوگلوبولین‌ها، هاپتوگلوبین، ترانسفرین و لیپوپروتئین‌ها هستند (Burtis & Ashwood, 2001). هرگونه اختلال در عملکرد یا از دست دادن تعادل در غلظت پروتئین‌های مذکور می‌تواند علت یا نتیجه نوعی بیماری باشد (Pieper *et al.*, 2003).

ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز یکی از مقادیر قابل اندازه‌گیری است که همولیز را تحت فشار هیپواسموتیک تخمین می‌زند. آزمایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز، برای بررسی نفوذپذیری غشا و به عنوان نشانگر زیستی بالقوه برای ارزیابی آسیب‌های اکسیداتیو به غشای این سلول‌ها در شرایط پاتولوژیک استفاده می‌شود (Sharma *et al.*, 2010). با توجه به موارد ذکر شده و همچنین اهمیت تغییرات تابلوی بیوشیمیایی در تشخیص و بیماری زایی آلودگی‌های انگلی، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی فراوانی انگل در استان خوزستان و ارزیابی اثر احتمالی *لینگوتولا سراتا* بر پروتئین‌های سرم و ناپایداری اسمزی گویچه قرمز در میزبانان واسط (گوسفند و بز) انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و بررسی فراوانی انگل

از فروردین تا اسفند ۱۳۹۷، تعداد ۷۹۱ نمونه‌ی خون و غدد لنفاوی مزاتر از گوسفندان (۴۵۶) و بزهای (۳۳۵) کشتار شده در کشتارگاه شهر اهواز (استان خوزستان) جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری در این مطالعه، از حیواناتی انجام شد که سلامت آن‌ها در بازرسی قبل و پس از کشتار تایید شده بود. آلودگی حیوانات با مشاهده‌ی نوچه انگل در غدد لنفاوی مزاتر با استفاده از استریومیکروسکوپ (المپیوس، ژاپن) تایید شد و در نهایت شیوع انگل محاسبه گردید.

۱۵ نمونه‌ی مثبت و ۱۰ نمونه منفی از هر حیوان (گوسفند و بز)، جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند. جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی جدید و یا قدیمی به *لینگوتولا سراتا*، علاوه بر رویت نشدن انگل در غدد لنفاوی، تست هم‌آگلوتیناسیون غیرمستقیم (که در مطالعه‌ی قبلی ما حساسیت و ویژگی خوبی را نشان داد) انجام شد. جهت انجام آزمایش ناپایداری اسمزی گویچه قرمز، خون حیوانات در لوله‌های حاوی K2EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرم نیز به منظور اندازه‌گیری پروتئین‌های سرم با

استفاده از لوله‌های جدا کننده سرم و سانتریفوژ کردن نمونه‌های خون (۵ میلی‌لیتر) از هر حیوان تهیه شد. سرم‌های جدا شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (Indirect Haemagglutination Assay)

به منظور انجام آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) از آنتی‌ژن پیکری *لینگو/تولا سر/تا* استفاده شد. جهت تهیه آنتی‌ژن، پنجاه عدد نوچه زنده *لینگو/تولا سر/تا* چندین بار در محلول بافر فسفات سالین (PBS)، با $pH=7/4$ به همراه جنتامایسین (۴۰ میلی گرم در لیتر) شسته شد و سپس توسط سونیکاتور (باندلین، آلمان) در ۵ میلی لیتر PBS در مجاورت یخ ۱۵ مرتبه به مدت ۲۰ ثانیه سونیکه شد. مخلوط هموژن شده در سانتریفیوژ با دور $7000g$ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع رویی برداشته و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، قرار گرفت.

روش انجام آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم: برای انجام این آزمایش همانگونه که ذکر شد، از آنتی‌ژن پیکری

لینگو/تولا سر/تا استفاده شد. ابتدا $2/5$ میلی‌لیتر خون اخذ شده از گوسفند با تقریباً ۱۰ برابر PBS مخلوط شده و سپس سه مرتبه با دور $2000g$ به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد تا مایع رویی به خوبی شفاف شده و نهایتاً گویچه ۱ درصد با PBS تهیه شد. سپس به منظور افزایش مقاومت و چسبندگی سطح گویچه، به گویچه‌ها اسید تانیک اضافه شد. بدین منظور $2/5$ میلی‌گرم از اسید تانیک به 50 میلی‌لیتر PBS اضافه شده و نهایتاً با 50 میلی‌لیتر RBC ۴ درصد مخلوط شد. سپس به مدت یکساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت محلول آنتی‌ژن به گویچه ۱ درصد اضافه شد. جهت از بین بردن پروتئازها 100 میکرولیتر محلول فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) به هر 10 میلی‌لیتر محلول اضافه شد. پس از یک شب ۳ بار محتویات لوله‌ها شستشو داده شد و سپس آلبومین سرم گاو به عنوان بلوکر به لوله‌ها اضافه شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا از سرم در پلیت ۹۶ خانه با استفاده از PBS، رقت‌های متوالی از $1:2$ تا $1:256$ تهیه گردید. به عبارتی در هر گوده، 50 میکرولیتر PBS و 50 میکرولیتر سرم نمونه و 50 میکرولیتر RBC یک درصد حساس شده، به گوده‌های پلیت الایزا اضافه شد. محتویات گوده‌ها با قرار دادن پلیت‌ها روی شیکر به مدت ۲ دقیقه با هم مخلوط شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بی‌حرکت گذاشته شد. بعد از ۲ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نحوه‌ی قرائت به اینصورت بود که گوده‌هایی که آگلوتیناسیون گویچه‌های قرمز به صورت شبکه‌ای اتفاق افتاد، به عنوان مثبت و آنهایی که رسوب به صورت تکه‌های شدند، به عنوان منفی در نظر گرفته شدند و رقت مورد نظر ثبت شد (Hay et al., 2002).

اندازه‌گیری پروتئین کل

برای تعیین غلظت پروتئین کل سرم از روش بیوره استفاده گردید. این آزمایش مبتنی بر تکنیک رنگ‌سنجی (اسپکتروفتومتری) است که در آن پروتئین‌های سرم در محیط قلیایی و در حضور ترکیبات مس، کمپلکس بنفش رنگ تشکیل می‌دهند. در مطالعه حاضر برای اندازه‌گیری پروتئین کل با روش بیوره از کیت تشخیصی توتال پروتئین (شرکت من، ایران) استفاده شد. این کیت حاوی چهار معرف یدید پتاسیم، پتاسیم سدیم تارترات، سولفات مس و هیدروکسید سدیم بود. قبل از انجام آزمایش دمای معرف‌ها به ۳۷ درجه رسانده و مخلوط شدند و سپس بعد از اضافه کردن نمونه‌ها و انکوباسیون مخلوط حاضر به مدت ۱۱ دقیقه، جذب نوری لوله‌ها در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین از یک لوله به عنوان بلانک حاوی آب مقطر و معرف‌ها و نیز یک لوله حاوی محلول استاندارد و معرف‌ها جهت اندازه‌گیری صحیح توسط دستگاه اتوانالایزر و آنالیز نهایی استفاده شد. نهایتاً غلظت پروتئین کل با استفاده از روش زیر اندازه‌گیری شد:

$$\text{غلظت استاندارد} \times \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}} = (\text{دسی لیتر/گرم}) \text{ غلظت پروتئین نمونه}$$

آنالیز آلبومین و گلوبولین‌های سرم خون

پس از اندازه‌گیری پروتئین کل، با استفاده از کیت مخصوص آلبومین (شرکت من، ایران)، آلبومین سرم اندازه‌گیری شد. به‌طور کلی آلبومین سرم به روش کالریمتریک با استفاده از برمو کروزل گرین در pH= ۴/۲ اندازه‌گیری می‌شود. در این کیت از سه معرف بافر سوکسینات، برموکروزل گرین و سورفاکتانت غیریونی (Brij) استفاده شده است. این آزمایش نیز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شده و پس از مخلوط کردن معرف‌ها و نمونه‌ها، پس از ۲۵ ثانیه جذب نوری لوله‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر یادداشت شد و غلظت نهایی نمونه‌ها مشابه روش قبلی محاسبه شد. از تفریق میزان پروتئین کل و آلبومین میزان گلوبولین سرم نیز تعیین شد.

آزمایش ناپایداری اسمزی گویچه‌های قرمز

ناپایداری اسمزی گویچه قرمز، آزمایشی است که پایداری غشای گویچه قرمز را در برابر استرس اسمزی ارزیابی می‌کند (Igbokwe et al., 2018). جهت انجام این آزمایش، از روش متداول و با استفاده از غلظت‌های مختلف کلرو سدیم ۱ درصد (جدول ۱) استفاده گردید (Jalali et al., 2016).

جدول ۱- غلظت محلول های نمکی در آزمایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه های قرمز

Table 1. Concentration of saline solutions in osmotic fragility test of red blood cell membrane

شماره لوله	محلول بافر نمکی ۱ درصد	آب مقطر	غلظت محلول نمکی
	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(درصد)
۱	۱	۰	۱
۲	۸/۵	۱/۵	۰/۸۵
۳	۷/۵	۲/۵	۰/۷۵
۴	۶/۵	۳/۵	۰/۶۵
۵	۶	۴	۰/۶۰
۶	۵/۵	۴/۵	۰/۵۵
۷	۵	۵	۰/۵۰
۸	۴/۵	۵/۵	۰/۴۵
۹	۴	۶	۰/۴۰
۱۰	۳/۵	۶/۵	۰/۳۵
۱۱	۳	۷	۰/۳۰
۱۲	۲	۸	۰/۲۰
۱۳	۱	۹	۰/۱۰
۱۴	۰	۱۰	۰

نخست محلول استوک بافر فسفات نمکی (۱۰ درصد)، حاوی ۱۰۰ گرم کلرید سدیم (NaCl)، ۱/۸۷ گرم منوسدیم فسفات (NaH_2PO_4) و ۱۳/۶۵ گرم دی سدیم فسفات (Na_2HPO_4)، (مرک، آلمان) در یک لیتر آب مقطر ساخته شد. سپس برای ساخت بافر ۱ درصد به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول استوک، ۹۰۰ میلی لیتر محلول آب مقطر افزوده شد. در نهایت در ۱۴ لوله آزمایش با نسبت مشخص، همانطور که در جدول ۱ آمده، آب مقطر و بافر آماده نمکی ریخته شد. با توجه به جدول ۱، غلظت های متفاوت نمک از صفر تا یک درصد، تهیه گردید. در مرحله بعد به میزان ۵۰ میکرولیتر خون کامل به هر لوله اضافه شد و پس از مخلوط کردن آنها لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس، لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰g سانتریفیوژ شده و جذب نوری مایع رویی در برابر آب مقطر به عنوان بلانک با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (اپتیما، ژاپن) در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید. در نهایت درصد همولیز در هر یک از رقت های نمک در برابر لوله آب مقطر به عنوان همولیز ۱۰۰ درصد محاسبه شده و نمودار درصد همولیز ترسیم شد (نمودار ۱ و ۲).

۵۰/ هیپرگلوبولینمی و افزایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز میزبانان واسط آلوده به انگل زئونوتیک *لینگواتولا سراتا*

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و آزمون t-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند $p < 0.05$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف به صورت میانگین به همراه انحراف معیار بیان شد.

نتایج

فراوانی و شدت آلودگی

در این پژوهش تعداد ۷۹۱ رأس دام شامل ۴۵۶ رأس گوسفند و ۳۳۵ رأس بز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۷/۸ درصد از کل نشخوارکنندگان کوچک بررسی شده در تحقیق حاضر آلوده به *لینگواتولا سراتا* بودند. میزان درصد آلودگی به تفکیک در گوسفندان ۵/۷ درصد و در بزها ۱۰/۷ درصد تخمین زده شد. تعداد نوحه‌ها در غدد لنفاوی مزانتریک بزها بیشتر از گوسفندان بود. به طور متوسط ۱۰/۶ و ۴/۹ عدد نوحه به ترتیب در غدد لنفاوی بز و گوسفند مشاهده شد. جهت انجام آزمایشات بعدی ۱۵ نمونه آلوده و ده نمونه غیر آلوده از هر حیوان جمع آوری شد.

نتایج اندازه‌گیری پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم

مقادیر پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین و همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین اندازه‌گیری و محاسبه شد. همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، غلظت پروتئین کل و آلبومین و همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین کاهش معنی‌داری در گروه آلوده نسبت به گروه غیر آلوده، در هر دو حیوان داشت ($p = 0$). اما میزان گلوبولین سرم در حیوانات آلوده (بز و گوسفند) افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p = 0$).

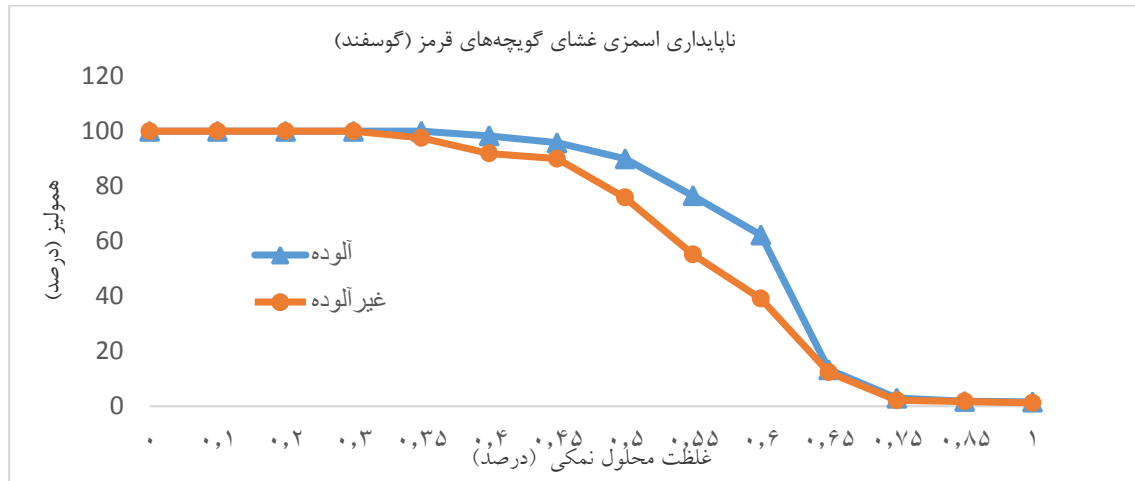
جدول ۲- میزان پروتئین‌های اندازه‌گیری شده در میزبانان واسط آلوده به *لینگواتولا سراتا*

Table 2. Level of protein measured in intermediate hosts infected with *Linguatula serrata*

الودگی	پروتئین کل	آلبومین	گلوبولین	گلوبولین/آلبومین	حیوان مورد مطالعه
	(دسی لیتر/گرم)	(دسی لیتر/گرم)	(دسی لیتر/گرم)		
آلوده	۶/۷±۰/۵ ^a	۲/۷±۰/۵ ^a	۴±۰/۳ ^a	۰/۶±۰/۱ ^a	گوسفند
غیر آلوده	۸/۶±۰/۳ ^b	۶/۵±۰/۳ ^b	۲/۱±۰/۲ ^b	۳±۰/۳ ^b	
آلوده	۶/۸±۰/۳ ^a	۲/۷±۰/۴ ^a	۴±۰/۳ ^a	۰/۷±۰/۱ ^a	بز
غیر آلوده	۸/۷±۰/۴ ^b	۶/۳±۰/۷ ^b	۲/۳±۰/۳ ^b	۲/۷±۰/۶ ^b	

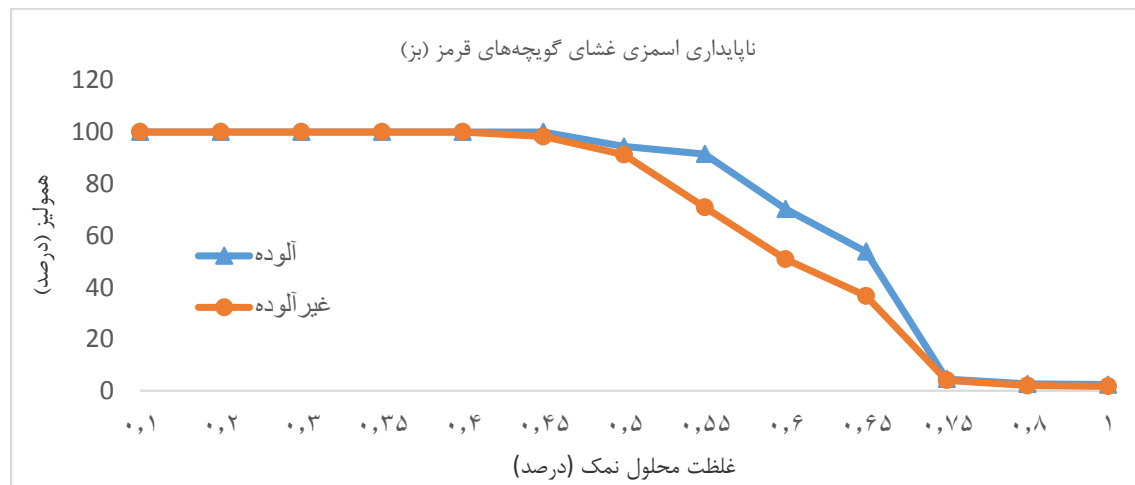
نتایج آزمایش ناپایداری اسمزی گویچه قرمز

نتایج این آزمایش در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. در بررسی این نتایج مشخص شد که ناپایداری اسمزی گویچه‌های قرمز در گروه‌های آلوده به *لینگواتولا سراتا* نسبت به گروه غیرآلوده در هر دو گروه حیوان مورد مطالعه، افزایش یافته است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز در دو گروه گوسفندان آلوده و غیرآلوده به *لینگواتولا سراتا*

Chart 1. Comparison of mean osmotic fragility of red blood cell membranes in two groups of sheep infected and uninfected with *Linguatula serrata*



نمودار ۲- مقایسه میانگین ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز در دو گروه بزهای آلوده و غیرآلوده به *لینگواتولا سراتا*

Comparison of mean osmotic fragility of red blood cell membranes in two groups of goats infected and uninfected with *Linguatula serrata*

۵۲/ هیپرگلوبولینمی و افزایش ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز میزبانان واسط آلوده به انگل زئونوتیک/لینگو/تولا/سراتا

این نتایج در گوسفندان نشان داد که در غلظت نمک ۰/۶۰ درصد، میزان همولیز گویچه‌های قرمز در گروه آلوده و غیرآلوده به ترتیب $۵/۷۳ \pm ۶۲/۲۳$ و $۲/۵۷ \pm ۳۹/۰۷$ درصد بود که در گروه آلوده به‌طور معنی داری افزایش یافته بود ($P=۰/۰۲$). همچنین این افزایش معنی دار در غلظت نمک ۰/۵۵ به میزان $۶/۸۶ \pm ۷۶/۵۸$ و $۵/۵۱ \pm ۶۳/۶۷$ و غلظت نمک ۰/۵۰ درصد به میزان ۵ ± ۹۰ و $۶/۷۴ \pm ۷۵/۸۵$ درصد، مشاهده گردید ($P=۰/۰۲$).

در بزهای مورد مطالعه همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، در غلظت نمک ۰/۶۵ درصد میزان همولیز $۸/۲۴ \pm ۵۳/۷۰$ و $۸/۰۴ \pm ۳۶/۵۸$ درصد بود که به طور معنی داری در گروه آلوده نسبت به گروه غیرآلوده افزایش داشت ($P=۰/۰۱$). همچنین افزایش معنی دار در دو غلظت ۰/۶۰ ($P=۰/۰۰۱$)، در گروه آلوده نسبت به گروه غیرآلوده به ترتیب $۷/۷۲ \pm ۷۰/۲۳$ و $۴/۸۸ \pm ۴۴/۵۳$ و $۷/۲۹ \pm ۹۱/۴۳$ و $۶/۹۶ \pm ۷۰/۸۶$ درصد نیز مشاهده شد. ($P=۰/۰۰۲$)

بحث و نتیجه‌گیری

انگل لینگو/تولا/سراتا، شبه‌بندپایی با گسترش جهانی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است. در سال ۱۹۵۰ میلادی بیماری لینگواتولوزیس توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) در فهرست عوامل بیماری‌زای مشترک انسان و دام قرار گرفت (Drabick, 1987). این انگل، انگلی اجباری است و در مراحل بالغ و نوچه‌ای طیف وسیعی از حیوانات و انسان را به عنوان میزبانان واسط و نهایی، آلوده می‌کند. بطوریکه میزان شیوع آلودگی به این انگل در سگ‌های ایران (۷۶/۲ درصد از شیراز، ۶۵/۵ درصد از شهرکرد، ۴۰/۶ درصد از ایلام گزارش شده است (Oryan et al., 2008, Meshgi & Asgarian, 2003, Bahrami et al., 2011). با این حال آلودگی به لینگو/تولا/سراتا در سگ‌های سایر کشورها هم وجود دارد بطوریکه میزان شیوع آن در سگ‌های لبنان ۴۳/۳ درصد، هند ۳۸ درصد، مصر ۲۵ درصد، ترکیه ۲۰ درصد و نیجریه ۳۷/۴۵ درصد را نشان داده است (Acha & Szyfres, 2003, Khalil, 1973, Akyol et al, 1995, Oluwasina et al, 2014).

مرحله نوچه‌ای این انگل عمدتاً در غدد لنفاوی مزانتریک، کبد و ریه میزبانان واسط یافت می‌شود (Lazo et al., 1999, Sastry, 2001, Berger & Marr, 2006). در مطالعه حاضر ۷۹۱ رأس دام شامل ۴۵۶ گوسفند و ۳۳۵ بز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۷/۸ درصد از کل نشخوارکنندگان کوچک بررسی شده آلوده به لینگو/تولا/سراتا بودند. میزان درصد آلودگی به تفکیک در گوسفندان ۵/۷ درصد و در بزها ۱۰/۷ درصد تخمین زده شد. به نظر می‌رسد که لینگواتولوز احشایی در خاورمیانه بیش از سایر مناطق بومی این انگل، مشاهده می‌شود (Ravindran et al., 2008, Oluwasina et al., 2014). در مطالعه‌ای که در هند انجام شد، شیوع لینگواتولوز در بین حیوانات مورد بررسی حدود ۱۸ درصد تخمین زده شد (Sudan et al., 2014). برخی از محققان در بنگلادش

گزارش کردند که ۵۰/۷ درصد از گاوها و ۳۱ درصد از بزها آلوده شده و همچنین اعلام کردند که جمعیت انسانی این کشور در معرض خطر ابتلا به لینگواتولوز هستند (Islam et al., 2018). نتایج یک مطالعه در مصر در سال ۲۰۱۷ نشان داد که بیشترین شیوع لینگواتولوز در بزها (۳۰ درصد) است (Attia et al., 2017). موارد انسانی آلودگی به این انگل از کشورهای آسیایی (ترکیه، مالزی، چین، هند و بنگلادش) و آلمان گزارش شده است (Hajipour & Tavassoli, 2019, Lazo et al., 1999, Bhende et al, 2014, Tappe et al., 2006).

اگرچه برخی موارد انسانی آلودگی به این انگل به شکل لینگواتولوز حلقی با علائم تنفسی فوقانی، سرفه، سردرد، ترشحات دهان و بینی از ایران گزارش شده است (Tabibian et al., 2012, Janbakhsh et al., 2015, Yazdani et al., 2014)، اما تخمین روشنی از شیوع عفونت در جمعیت ایران وجود ندارد.

همانطور که اشاره شد با توجه به اینکه نوچه‌ی این انگل غدد لنفاوی را مورد هدف قرار می‌دهد، احتمالاً می‌تواند عوامل سلولی و غیرسلولی خون و لنف را تحت تأثیر قرار دهد. اما تاکنون اطلاعاتی در رابطه با یافته‌های بیوشیمیایی نشخوارکنندگان مبتلا به این انگل وجود ندارد. به همین منظور در این مطالعه سعی شد، پس از بررسی و مشخص نمودن تعداد موارد آلوده و غیرآلوده، میزان تغییرات پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و همچنین میزان ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز در موارد آلوده ارزیابی شود. تعیین غلظت پروتئین‌های سرم و ارزیابی تغییرات آنها در طی روند بیماری به عنوان نشانگرهای زیستی معتبر اهمیت دارد (Okutucu et al., 2007). در بررسی صورت گرفته پروتئین کل و آلبومین سرم در گروه‌های آلوده در هر دو حیوان نسبت به گروه‌های غیر آلوده کاهش معنی‌دار و میزان گلوبولین افزایش معنی‌داری داشتند ($p = 0$). به طور کلی، تغییر در پروتئین‌های سرم می‌تواند نشان دهنده‌ی فرآیندهای آسیب شناختی غیر اختصاصی و یا ممکن است نشانگرهای تشخیصی بالقوه‌ی برخی از شرایط پاتولوژیک باشد. میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم یکی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم است که تحت تأثیر پاسخ ایمنی قرار می‌گیرد (Ellis, 1990). غلظت پایین پروتئین سرم در بسیاری موارد از جمله بیماری‌های کبدی و کلیوی مشاهده می‌شود (Lee, 2012, Grauer, 2005, Kodner, 2009). همانطور که پیشتر ذکر شد پروتئین‌های سرم عمدتاً توسط کبد ترشح می‌شوند. مهاجرت نوچه‌های انگل در کبد و به دنبال آن آسیب به این ارگان و کاهش عملکرد آن ممکن است یکی از دلایل کاهش پروتئین‌های سرم باشد.

از دیگر دلایل کاهش سطح پروتئین کل در سرم حیوانات آلوده به این انگل، می‌توان به تهاجم لارو انگل به دیواره‌ی روده و نشت پلاسما از روده‌ی آسیب دیده اشاره کرد (Radostits et al., 1994). این از دست دادن پروتئین، عمدتاً به دلیل دفع انتخابی آلبومین با اندازه کوچکتر و حرکت راحت‌تر طی فرایند اسمزی است (Tanwar & Mishra, 2001). کاهش آلبومین ممکن است با افزایش کاتابولیسم آلبومین و سوء جذب پروتئین از طریق مخاط روده‌ی آسیب دیده تشدید شود (Ahmad et al., 1990) در حیوانات

آلوده، نسبت آلبومین به گلوبولین به میزان قابل توجهی کمتر و میزان گلوبولین بیشتر از حیوانات سالم بود. افزایش سطح گلوبولین سرم در آلودگی‌های انگلی ممکن است به دلیل پاسخ ایمنی هومورال در برابر عفونت انگلی باشد. به این ترتیب وجود عفونت باعث تحریک سیستم ایمنی میزبان و در نتیجه افزایش سنتز گلوبولین می‌شود (Byers & Kramer, 2010).

با توجه به نتایج حاصل، در مجموع ناپایداری اسمزی غشای گویچه‌های قرمز در گروه‌های آلوده به *لینگوتولا سراتا* در هر دو حیوان مورد نظر نسبت به گروه‌های غیرآلوده افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). تغییرات ناپایداری اسمزی غشا در گوسفندان در رقت‌های ۰/۶۰، ۰/۵۵ و ۰/۵۰ درصد مشاهده شد. در بزها این تغییرات در رقت‌های ۰/۶۵، ۰/۶۰ و ۰/۵۵ درصد صورت گرفت. نظر به اینکه گویچه‌های قرمز بز کوچک‌تر و دارای اشکال متفاوت و نامتقارنی می‌باشند، بدیهی است که همولیز در خون این حیوان به نسبت سریع‌تر اتفاق بیفتد (Piccione et al., 2007). همچنین افزایش ناپایداری اسمزی غشا با توجه به چرخه زندگی انگل در بدن میزبان واسط و حضور نوچه این انگل در غدد لنفاوی مورد انتظار بود چرا که این انگل با حضور در غدد لنفاوی موجب تخریب این غدد به صورت فیزیکی و احتمالا با ترشحات خود و آزاد شدن این ترشحات در سیستم لنفاوی و خون، موجب آسیب به دیواره گویچه‌های قرمز شده و به دنبال آن گویچه‌ها با قرار گرفتن در محیط‌های هیپوتونیک به سرعت لیز می‌شوند. علاوه براین، گویچه‌های قرمز سلول‌های اصلی هستند که اکسیژن را در سیستم گردش خون به گردش در می‌آورند و به آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد یا گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) تولید شده در شرایط پاتولوژیک بسیار حساس هستند (Plyaschenko & Sidorov, 1987). با توجه به نتایج حاصل از این بررسی این احتمال نیز وجود دارد که این انگل با ایجاد استرس اکسیداتیو موجب حساس شدن دیواره‌ی گویچه‌های قرمز میزبان و به دنبال آن افزایش شکنندگی اسمزی گویچه قرمز در این شرایط شود.

در مجموع مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که آلودگی گوسفندان و بزها به *لینگوتولا سراتا* در ایران وجود دارد. همچنین این انگل باعث ایجاد تغییرات در پروتئین‌های سرم نشخوارکنندگان کوچک آلوده می‌شود. احتمالا در آلودگی به این انگل استرس اکسیداتیو ایجاد شده و باعث آسیب به ساختار گویچه قرمز و افزایش ناپایداری غشای آن‌ها می‌گردد. مطالعات بیشتری جهت تأیید فرضیات مطرح شده مورد نیاز است. آگاهی از چگونگی بیماری‌زا شدن انگل در میزبانان واسط می‌تواند تا حدودی ما را با عوارض احتمالی آن در انسان آشنا سازد. همچنین اطلاع از بیماری‌زایی انگل برای اهداف درمانی و پیشگیری حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌ی این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان نامه‌های دانشجویان (پایان نامه‌ی Ph.D انگل‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

- Acha, N.P. and Szyfres, B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals, vol. 1. Pan American Health Organization (PAHO) Pp:63-65. Washington, DC.
- Ahmad, A., Anwarul, H., Anwarul, H. and Majeed, M.A. (1990). Serum protein changes of lambs in experimentally induced with *Haemonchus contortus* infection. *Veterinarski Arhiv*, 60(4): 195-200.
- Akyol, C.V., Coskun, S.Z., Sonmez, G. and Senlik, B. (1995). *Linguatula serrata* infection of Bursa stray dogs and public health importance. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 19(2):267-271.
- Anaraki Mohammadi, G., Mobedi, I., Ariaiepour, M., Pourmohammadi, Z. and Zare Bidaki, M. (2008). A case report of nasopharyngeal linguatuliasis in Tehran, Iran and characterization of the isolated *Linguatula serrata*. *Iranian Journal of Pediatrics*, 3: 53-55.
- Anderson, N. and Anderson, N. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1 (11): 845-867.
- Attia, M.M., Mahdy, O.A. and Saleh, N.M.K. (2017). Prevalence of *Linguatula serrata* (order: Pentastomida) nymphs parasitizing camels and goats with experimental infestation of dogs in Egypt. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4 (8): 197-205.
- Bahrami, A.M., Yousofzadeh, S. and Kermanjani, A. (2011). Study of *Linguatula serrata* infection rate among Shepherd and stray dogs in Ilam (Western Iran). *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 19(2): 60-65.
- Berger, S.A. and Marr, J.S. (2006). Human Parastic Diseases. Jones and Bartlett publish 294 Pp. Canada.
- Bhende, M., Abhishek, J.B., Raman, M. and Bhende, P.S. (2014). *Linguatula serrata* in the anterior chamber of the eye. *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(12):1159.
- Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (2001). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5th ed. WB Saunders Company 1091 Pp. Philadelphia.

- Byers, S.R. and Kramer, J.W. (2010). Normal hematology of sheep and goats. Pages: 836-842. In: Weiss DJ, Wordrop KJ, editor. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames, Iowa, U.S.A, Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Drabick, J.J. (1987). Pentastomiasis. Rev. Infection Disease, 9:1087-1094.
- Eckersall, P.D. (2008). Proteins proteomics and the dysproteinemias. Pages.117–155. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme Assays. Pages: 101-103. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Van Muiswinkel WB. editor. Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, Fair Haven.
- Gjerde, B. (2013). Phylogenetic position of *Linguatula arctica* and *Linguatula serrata* (Pentastomida) as inferred from the nuclear 18S rRNA gene and the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. Parasitology Research, 112(10): 1–9.
- Grauer, G.F. (2005). Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. Journal of Small Animal Practice, 46: 469–478.
- Hajipour, N. and Tavassoli, M. (2019). Prevalence and associated risk factors of *Linguatula serrata* infection in definitive and intermediate hosts in Iran and other countries: a systematic review. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 16, 100288.
- Hay, F.C., Westwood, O.M.R. and Nelson, P.N. (2002). Practical Immunology 4th ed. Blackwell Publishers.
- Igbokwe, N.A., Sandabe, U.K., Bokko, B.P. and Igbokwe, I.O. (2018). Inhibition of osmotic permeability of caprine erythrocytes by mercuric chloride in osmotic fragility models. Sokoto Journal of Veterinary Sciences, 16 (3): 24-32.
- Islam, R., Anisuz, Z., Hossain, M.d.S., Alam, Z., Islam, A., Noor, A.Kh., Abu, H. et al. (2018). *Linguatula serrata*, a food-borne zoonotic parasite, in livestock in Bangladesh: some pathologic and epidemiologic aspects. Veterinary Parasitology: Regional Studies and reports, 13: 135–140.
- Jalali, S.M., Bahrami, S., Rasooli, A. and Hasanvand, S. (2016). Evaluation of oxidant/antioxidant status, trace mineral levels, and erythrocyte osmotic fragility in goats naturally infected with *Anaplasma ovis*. Tropical Animal Health and Production, 48(6): 1175-1181.
- Janbakhsh, A., Hamzavi, Y. and Babaei. P. (2015). The first case of human infestation with *Linguatula serrata* in Kermanshah province. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences, 19 (1): 58-61.
- Khalil, G.M. (1973). *Linguatula serrata* from mongrel dogs in El-Dakhla Oasis (Egypt) Journal of Parasitology. Pages: 59.
- Koehsler, M., Walocchnik, J., Georgopoulos, M., Prunte, C., Boeckeler, W., Auer, H., et al. (2011). *Linguatula serrata* tongue worm in human eye, Austria. Emerging Infectious Disease, 17(5): 870–872.
- Lazo, R. F., Hidalgo, E., Lazo, J.E., Bermeo, A., Llaguno, M., Murillo, J. and Teixeira, V.P.A. (1999). Ocular Linguatuliasis in Ecuador: Case report and morphometric study of the larva of *Linguatula serrata*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60(3): 405-409.
- Lee, J.S. (2012). Albumin for end-stage liver disease. The Korean Journal of Internal Medicine, 27: 13–19.
- Kodner, C. (2009). Nephrotic syndrome in adults: Diagnosis and management. American Family Physician, 80: 1129–1134.

- Meshgi, B. and Asgarian, O. (2003). Prevalence of *Linguatula serrata* infestation in stray dogs of Shahrekord, Iranian Journal of Veterinary Medicine, Series B.; 50(9):466-7.
- Okutucu, B., Dincer, A., Habib, O. and Zihnioglu, F. (2007). Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70: 709–711.
- Oluwasina, O.S., ThankGod, O.E., Augustine, O.O. and Gimba, F.I. (2014). *Linguatula serrata* (Porocephalida: Linguatulidae) Infection among Client-Owned Dogs in Jalingo, North Journal of Parasitology Research Nigeria: Prevalence and Public Health Implications, Hindawi Publishing Corporation. Journal of parasitology research, Article ID 916120, 5 pages.
- Oryan, A., Sadjjadi, S.M., Mehrabani, D. and Rezaei, M. (2008). The status of *Linguatula serrata* infection of stray dogs in Shiraz, Iran. Comparative Clinical Pathology, 17(1):55-60.
- Piccione, G., Fazio, F., Giannetto, C., Assenza, A. and Caola, G. (2007). Oxidative stress in thoroughbreds during official 1800-meter races. Veterinarski Arhiv, 77: 219–227.
- Pieper, R., Gatlin, C.L., Makusky, A.J., Russo, P.S., Schatz, C.R., Miller, S.S., et al. (2003). The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. Proteomic, 3: 1345–1364.
- Plyaschenko, S.I. and Sidorov, V.T. (1987). Stresses in Farm Animals. Moscow (in Russian): Agropromizdat.
- Qamar, M.F. and Maqbool, A. (2012). Biochemical studies and serodiagnosis of haemonchosis in sheep and goats. Journal of Animal and Plant Sciences, 22(1): 32-38.
- Radostits, O.M., Blood, D.C. and Gay, C.C. (1994). Veterinary Medicines. 8th ed. Bailliere Tindal 1223-1272 Pp. London.
- Razavi, S.M., Shekarforoush, S.S. and Izadi, M. (2004). Prevalence of *Linguatula serrata* nymphs in goats in Shiraz, Iran. Small Ruminant Research, 54: 213–221.
- Ravindran, R., Lakshmanan, B., Ravishankar, C. and Subramanian, H. (2008). Prevalence of *Linguatula serrata* in domestic ruminants in South India, Southeast Asia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 39(5): 808-812.
- Shamsi, sh., McSpadden, k. and Baker, s. (2017). Occurrence of tongue worm, *Linguatula cf. serrata* (Pentastomida: Linguatulidae) in wild canids and livestock in south-eastern Australia. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 6(3): 271-277.
- Sharma, B., Rai, D.K., Rai, P.K., Rizvi, S.I. and Watal, G. (2010). Determination of erythrocyte fragility as a marker of pesticide-induced membrane oxidative damage. Advanced Protocols in Oxidative Stress II: Methods. Journal of Molecular Biology, 594(1):123-128.
- Siavashi, M.R., Assmar, M. and Vatankhah, A. (2002). Nasopharyngeal pentastomiasis (Halzoun): report of 3 cases. Iran. Journal of Medical Sciences, 27: 191-192.
- Sastry, G.A. (2001). Veterinary Pathology, 7th ed. CBS Publishers & Distributors 757 Pp. New Dehli, India, pp: 757.
- Sudan, V., Jaiswal, A.K. and Shanker, D. (2014). Infection rates of *Linguatulaserrata* nymphs in mesenteric lymph nodes from water buffaloes in North India. Veterinary Parasitology, 205: 408–411.
- Tanwar, R.K. and Mishra, S. (2001). Clinico-Haemato-biochemical studies on intestinal helminthiasis in poultry. Veterinary Practitioner, 2: 137-140.

- Tabibian, H., Yousofi Darani, H., Bahadoran-Bagh-Badorani, M., Farahmand Soderjani, M. and Enayatinia, H. (2012). A case report of *Linguatula serrata* infestation from rural area of Isfahan city, Iran. Advanced Biomedical Research, 1: 1–3.
- Tappe, D., Winzer, R., Büttner, D.W., Ströbel, P., Stich, A., Klinker, H. and Frosch, M. (2006). Linguatuliasis in Germany. Emerging Infectious Diseases, 12(6): 1034–1036.
- Yazdani, R., Sharifi, I., Bamorovat, M. and Mohammadi, M.A. (2014). Human linguatulososis caused by *Linguatula serrata* in the city of Kerman, South-eastern Iran-case report. Iranian Journal of Parasitology, 9(2):282

Hyperglobulinemia and increased erythrocyte membrane osmotic instability of intermediate hosts infected with the zoonotic parasite, *Linguatula serrata*

A. R. Alborzi^{*}, M. Hosseini[‡], S. Bahrami[‡], M. Ghorbanpoor[‡], M. R. Tabandeh[§]

Received: 2021-05-30

Accepted: 2021-08-10

Abstract

*This study was performed to determine the prevalence of infection in sheep and goats by observing parasite nymph in mesenteric lymph nodes and indirect haemagglutination test. Furthermore, changes in serum protein and membrane osmotic instability of erythrocytes in infected and non-infected groups were evaluated. 791 blood and mesenteric lymph nodes samples from sheep (456) and goats (335) were collected from the slaughterhouse of Ahvaz city (Khuzestan province). The results showed that 7.8% of all ruminants in the present study were infected with *L. serrata*. The infection rate was estimated to be 5.7% in sheep and 10.7% in goats. Total protein and albumin concentrations, as well as albumin to globulin ratio, decreased significantly and globulin levels increased significantly in the infected group compared to the non-infected group in both animal groups ($p \leq 0.05$). The amount of membrane osmotic instability of erythrocytes increased in the groups infected with *L. serrata* ($p \leq 0.05$). Overall, the present study showed that sheep and goats are infected with *L. serrata* in Iran. Also, this parasite causes changes in the serum proteins of small ruminants. Infection with this parasite may cause oxidative stress and damage to the structure of red blood cells and increase their membrane instability.*

Keywords: *Hyperglobulinemia, Intermediate hosts, Linguatula serrata, Membrane osmotic instability*

-
1. Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (* corresponding author: a.alborzi@scu.ac.ir)
 2. Ph. D student, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 3. Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 4. Professor, Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
 5. Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

مدلسازی مطلوبیت زیستگاه غاز پیشانی سفید (*Anser albifrons* Scopoli, 1769) در ایران

فاطمه بیگلری قوچان عتیق^۱، آزینا فراشی^۲، میترا شریعتی نجف‌آبادی^۳

چکیده

مقدمه: امروزه پاسخ پویای گونه های مهاجر آبی به محیط پیرامونی و نحوه انتخاب زیستگاه توسط آنها به ندرت مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به ضرورت انجام مطالعات در این زمینه، پژوهش حاضر به منظور بررسی نحوه پراکنش و پارامترهای زیست محیطی موثر در انتخاب زیستگاه غاز پیشانی سفید (*Anser albifrons* Scopoli, 1769) به عنوان یک گونه ی مهاجر در ایران صورت پذیرفت. مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از چهار گروه متغیر زیستمحیطی شامل: متغیرهای توپوگرافیک، اقلیمی و کاربری اراضی/ پوشش سرزمین استفاده شد. نقاط حضور با استفاده از گزارشات سازمان حفاظت محیط زیست به دست آمد. جهت مدلسازی از ۹ الگوریتم موجود در پکیج BIOMOD تحت نرم افزار R استفاده شد. صحت مدلسازی با استفاده از شاخص های ROC و TSS مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج این مطالعه نتایج نشان داد، پارامترهایی نظیر میزان بارش سالیانه، فاصله تا زمینهای کشاورزی دیم، بارش گرمترین فصل سال و فاصله تا تالابها، بیشترین تأثیر را در پراکنش غاز پیشانی سفید دارند.

واژه‌های کلیدی: انتخاب زیستگاه، پارامترهای زیست محیطی، تالاب، BIOMOD

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۲. دانشیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران (*نویسنده مسئول (Farashi@um.ac.ir))
۳. دانش آموخته دکتری، گروه محیط زیست، دانشگاه تانت، هلند

مقدمه

مهاجرت پر خطرترین دوره‌ی چرخه زندگی پرندگان است (Sillett *et al.*, 2002). گونه‌های مهاجر در طول مهاجرت خود از مسیرهای مختلفی عبوری می‌کنند، لذا نحوه انتخاب زیستگاه و چگونگی پاسخ گونه‌ها به تغییرات محیطی و همچنین توانایی مهاجرت آنها برای موفقیت در روند تولیدمثل امری حائز اهمیت است (Franklin., 2010). در میان پرندگان مهاجر، پرندگان مهاجر آبی‌ری گياه‌خوار مانند غازسانان در اروپا، آسیا و در آمریکای شمالی تغییرات قابل ملاحظه‌ای در طی ۵۰ سال گذشته داشته‌اند، به طوری که اکثر اعضای این خانواده در معرض آسیب جدی قرار گرفته‌اند (Fox *et al.*, 2005; Abraham *et al.*, 2005). هفت گونه از غازسانان موجود در سطح جهان به نام‌های غاز خاکستری (*Anser anser*)، غاز پیشانی سفید بزرگ (*Anser albifrons*)، غاز پیشانی سفید کوچک (*Anser erythtopus*)، غاز پا زرد (*Anser fabalis*)، عروس غاز (*Branta Ruficollis*)، غاز گونه سفید (*Branta leucopsis*) و غاز گردن سیاه (*hrota Branta*) به طور مرتب در ایران حضور دارند (Kaboli *et al.*, 2016; Khaleghizadeh *et al.*, 2020).

غازها به طور دائم در طول مسیر مهاجرت به دنبال مکان‌های تغذیه‌ای با بیشترین علوفه با کیفیت هستند (Owen, 1980; Van der Graaf *et al.*, 2006; Shariati najafabadi *et al.*, 2014). طبق مطالعات انجام شده زیستگاه‌های انتخاب شده توسط غازها در مناطق باز و دشتی و دور از لبه‌های جنگلی قرار دارند، این مناطق احتمالاً به دلیل امنیت بیشتر و کاهش خطرات ناشی از شکار، ارجعیت بیشتری نسبت به دیگر مناطق دارند. علاوه بر این، غازها مکان‌های بزرگ دور از مناطق مسکونی را ترجیح می‌دهند. دریاچه‌ها و آب‌های ساحلی معمولاً توسط غازها به عنوان مکان‌های استراحت شبانه (roosting sites) و مکان‌های تغذیه‌ای جهت بازیابی انرژی برای ادامه مسیر مهاجرت (resting sites) استفاده می‌شوند (Rosin *et al.*, 2012; Roder *et al.*, 2008; Jankowiak *et al.*, 2008). به طور کلی انتخاب محل سکونت توسط پرندگان مهاجر آبی‌ری تحت تأثیر انواع مختلف پارامترهای زیست‌محیطی مانند میزان دسترسی به منابع غذایی و امنیت زیستگاه قرار دارد (Franklin, 2010).

غاز پیشانی سفید یک پرنده آبی‌ری مهاجر است که مسافت طولانی را بین عرض‌های جغرافیایی میانه و عرض‌های جغرافیایی بالاتر جهت رسیدن به زیستگاه‌های مطلوب در فصول مهاجرت طی می‌کند (Kear, 2005). این گونه در مناطق توندرا به مانند شبه جزیره کینین تا رودخانه کولیم در روسیه تولید مثل می‌کند. این گونه از اواخر ماه می یا اوایل ماه ژوئن در دو جفت یا گروه‌های گسسته تکثیر می‌شوند و پس از تولید مثل، گونه‌ها در گله‌های کوچک (کمتر از ۳۰ نفر) جمع می‌شوند. جهت دوره پرریزی، ۲۵ روز پس از تولید مثل، نزدیک مکان‌های تولید مثل ساکن می‌شوند. پس از این دوره، گله‌ها جهت مهاجرت به عرض‌های جغرافیایی پایین‌تر آماده می‌شوند و مناطق تولید مثل را از اواخر آگوست تا سپتامبر ترک می‌کنند و اواخر پاییز به مناطق زمستان‌گذرانی

خود می‌رسند (Madsen *et al.*, 1999). این مناطق عمدتاً در اروپای غربی شامل کشورهای آلمان و بلژیک، شمال شرقی لهستان و قسمت‌هایی از ایران، استونی، قسمت‌های مرکزی اروپا در روسیه قرار دارند (Polakowski, 2016). در ایران نیز به صورت زمستان‌گذران در آذربایجان و نواحی جنوبی دریای خزر و به تعداد کمتر در استان‌های خوزستان و فارس و به ندرت در سواحل شمالی‌تر خلیج فارس دیده می‌شود (Kaboli *et al.*, 2016). از آنجایی که غاز پیشانی سفید گونه‌ای آبی و گیاه‌خوار است و با فرض اینکه تنوع و کیفیت بالای علوفه باعث مهاجرت سالانه آنها می‌شود، لذا این گونه مرغزارها و چمنزارهای نواحی پست، مزارع غلات، اراضی آبی، استپ‌های باز، علفزارها و مصب‌های وسیع در تالاب‌های شور را به عنوان زیستگاه‌های زمستان‌گذرانی برمی‌گزیند و همواره به دنبال دسترسی حداکثر علوفه با کیفیت بالا است (Owen, 1980; Shariati najafabadi *et al.*, 2014; Van der Graaf *et al.*, 2006).

مطالعات نشان می‌دهد که در طی سالیان متوالی میزان زیستگاه‌های مطلوب جمعیت غاز پیشانی سفید دچار تغییرات شدیدی شده است و جمعیت آنها روند کاهشی دارد (Fox *et al.*, 2005). از عواملی که باعث از دست رفتن زیستگاه‌های مطلوب و به دنبال آن کاهش جمعیت این گونه آسیب‌پذیر شده است، می‌توان به کاهش امنیت زیستگاه‌ها (شکار بی‌رویه) (Menu *et al.*, 2002; Ebbinge *et al.*, 1991)، تغییرات کاربری اراضی شامل به زیر کشت رفتن بخش عمده‌ای از زیستگاه‌های زمستان‌گذرانی و به ویژه بیابان‌زایی اشاره نمود. همچنین در برخی از مطالعات کاهش جمعیت را به دلیل کاهش دسترسی به منابع غذایی گزارش کرده‌اند (Van Eerden *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد حفاظت و مدیریت مؤثر پرندگان مهاجر آبی، نیازمند داده‌های توزیع گونه‌ای برای تعیین توزیع بین ایستگاه‌ها و مسیرهای مهاجرت آنها است (Faaborg *et al.*, 2010). برای مدیریت و حفاظت از گونه‌ها اولین قدم شناخت شرایط زیستگاه و دامنه پراکنش گونه‌ها است.

در طی سالیان گذشته مدل‌های بسیاری جهت بررسی زیستگاه مطلوب پرندگان و همچنین شناسایی پارامترهای مؤثر بر انتخاب زیستگاه پرندگان ایجاد شده است (Jetz & Rahbeck, 2002). مدل‌سازی توزیع گونه (Distribution Model Species) احتمال حضور گونه را در زیستگاه‌ها با ویژگی‌های محیطی زیستگاه پیوند می‌دهند و نحوه پراکنش گونه را پیش‌بینی می‌کند (Guisan & Thuiller, 2005) و در زمینه‌هایی مانند پیش‌بینی مسیرهای پروازی گونه‌های مهاجر (Osborne *et al.*, 2001)، پیش‌بینی مراکز جوجه‌آور گونه‌ها (Paradis *et al.*, 2000) مورد استفاده قرار می‌گیرد. مدل‌سازی توزیع گونه، الگوهای معنی داری را بین پارامترهای زیست‌محیطی و چگونگی توزیع گونه ارائه می‌دهد، لذا ابزاری قدرتمند جهت پیش‌بینی تغییرات اقلیمی برای ارزیابی‌های حفاظتی است (Jiménez-Valverde *et al.*, 2011; Stralberg *et al.*, 2015). چارچوب محاسبات جدید به صورت BIOMOD (Biodiversity Modelling) ارائه شده است که هدف آن به حداکثر رساندن دقت پیش‌بینی توزیع گونه‌ای با استفاده

از انواع مختلفی از روش‌های مدل‌سازی است (Thuiller, 2003). تا کنون مطالعاتی مبنی بر بررسی پراکنش و مدل‌سازی زیستگاه غاز پیشانی سفید در ایران صورت نگرفته است، لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف مدل‌سازی زیستگاه‌های مطلوب غاز پیشانی سفید در ایران و شناسایی عوامل زیست‌محیطی موثر در پراکنش و نحوه انتخاب زیستگاه این گونه با استفاده از پکیج BIOMOD 2 موجود در نرم افزار R صورت پذیرفت.

مواد و روش

منطقه مورد مطالعه

در ایران به دلیل شرایط خاص اقلیمی و مجاورت با مناطق جغرافیایی جانوری استراتژیک (Fox et al., 2005)، حدود ۵۳۴ گونه پرنده (Kaboli et al., 2016)، ۲۱۵ گونه خزنده (Karami et al., 2008)، ۱۹۱ گونه پستاندار (Scott & Adhami, 2006) و ۲۱ گونه دوزیست (Rastegar et al., 2008) گزارش شده است. این مناطق عرصه‌ای بالغ بر ۸/۱۶۴ میلیون هکتار از عرض جغرافیایی ۲۵ درجه تا ۴۰ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۴۴ درجه تا ۶۴ درجه شرقی را در بر می‌گیرند (Nouri Jangi, 2014). بخش اعظم ایران در مناطق خشک و نیمه خشک قرار دارد، اما وجود چندین تالاب بین‌المللی حیاتی به سبب جذب پرندگان آبی مهاجر بسیار با اهمیت هستند (Scott et al., 1996).

جمع‌آوری نقاط حضور گونه

در مجموع تعداد ۲۵ نقطه حضور جهت مدل‌سازی پراکنش گونه‌ی غاز پیشانی سفید مورد استفاده قرار گرفت. این نقاط حضور از محل گزارشات سرشماری پرندگان سازمان حفاظت محیط‌زیست به دست آمد. این گزارشات در فرمت اکسل در اختیار ما قرار گرفت و مناطق مورد نظر با استفاده از Google Earth، مکان‌یابی و طول و عرض جغرافیایی آنها مشخص و به فرمت csv ذخیره گردید. در ادامه نقاط حضور به دست آمده از گزارش‌های سازمان حفاظت محیط‌زیست با استفاده از نقشه پراکنش گونه‌ی مورد مطالعه موجود در اطلس پرندگان ایران (کابلی و همکاران، ۱۳۹۵) و سایت GBIF (www.gbif.org) مورد ارزیابی و صحت-سنجی قرار گرفتند.

آماده‌سازی پارامترهای زیست‌محیطی

در این مطالعه چهار گروه متغیر محیطی شامل متغیرهای توپوگرافیکی، اقلیمی و کاربری / پوشش زمین مورد استفاده قرار گرفت. نقشه‌های توپوگرافی و پوشش‌زمین / کاربری زمین، که توسط "سازمان نقشه‌برداری ایران" در ۱۳۸۴ سال تهیه و در سال

۱۳۹۴ با مقیاس 30×30 متر به روز رسانی شدند، استفاده شد. نقشه شیب از نقشه ارتفاع در نرم افزار Arc map به دست آمد. نقشه NDVI از سایت "Ladsweb 1" در تاریخ ۱۴ می سال ۲۰۱۸ از شاخص‌های ۱۶ روزه MODIS13 استخراج شده است. متغیرهای اقلیمی از بانک داده‌های اقلیم جهانی (www.worldclime.org/current) در اندازه سلول ۱۰۰۰ متر بر اساس درونیایی داده‌های هواشناسی در بازه‌ی زمانی سال‌های ۱۹۵۰ تا ۲۰۰۰ میلادی تهیه شدند، تعداد ۱۹ متغیر اقلیمی دانلود شدند و سپس با روش ضریب همبستگی پیرسون (± 0.8)، لایه‌هایی با بیش از ۸۰ درصد همبستگی اطلاعات حذف شدند (Priti et al., 2016) و در انتها ۷ متغیر اقلیمی متشکل از بارش و دما باقی ماندند. جهت آماده‌سازی و پردازش لایه‌های اطلاعاتی از نرم افزار Arc map و Idrisi Selva استفاده شد. در نهایت تعداد ۲۳ پارامتر زیست‌محیطی با اندازه سلول ۱۰۰۰ متر جهت بررسی پارامترهای زیست-محیطی موثر در انتخاب زیستگاه توسط غاز پیشانی سفید با استفاده از پکیج Biomod 2 مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

مدل‌سازی توزیع گونه (SDM)

برای مدل‌سازی توزیع گونه‌ی غاز پیشانی سفید در این مطالعه از پکیج Biomod 2 استفاده شد. پکیج Biomod جهت بررسی روابط بین محیط‌زیست و گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thuiller et al., 2009). به این ترتیب ۹ مدل در روند مدل‌سازی مورد استفاده قرار گرفت، که در جدول ۱ آورده شده است. در روند مدل‌سازی از ۷۰ درصد نقاط حضور گونه برای تولید مدل‌ها و ۳۰ درصد نیز برای ارزیابی عملکرد مدل‌ها استفاده شد. نقاط عدم حضور گونه‌ی مورد مطالعه با استفاده از پکیج Biomod 2 به دست آمد، همچنین در این مطالعه جهت افزایش دقت مدل‌سازی تعداد ۱۰۰ تکرار برای گونه در نظر گرفته شد.

GLM یک مدل پارامتریکی است که برای مدل‌سازی داده‌های حضور/عدم حضور گونه‌ها معرفی شده است (Austin et al., 1984). FDA یک مدل طبقه‌بندی مبتنی بر ترکیبی از مدل‌های رگرسیون خطی است (Hastie et al., 1994). RF از روش‌های کلاسه‌بندی و درخت‌های رگرسیونی است که به عنوان یک روش ماشین یادگیری، عملکرد بسیار دقیق و کارآمدی را ارائه می‌کند (Elith & Franklin, 2013). CTA روشی غیرپارامتری است که حدود ۳۶ سال پیش برای تجزیه و تحلیل و طبقه‌بندی توسعه یافته است (Breiman et al., 1984). GBM ترکیبی از دو روش الگوریتم‌های تصمیم‌گیری درختی و مدل‌های تقویت شده تعمیم یافته است (Elith & Franklin, 2013). SRE به نام BIOCLIM نیز شناخته می‌شود. این مدل داده‌ها و مجموعه‌ای از عوامل محیطی، برای تهیه نقشه‌های پراکنش گونه و عوامل موثر در پراکنش آن استفاده می‌شود (Nix, 1986). MARS یک مدل رگرسیون سازشی چند متغیره و یک روش رگرسیون غیر پارامتریک است که می‌توان برای تجزیه و تحلیل ساختارهای پیچیده از آن بهره جست (Friedman, 1991). ANN جزء مدل‌های پارامتریک استاندارد است که از نورون‌های موجود در مغز انسان الگوبرداری کرده

و با ساختار نوروونی و هوشمند خود تلاش می‌کند تا از طریق توابع تعریف‌شده رفتار درون‌سلولی نوروون‌های مغز را شبیه‌سازی کند (Harrell *et al.*, 1996). GAM یک مدل ناپارامتریک بوده و بسط مدل‌های خطی تعمیم یافته است. هدف از به کار بردن این مدل به حداکثر رساندن کیفیت پیش بینی متغیر وابسته است (Hastie *et al.*, 1994).

جدول ۱- مدل‌های استفاده شده در پکیج Biomod

Table 1. Models used in the biomod package

نام فارسی	نام کامل	علامت اختصاری
مدل خطی تعمیم یافته	Generalized Liner Model	GLM
روش تقویت شده تعمیم یافته	Generalized Boosting Method	GBM
مدل افزایشی تعمیم یافته	Generalized Additive Model	GAM
آنالیز طبقه بندی درختی	Classification Tree Analysis	CTA
شبکه عصبی مصنوعی	Artificial Neural Network	ANN
پاکت دامنه سطحی	Surface Range Envelope	SRE
آنالیز تفکیکی انعطاف پذیر	Flexible Denotative Analysis	FDA
مدل رگرسیون سازشی چند متغیره	Multivariate Adaptive Regression Spline	MARS
جنگل تصادفی	Random Forest	RF

در این مطالعه صحت مدل‌سازی با توجه به انواع مختلف مدل‌ها با استفاده از دو ضریب آماری محاسبه شد. روش اول بررسی میزان ROC (receiver operating characteristic) است. ROC یک روش گرافیکی است که توانایی یک مدل برای پیش‌بینی نقاط حضور و عدم حضور گونه‌ها را بر اساس پارامترهای زیست‌محیطی مرتبط مورد ارزیابی قرار می‌دهد (Fielding *et al.*, 1997). روش دوم محاسبه میزان TSS (True Skill Statistic) است. این روش زمانی کاربرد دارد که از مدل‌های حضور و عدم حضور استفاده می‌شود. TSS را می‌توان به عنوان شاهدهی برای تفسیر پدیده‌های اکولوژیکی واقعی عنوان کرد. مطالعات نشان می‌دهد که میزان ROC با میزان TSS همبستگی بالایی دارد. بنابراین در مطالعاتی که نتایج آن به صورت نقشه‌ی حضور و عدم حضور است TSS می‌تواند جایگزین مناسبی برای ROC باشد (Thuiller, 2003). در بسیاری از مطالعات TSS را به عنوان شاخصی کارآمد برای بررسی عملکرد مدل‌های پیش‌بینی شده توصیه کرده‌اند (Allouche *et al.*, 2006). در ادامه برای دستیابی به یک نگرش جغرافیایی

از مناطقی که دارای شرایط اقلیمی مناسب برای گونه‌ی مورد مطالعه هستند، نقشه مطلوبیت زیستگاه در بصورت گسسته برای هر یک از آنها به تصویر کشیده شد. نقشه مطلوبیت به دست آمده به وسیله هر یک از مدل‌ها، مطلوبیت زیستگاه را از صفر تا ۱۰۰۰ بیان می‌کند. صفر کمترین احتمال و ۱۰۰۰ بیشترین احتمال حضور گونه است. برای درک بهتر پراکنش گونه، نقشه دو طبقه‌ای شامل زیستگاه‌های نامطلوب بین ۰ تا ۴۰۰ و زیستگاه‌های مطلوب بین ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ تهیه شد (Gutiérrez et al., 2014).

نتایج

نتایج صحت‌سنجی نشان می‌دهد که تمامی مدل‌های استفاده شده در روند مدل‌سازی از صحت خوب و قابل قبولی برخوردار هستند (جدول ۲). مقادیر TSS و ROC حاکی از آن است که به ترتیب مدل‌های MARS و GBM و در رتبه‌های بعدی ANN، RF، FDA دارای صحت بالاتری در ارزیابی عملکرد مدل‌سازی پراکنش زیستگاه غاز پیشانی سفید در سطح ایران هستند، همچنین مقادیر شاخص‌ها نشان می‌دهد که مدل SRE عملکرد نسبتاً متوسطی در روند ارزیابی صحت مدل‌سازی دارد.

جدول ۲- میزان ROC و TSS گونه‌ی *Anser albifrons*

Table 2: TSS and ROC levels of *Anser albifrons*

مدل	GBM	GAM	GLM	CTA	ANN	MARS	SRE	RF	FDA
TSS	۰/۹۵	۰/۶۹	۰/۸۸	۰/۷۴	۰/۹۰	۰/۹۵	۰/۴۲	۰/۹۰	۰/۹۰
ROC	۰/۹۷	۰/۸۲	۰/۹۲	۰/۹۵	۰/۹۶	۰/۹۷	۰/۷۱	۰/۹۷	۰/۹۶

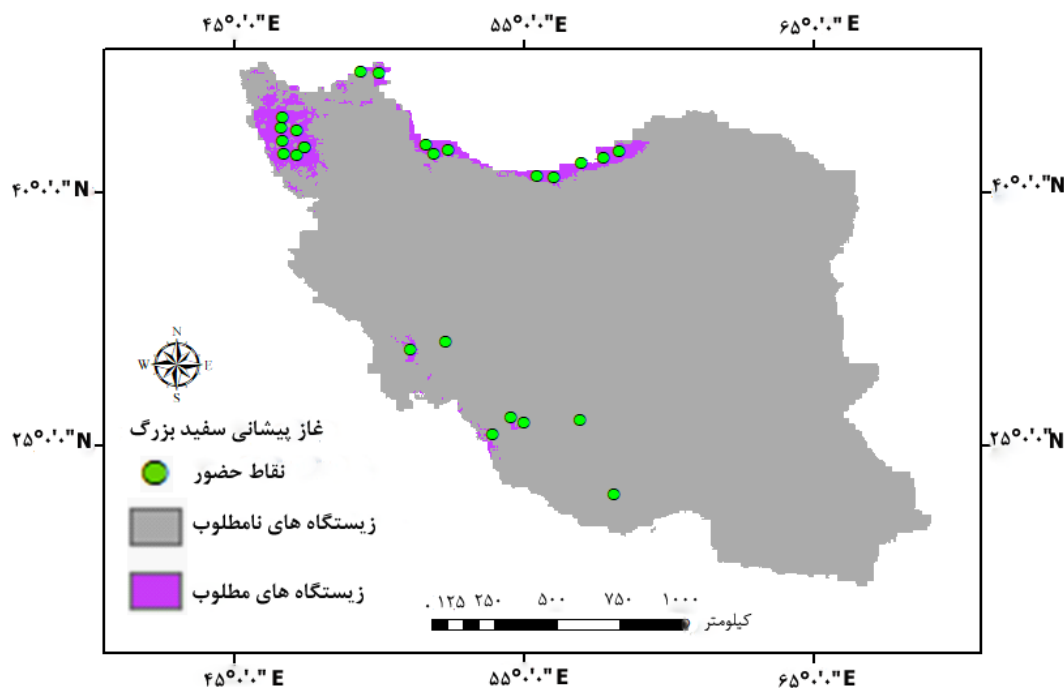
نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تمامی پارامترهای زیست‌محیطی بکار برده شده در مدل‌سازی اهمیت زیادی در پراکنش غاز پیشانی سفید دارند، با این حال پارامترهایی نظیر میزان بارش سالیانه، فاصله تا زمین‌های کشاورزی دیم، بارش گرمترین فصل سال و فاصله تا تالاب‌ها بیشترین اثر را در نحوه‌ی انتخاب زیستگاه توسط گونه‌ی مورد مطالعه دارند. در این میان پارامترهایی مانند فاصله تا مناطق حفاظت شده، فاصله تا نهرها و همچنین فاصله تا جاده‌ها دارای اهمیت نسبتاً کمتری نسبت به مابقی پارامترها در پراکنش گونه‌ی مورد مطالعه هستند (شکل ۳ و جدول ۳).

جدول ۳ - اهمیت نسبی پارامترهای زیست محیطی گونه‌ی *Anser albifrons*

Table 3. Relative importance of environmental parameters of *Anser albifrons* species

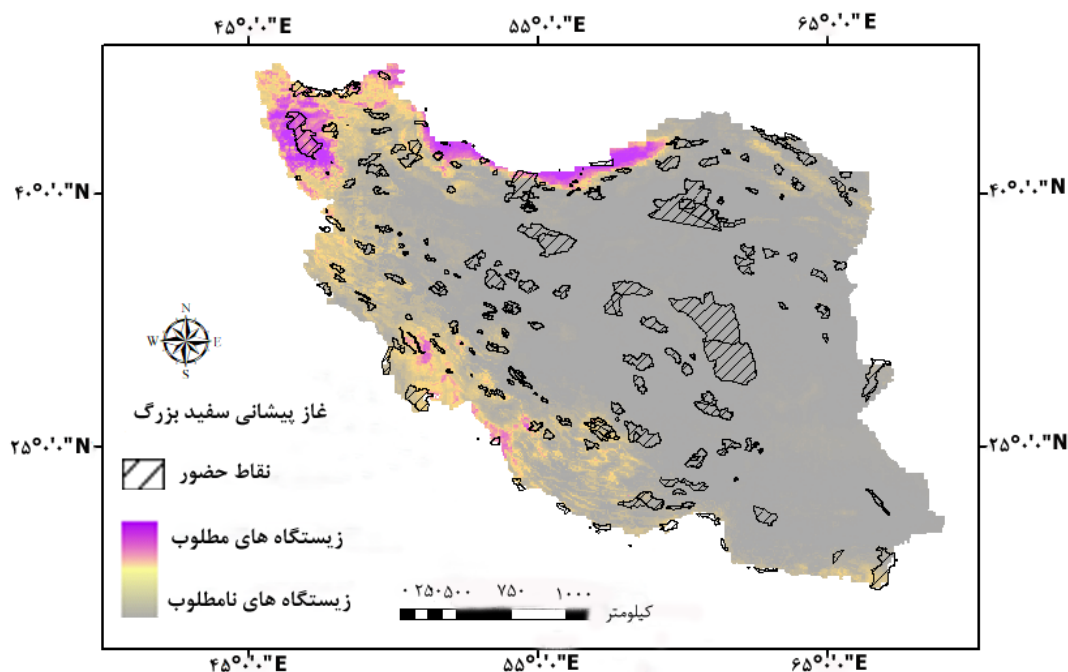
نام پارامتر	میزان اهمیت پارامتر	نام پارامتر	میزان اهمیت پارامتر
فاصله تا رودخانه	۰/۹۹	فاصله تا زمین‌های کشاورزی دیم	۱
ارتفاع از سطح دریا	۰/۹۳	دمای متوسط سالانه	۰/۹۱
فاصله تا روستا	۰/۷۸	میانگین دمای گرم‌ترین فصل سال	۰/۸۹
شیب	۰/۷۳	میزان بارش سالانه	۱
فاصله تا شهر	۰/۹۱	میزان بارش فصلی	۰/۹۳
فاصله تا نهرها	۰/۵۵	بارش پر باران‌ترین فصل سال	۰/۹۸
فاصله تا جنگل	۰/۹۰	بارش کم باران‌ترین فصل سال	۰/۷۶
فاصله تا تالاب	۱	بارش گرم‌ترین فصل سال	۱
فاصله تا زمین‌های کشاورزی آبی	۰/۷۴	فاصله تا مراتع	۰/۷۶
شاخص پوشش گیاهی (NDVI)	۰/۷۱	فاصله تا مناطق حفاظت شده	۰/۰۹
جامعه گیاهی	۰/۸۵	فاصله تا مناطق کویری و بیابان	۰/۹۵
فاصله تا جاده ها	۰/۸۵		

در روند مدلسازی، مدل‌هایی با میزان TSS پائین تر از ۰/۷ از روند مدلسازی حذف شدند و مابقی مدل‌ها با یکدیگر تجمیع شدند که به عنوان نقشه مطلوبیت زیستگاه ارائه شد. نقشه مطلوبیت زیستگاه‌های گونه‌ی مورد نظر در شکل ۱ آورده شده است. همانطور که مشهود است از کل مساحت ایران تنها ۷/۰۳ درصد به عنوان زیستگاه‌های مطلوب شناخته می‌شود که با نقاط حضور گونه همپوشانی بسیاری دارد، همچنین نتایج آنالیز همپوشانی نقشه، مطلوبیت زیستگاه غاز پیشانی سفید و مناطق حفاظت شده نشان می‌دهد که ۷/۹۴ درصد از کل زیستگاه‌های مطلوب را مناطق حفاظت شده در بر می‌گیرند (شکل ۲).



شکل ۱- نقشه مطلوبیت زیستگاه و پراکندگی نقاط حضور *Anser albifrons*

Figure 1. Habitat suitability map and dispersal of *Anser albifrons*



شکل ۲- نقشه مطلوبیت زیستگاه گونه‌ی *Anser albifrons* و میزان همپوشانی با مناطق حفاظت شده

Figure 2. Habitat map of *Anser albifrons* species and extent of overlap with protected areas

بحث و نتیجه گیری

تغییرات اقلیم ناشی از فعالیت‌های انسانی به یک تهدید جدی در زمینه‌ی تنوع‌زیستی در سطح کلان تبدیل شده است. بر اساس مطالعات انجام شده پیشبینی شده است، اگر میانگین دمای جهانی ۳ - ۲ درجه سانتیگراد بالاتر از میانگین جهانی شود، احتمالاً ۲۰ تا ۳۰ درصد گونه‌های جهان در معرض انقراض قرار خواهند گرفت (Leemans *et al.*, 2006). نرخ بالای انقراض‌ها تحت تاثیر پیامدهای تغییر اقلیم باعث ایجاد برنامه‌های کاربردی جهت ارائه اقدامات حفاظتی پیشگیرانه و شناسایی گونه‌ها و زیستگاه‌های آسیب‌پذیر به تغییرات اقلیم شده است (IPCC, 2007; Hannah *et al.*, 2007). در حال حاضر کشور ایران، با میانگین بارش سالیانه ۲۴۲ میلیمتر در سال، در یکی از خشک‌ترین مناطق جهان قرار دارد. طبق مطالعات انجام شده کشور ایران تا سال ۲۰۵۰ با کاهش ۲۵ - ۲۰ درصدی میزان بارش‌ها در فصل بهار و تابستان روبه رو خواهد شد (Madadi & Madadi, 2011). بر همین اساس به نظر می‌رسد، گونه‌های حیات وحش بخصوص گونه‌های آبی مهاجر تحت تاثیر تغییرات اقلیمی قرار گیرند. با توجه به چالش‌های ایجاد شده در زمینه‌ی حفاظت از گونه‌ها، روش‌های مختلف مدلسازی به خصوص پکیج Biomod 2 جهت ارزیابی برنامه‌های کاربردی مدیریت تنوع‌زیستی در سراسر جهان ایجاد شده‌اند. در این پکیج هر مدل بر اساس الگوریتم خاصی اجرا می‌شود. استفاده تنها از یک روش در مدلسازی مطلوبیت زیستگاه نمی‌تواند خروجی قابل اعتمادی داشته باشد. لذا استفاده از مدل‌های متفاوت و مقایسه نتایج آن همواره تأکید شده است. در مطالعه‌ی حاضر نیز جهت مدلسازی مطلوبیت زیستگاه گونه‌های مورد مطالعه از نه روش مدلسازی استفاده شد، در حالی که در مطالعات بسیاری همچون (Sangoony *et al.*, 2017; Jafarian & Kargar, 2017; Amiri *et al.*, 2019; Valavi *et al.*, 2016; Haidarian Aghakhani *et al.*, 2017) روش‌های مدلسازی به‌منظور مدلسازی مطلوبیت زیستگاه گونه استفاده شده است. تعداد بیشتر مدل‌های استفاده شده در این مطالعه فرصت انتخاب بهترین مدل را برای ما فراهم کرده است. مطالعات بسیاری در جهان به بررسی پراکنش پرندگان تحت عوامل محیطی پرداخته‌اند (Foden *et al.*, 2013; ShariatiNajafabadi *et al.*, 2016; Gaudreau *et al.*, 2018) در این مطالعه برای اولین بار مطلوبیت زیستگاه گونه غاز پیشانی سفید تحت تاثیر عوامل زیست‌محیطی در سطح ایران مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل پارامترهای مورد استفاده در این مطالعه نشان می‌دهد که میزان بارش سالیانه تاثیر بسزایی در پراکنش غاز پیشانی سفید دارد، بنابراین احتمال حضور گونه در مناطقی با بارندگی زیاد افزایش می‌یابد. فاصله تا زمین‌های کشاورزی دیم نیز از عواملی است که در پراکنش گونه حائز اهمیت هستند، این پارامتر به دلیل شرایط زیستی نامساعد مانند میزان بارش‌ها و دمای مناسب به عنوان یک عامل بازدارنده عمل می‌نماید، بدین صورت که هر چه فاصله از این مناطق بیشتر باشد احتمال حضور گونه افزایش می‌یابد. همچنین بارش گرمترین فصل سال و فاصله تا تالاب‌ها از پارامترهایی است که طبق نتایج این مطالعه اهمیت

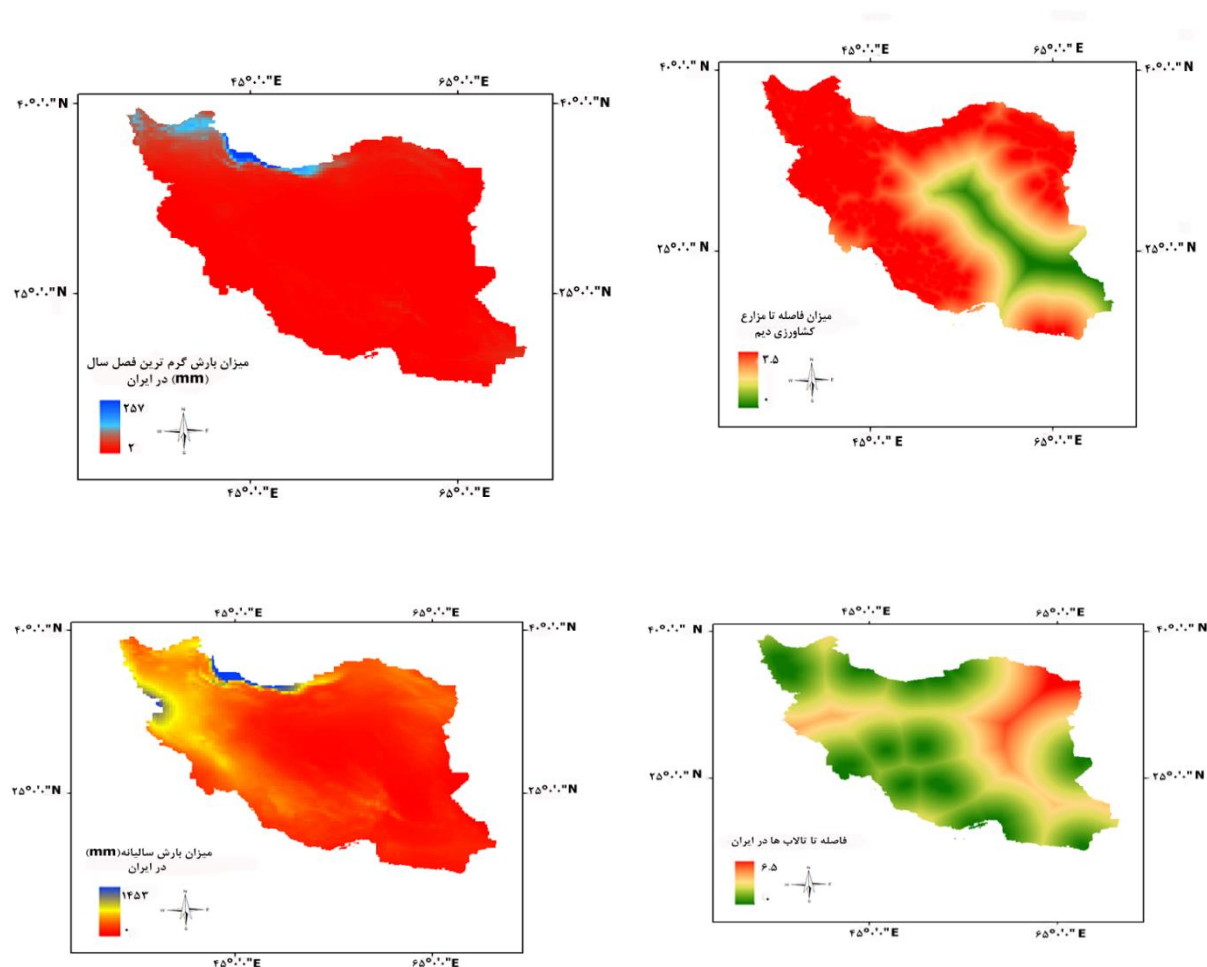
زیادی در تعیین مطلوبیت زیستگاه غاز پیشانی سفید دارد. پارامترهایی نظیر فاصله تا مناطق حفاظت شده، فاصله تا نهرها و همچنین فاصله تا جاده‌ها دارای اهمیت کمتری نسبت به پارامترهای مرتبط با دما و بارش در پراکنش گونه‌ی مورد مطالعه هستند، این نتایج به معنی عدم اهمیت متغیرهای مورد استفاده دیگر نیست. تمامی متغیرهای مورد استفاده به نوبه‌ی خود دارای نقش بسزایی در پراکنش گونه‌ی غاز پیشانی سفید هستند، بنابراین می‌بایست این نکته حائز اهمیت در مطالعات زیست‌محیطی و حفاظتی مورد توجه قرار گیرد.

نتایج حاصل از مدل‌سازی در سطح ایران نشان داد که زیستگاه مطلوب این گونه عمدتاً در مناطق آبی نظیر تالاب‌ها، رودخانه‌ها و آبگیرهای سواحل جنوبی دریای خزر، سواحل شمالی خلیج فارس و همچنین در استان‌های آذربایجان (تالاب‌های اطراف دریاچه ارومیه) و به صورت اندک در اکوسیستم‌های آبی جنوب کشور شامل استان‌های فارس و خوزستان قرار دارد. در حال حاضر بسیاری از بخش‌های جنوبی دریای خزر شامل تالاب لوندویل و تالاب استیل و تالاب‌های استان آذربایجان غربی به دلیل شرایط مساعد زیستی پتانسیل بالایی جهت جذب این گونه طی فصول مهاجرت دارند. در گذشته برخی تالاب‌های استان فارس و هرمزگان دارای زیستگاه‌های مناسبی جهت جذب این گونه بوده‌اند، اما به دلیل تغییرات اقلیمی این مناطق در حال حاضر مستعد جذب گونه غاز پیشانی سفید نیستند. بنابراین می‌توان با اتخاذ اقدامات حفاظتی مناسب زمینه جذب معرفی مجدد گونه به این مناطق را فراهم نمود. این مناطق ۷/۰۳ درصد از کل مساحت سطح ایران معادل ۱۱۹۹۱/۵۵ کیلومتر را پوشش می‌دهند، همچنین ۷/۹۴ درصد از سطح زیستگاه‌های مطلوب این گونه معادل ۱۴۹۲۷/۲۲ کیلومتر درون مناطق حفاظت شده قرار دارند.

Asadian و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای که به تعیین عوامل مؤثر بر الگوی جغرافیایی غنای گونه‌ای پرندگان حوزه شهرستان سرخس پرداختند، بیان نمودند که پارامتر میزان بارش به‌عنوان مهمترین عامل در توزیع و پراکنش گونه‌ای پرندگان در حوزه شهرستان سرخس نقش مهمی را ایفا می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۳ جهت بررسی ارتباط بین پارامترهای زیست‌محیطی و چگونگی انتخاب زیستگاه توسط غاز پیشانی سفید با استفاده از پکیج BIOMOD انجام شد، مشخص شد که پارامترهای مرتبط با اقلیم و توپوگرافی نظیر میزان دما و بارش، ارتفاع، شیب و فاصله تا نزدیکترین آب‌های داخلی با نحوه پراکنش این گونه در زیستگاه‌های مطلوب زمستان‌گذرانی، زادآوری و دوره‌های مختلف مهاجرت در ارتباط هستند. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Kasprzykowski و Polakowski در سال ۲۰۱۶ انجام شد، صحت نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر را نشان می‌دهد. بدین صورت که آنها در این مطالعه به تجزیه و تحلیل تأثیر پارامترهای اقلیمی و تأثیر آن بر پراکنش جمعیت و سایت‌های جستجوی غذا در دو گونه‌ی *Anser albifrons* و *Anser anser* پرداختند که نتایج نشان دادند اولویت تغذیه‌ای و زیستی این دو گونه در مناطقی با بارندگی زیاد و دمای کم هستند.

در مطالعه‌ی حاضر نیچ‌های اقلیمی، نیچ‌های واقعی هستند. به طور کلی در مورد گونه *Anser albifrons* پارامترهای اقلیمی در پراکنش این گونه بیشترین اهمیت را دارند، بنابراین گونه‌ها جهت سازش با تغییرات محیطی دامنه پراکنش و نقاط حضور خود را تغییر می‌دهند. لذا نیاز به ساخت و توسعه مناطق حفاظت شده جدید برای حفاظت از این گونه‌ها وجود دارد. در اینجا می‌بایست به این نکته توجه نمود که تغییرات اقلیمی به تنهایی نمی‌تواند عامل ساخت و توسعه مناطق حفاظت شده باشد، لذا در همین راستا ضروری‌ست سایر عوامل محیطی نیز در نظر گرفته شود. مناطق حفاظت شده همواره یکی از مهمترین و موثرترین ابزارهای حفاظت از تنوع‌زیستی در سطح جهان هستند. ایجاد مناطق حفاظت شده جدید باعث بهبود حفاظت این گونه‌ها در برابر اثرات مخرب ناشی از تغییرات اقلیم می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده حداقل ۱۴۰۰ گونه از مهره‌داران در هیچکدام از مناطق حفاظت شده قرار ندارند. این موضوع نشان دهنده وجود بخش بزرگی از تنوع‌زیستی در خارج از مناطق حفاظت شده است (Wauchope et al., 2017; Hannah et al., 2007; Carvalho et al., 2017). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز ضرورت تجدید نظر در مرزبندی مناطق حفاظت شده در ایران را نشان می‌دهد.

این مطالعه جهت شناسایی پارامترهای مختلف محیطی موثر بر نحوه انتخاب زیستگاه توسط گونه‌های آبی می‌هاجر، روش جدیدی را در بوم‌شناسی رفتار معرفی می‌کند. این امر به ویژه از نظر حفاظت و از نظر اقتصادی با هدف کاهش تعارضات احتمالی بین غازها و منافع کشاورزی بسیار مهم است. پکیج Biomod 2 یک دیدگاه منحصر به فرد پویا در مورد چگونگی انتخاب زیستگاه و عوامل موثر بر آن را روشن می‌سازد. داشتن تخصص کافی در این زمینه برای برنامه‌ریزی حفاظت امری موثر است. مدل‌های توزیع گونه‌ای، آگاهی مدیران نسبت به اثرات تغییر اقلیم بر گونه‌ها را افزایش می‌دهند و ابزارهای مفید و مقرون به صرفه‌ای برای استفاده آنها فراهم می‌کند. همچنین داشتن تخصص کافی در زمینه‌ی انتخاب زیستگاه‌های مطلوب توسط گونه‌ها نقش مهمی در مدیریت راهبردی و کاهش تعارضات بین انسان و گونه‌های حیات وحش ایفا می‌کند. روش پیشنهادی در این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های حفاظتی به جهت پیش بینی رابطه گونه‌ها با تغییرات سریع شرایط محیطی ادغام شود.



شکل ۳- نقشه مهم‌ترین پارامترهای زیست محیطی

Figure 3. Map of the most important environmental parameters

پیوست‌ها

منابع

- Abraham, K.F., Jefferies, R.L. and Alisauskas, R.T. (2005). The dynamics of landscape change and snow geese in mid-continent North America. *Glob. Chang. Biol.*, 11, 841–855.
- Alerstam, T., Lindström, Å., (1990). Optimal Bird Migration: the Relative Importance of Time, Energy, and Safety, *Bird Migration*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 331–351.

- Allouche, O., Tsoar, A., & Kadmon, R. (2006). Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). *Journal of applied ecology*, 43(6), 1223-1232.
- Amiri M., Tarkesh M., Jafari R., (2019). Predicting The Climatic Ecological Niche Of *Artemisia Aucheri* Boiss In Central Iran Using Species Distribution Modeling. *Iranian Journal Of Applied Ecology* , Vol. 8 (2) , 61 - 79.
- Asadian, M., Aliabadian, M., Riyazi, B., (2014). The Role of Environmental Factors on Species Richness Pattern of Birds in Sarakhs. *Conservation and Utilization of Natural Resources*, Vol. 2 (1)., <http://ejang.gau.ac.ir>.
- Austin, M. P., Cunningham, R. B., & Fleming, P. M. (1984). New approaches to direct gradient analysis using environmental scalars and statistical curve-fitting procedures. *Vegetatio*, 55(1), 11-27.
- Breiman, L. Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. (1984). *Classification and regression trees*. Belmont, California. Wadsworth International Group.
- de Carvalho, D. L., Sousa-Neves, T., Cerqueira, P. V., Gonsioroski, G., Silva, S. M., Silva, D. P., & Santos, M. P. D. (2017). Delimiting priority areas for the conservation of endemic and threatened Neotropical birds using a niche-based gap analysis. *PloS one*, 12(2).
- de Roder, F. E., Bijlsma, R. G., & Klomp, J. (2008). Tweede broedgeval van de Zeearend *Haliaeetus albicilla* in Nederland. *De takkeling*, 16(2), 100-123.
- Ebbinge, B. S., Vanbiezen, J. B., & Vandervoet, H. (1991). Estimation of annual adult survival rates of barnacle geese *Branta-Leucopsis* using multiple resightings of marked individuals. *Ardea*, 79(1), 73-112.
- Elith, J., Franklin, J. (2013). Species Distribution Modeling, in *Encyclopedia of Biodiversity* (Second Edition), S.A. Levin, Editor. Academic Press, Waltham. p. 692-705.
- Faaborg, J., Holmes, R. T., Anders, A. D., Bildstein, K. L., Dugger, K. M., Gauthreaux Jr, S. A., Heglund, P., Hobson, K. A., Jahn, A. E., Johnson, D. H., Latta, S. C., Levey, D. J., Marra, p. p., Merkord, C. L., Nol, E., Rothstein, I., Sherry, T. W., Sillett, S., Thompson III, F. R., Warnock. N., (2010). Conserving migratory land birds in the New World: Do we know enough? *Ecological applications*, 20(2), 398-418.
- Fielding, A. H., & Bell, J. F. (1997). A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental conservation*, 24(1), 38-49.
- Foden, W. B., Butchart, S. H., Stuart, S. N., Vié, J. C., Akçakaya, H. R., Angulo, A., DeVantier, L. M., Gutsche, A., Turak, E., Cao, L., Donner, S. D., Katariya, V., Bernard, R., Holland, R. A., Hughes, A. F., O'Hanlon, S. E., Garnett, S. T., Şekercioğlu, C. H., Mace, G. M., (2013). Identifying the world's most climate change vulnerable species: a systematic traitbased assessment of all birds, amphibians and corals. *PloS one*, 8(6).
- Fox, A.D., Madsen, J., Boyd, H., Kuijken, E., Norriss D.W., Tombre, I.M. and Stroud D.A. (2005). Effects of agricultural change on abundance, fitness components and distribution of two arcticnesting goose populations. *Glob. Chang. Biol.*, 11, 881–893.
- Franklin, J. (2010). *Mapping species distributions: spatial inference and prediction*. Cambridge University Press.
- Friedman, J. H. (1991). Multivariate adaptive regression splines. *The Annals of Statistics* 19:1–67.
- Gaudreau, J., Perez, L., & Harati, S. (2018). Towards Modelling Future Trends of Quebec's Boreal Birds' Species Distribution under Climate Change. *ISPRS International Journal of Geo- Information*, 7(9), 335.
- Guisan, A., & Thuiller, W. (2005). Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology letters*, 8(9), 993-1009.

- Gutiérrez, E. E., Boria, R. A., & Anderson, R. P. (2014). Can biotic interactions cause allopatry? Niche models, competition, and distributions of South American mouse opossums. *Ecography*, 37(8), 741-753.
- Haidarian Aghakhani M., Tamartash R., Jafarian Z., Tarkesh Esfahani M., Tatian M.R. (2017). Forecasts Of Climate Change Effects On *Amygdalus Scoparia* Potential Distribution By Using Ensemble Modeling In Central Zagros. *Journal Of Rs And Gis For Natural Resources* , Vol, 8 (3), 1 - 14.
- Hannah, L., Midgley, G., Andelman, S., Araújo, M., Hughes, G., Martinez-Meyer, Pearson, R., Williams, P. (2007). Protected area needs in a changing climate. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(3), 131-138.
- Harrell Jr, F. E., Lee, K. L., & Mark, D. B. (1996). Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Statistics in medicine*, 15(4), 361-387.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Buja, A. (1994). Flexible discriminant analysis by optimal scoring. *Journal of the American statistical association*, 89(428), 1255-1270.
- IPCC, A. (2007). Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 1.
- Jafarian, Z., Kargar, M., (2017). Distribution Modeling Of Protective And Valuable Plant Species In The Tourist Area Of Polour Using Generalized Linear Model (Glm) And Generalized Additive Model (Gam). *Geography And Development* , Vol. 15 (46), 117 - 132.
- Jankowiak, L., Antczak, M., Tryjanowski, P. (2008). Habitat use, food and the importance of poultry in the diet of the red fox *Vulpes vulpes* in extensive farmland in Poland. *World Appl. Sci. J.* 4, 886–890.
- Jetz, W. & Rahbeck, C. (2002) Geographic range size and deter-minants of avian species richness. *Science*, 297, 1548 –1551.
- Jiménez-Valverde, A., Barve, N., Lira-Noriega, A., Maher, S. P., Nakazawa, Y., Papeş, M., & Peterson, A. T. (2011). Dominant climate influences on North American bird distributions. *Global Ecology and Biogeography*, 20(1), 114-118.
- Kaboli, M., Aliabadian, M., Tohidifar, M., Hashemi, A., Musavi, S. B., & Roselaar, C. C. (2016). Atlas of birds of Iran. *Jahad Daneshgahi, Karazmi Branch*.
- Karami, M., Hutterer, R., Benda, P., Siahsarvie, R., Kryštufek, B. (2008). Annotated check-list of the mammals of Iran. *Lynx (Praha)*, n. s., 39(1), 63-102.
- Kear, J. (Ed.). (2005). Ducks, geese and swans: Species accounts (Cairina to Mergus) (Vol. 2). Oxford University Press.
- Khaleghizadeh, A. (2020). Atlas of Birds of Iran. Mohammad Kaboli, Mansour Aliabadian, Mohammad Tohidifar, Alireza Hashemi, Seyed Babak Musavi and Cees C. Roselaar. Iran Department of the Environment, Tehran. 617 pp. *Journal of Animal Diversity*, 2(1), 100-103.
- Leemans, R., Rounsevell, M. D. A., Midgley, G. F., Price, J. T., Fischlin, A., Dube, O. P., Turley, C. (2006). Ecosystems, their properties, goods and services.
- Li, X., Tian, H., Wang, Y., Li, R., Song, Z., Zhang, F. & Li, D. (2013). Vulnerability of 208 endemic or endangered species in China to the effects of climate change. *Regional Environmental Change*, 13(4), 843-852.
- Madadi, A., Madadi, D., (2011). Climate change on vegetation and ecosystem. National Conference on Climate change and its impact on agriculture and environment, Urmia. <https://civilica.com/doc/123385>.

- Madsen, J., Cracknell, G. and Fox, A.D. (eds) (1999). Goose populations of the western Palearctic. Wetlands International Pub. No. 48. National Environmental Research Institute, Denmark.
- Menu, S., Gauthier, G., & Reed, A. (2002). Changes in survival rates and population dynamics of greater snow geese over a 30-year period: implications for hunting regulations. *Journal of Applied Ecology*, 91-102.
- Nix, H. A. (1986). A biogeographic analysis of Australian elapid snakes. *Atlas of elapid snakes of Australia*, 7, 4-15.
- Nouri Jangi, M., 2014, Assessing the situation and threats to biodiversity in Iran. The second national and specialized conference on environmental research in Iran. Hamedan. <https://civilica.com/doc/293025>.
- Osborne, P. E., Alonso, J. C., & Bryant, R. G. (2001). Modelling landscape-scale habitat use using GIS and remote sensing: a case study with great bustards. *Journal of applied ecology*, 38(2), 458-471.
- Owen, M. (1980). *Wild geese of the world*. -London, BT Bastford Ltd.: 1-230.
- Paradis, E., Baillie, S. R., Sutherland, W. J., Dudley, C., Crick, H. Q., & Gregory, R. D. (2000). Large-scale spatial variation in the breeding performance of song thrushes *Turdus philomelos* and blackbirds *T. merula* in Britain. *Journal of Applied Ecology*, 37, 73-87.
- Polakowski, M., & Kasprzykowski, Z. (2016). Differences in the use of foraging grounds by Greylag Goose *Anser anser* and White-fronted Goose *Anser albifrons* at a spring stopover site. *Avian Biology Research*, 9(4), 265-272.
- Priti, H., Aravind, N. A., Shaanker, R. U., & Ravikanth, G. (2016). Modeling impacts of future climate on the distribution of Myristicaceae species in the Western Ghats, India. *Ecological Engineering*, 89, 14-28.
- RASTEGAR, P. N., Kami, H. G., Rajabzadeh, M., Shafiei, S., & Anderson, S. C. (2008). Annotated checklist of amphibians and reptiles of Iran.
- Rosin, Z. M., Skórka, P., Wylegała, P., Krąkowski, B., Tobolka, M., Myczko, Ł., & Tryjanowski, P. (2012). Landscape structure, human disturbance and crop management affect foraging ground selection by migrating geese. *Journal of Ornithology*, 153(3), 747-759.
- Sangoony, H., Vahabi, M., Tarkesh, M., Eshghizadeh, H., Soltani, S (2017). Characterization of ecosystem's climate and geographical distribution of two pasture species using random forest modeling in Central Zagros region. *Journal of Plant Ecosystem Conservation*, 5 (10), 1-17.
- Scott, D.A., Adhami, A., 2006. An updated checklist of the birds of Iran. *Podoces* 1(1/2), 1-16.
- Scott, I., Mitchell, P. I., & Evans, P. R. (1996). How does Variation Body Composition Affect the Basal Metabolic Rates of Birds of Birds?. *Functional Ecology*, 307-313.
- Shariati najafabadi, M., Wang, T., Skidmore, A.K., Toxopeus, A.G., Kölzsch, A., Nolet, B.A., Exo, K.M., Griffin, L., Stahl, J., Cabot, D., 2014. Migratory herbivorous waterfowl track satellite-derived green wave index. *PLoS One* 9, e108331.
- Sillett, T. S., & Holmes, R. T. (2002). Variation in survivorship of a migratory songbird throughout its annual cycle. *Journal of Animal Ecology*, 71(2), 296-308.

- Stralberg D, Matsuoka SM, Hamann A, Bayne EM, Solymos P, Schmiegelow FKA, Wang X, Cumming SG, Song SJ (2015). Projecting boreal bird responses to climate change: the signal exceeds the noise. *Ecological Applications* 25:52–69.
- Thuiller, W. (2003). Biomod—optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Global change biology*, 9(10), 1353-1362.
- Thuiller, W., Lafourcade, B., Engler, R., & Araújo, M. B. (2009). Biomod –a platform for ensemble forecasting of species distributions. *Ecography*, 32(3), 369-373.
- Valavi, R., Motkan, A. A., Shakiba, A., Mirbagheri, B., (2015). Simulation of Climate Change Impact on Zagros Oak Habitat Using Two Artificial Neural Network and Random Forest Algorithms. Fifth Regional Conference on Climate Change, Tehran. <https://civilica.com/doc/557234>.
- Van der Graaf, A. J., Stahl, J., Klimkowska, A., Bakker, J. P., & Drent, R. H. (2006). Surfing on a green wave e How plant growth drives spring migration in the Barnacle Goose *Branta leucopsis*. *Ardea*, 94(3), 565e577.
- Van Eerden, M.R., Drent, R.H., Stahl, J. and Bakke, J.P. (2005). Connecting seas: western Palearctic continental flyway for water birds in the perspective of changing land use and climate. *Glob. Chang. Biol.*, 11, 894–908.
- Wauchope, H. S., Shaw, J. D., Varpe, Ø., Lappo, E. G., Boertmann, D., Lanctot, R. B., & Fuller, R. A. (2017). Rapid climate- driven loss of breeding habitat for Arctic migratory birds. *Global Change Biology*, 23(3), 1085-1094.

Suitability modeling of white-fronted goose (*Anser albifrons* Scopoli 1769) in Iran

F. Bigleri Quchan Atiq¹, A. Farashi^{2*}, M. Shariati Najafabadi³

Received: 2020.10.14

Accepted: 2021.5.15

Abstract

*Today, the dynamic response of aquatic migratory species to the environment and how they choose their habitat has rarely been considered. Due to the need for studies in this field, the present study was conducted to investigate the distribution and environmental parameters affecting the habitat selection of the white-fronted goose (*Anser albifrons* Scopoli, 1769), as a migratory species in Iran. In the present study, four groups of environmental variables including: topographic, climatic and land use/land cover variables were used. Attendance points were obtained using reports from the Environmental Protection Agency. For modeling, 9 algorithms in the BIOMOD package under R software were used. The accuracy of the modeling was evaluated using ROC and TSS indexes. The results showed that parameters such as annual rainfall, distance to rainfed agricultural fields, rainfall of the warmest season, and distance to wetlands, have the greatest impact on the distribution of white-fronted goose.*

Keywords: *BIOMOD, Environmental parameters, Habitat selection, Wetland*

¹ M.Sc. Student, Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

² Associate Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

³ Ph.D, Department of Environment, University of Twente, Netherlands (*Corresponding author: Farashi@um.ac.ir)

بررسی و مقایسه اثر پرایمر در ارزیابی ساختار جوامع باکتریایی خاک مناطق نیمه خشک با روش

Illumina Miseq^۱

مریم تیموری^{۱،۲}، پریسا محمدی^{۳*}، عادل جلیلی^۳، رقیه زارعی^۲

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نوع پرایمر در ارزیابی ساختار جمعیت میکروبی در خاک یک اکوسیستم نیمه خشک بوده است. **مواد و روشها:** DNA نمونه‌های خاک پس از استخراج و انجام PCR با دو جفت پرایمر مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 توالی‌یابی و داده‌ها با نرم افزار QIME آنالیز شدند. **نتایج:** آنالیز Next Generation Sequencing نشان داد پرایمر V4-V5 توانست ۹۷/۹ درصد از باکتری‌ها را شناسایی کند در حالیکه ۹۰/۴ درصد از باکتری‌ها با جفت پرایمر V1-V3 شناسایی شدند. جفت پرایمر V1-V3 توانست درصد بیشتری از Proteobacteria (۳۷/۸ درصد) را شناسایی کند در صورتی‌که جفت پرایمر V4-V5 در شناسایی Actinobacteria (۳۳/۶ درصد) بهتر عمل کرده است. بعلاوه جفت پرایمر V4-V5 در سطوح تاکسونومیکی راسته، خانواده و جنس تعداد بیشتری را در نمونه‌های خاک مطالعه شده در مقایسه با جفت پرایمر V1-V3 شناسایی کرد. **بحث:** با وجود عملکرد بهتر پرایمر V4-V5 و با توجه به اینکه برخی از اجزای سطوح مختلف

این مقاله بر اساس داده‌های پایان نامه دکتر مریم تیموری (بررسی ارتباط بین پتانسیل بهره‌وری خاک با تنوع میکروبی پوسته‌های زیستی خاک مناطق بیابانی)

۱. دانشجوی دکترا، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

(نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)

۳. استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تاکسونومیکی با یکی از جفت پرایمرهای استفاده شده شناسایی شدند به نظر می‌رسد به منظور ارزیابی دقیق‌تر جمعیت‌های میکروبی بهتر است از حداقل دو سری پرایمر استفاده شود.

واژه های کلیدی: تاکسونومی، تنوع زیستی، توالی‌یابی نسل دوم، جامعه میکروبی، میکروبیولوژی خاک

مقدمه

میکروارگانیزم‌های خاک علیرغم کوچک بودن اندازه، موجودات اصلی و مهم خاک بوده و نقش کلیدی در چرخه‌های ژئوشیمیایی ازت، کربن و سایر عناصر در خاک‌های طبیعی و نیز خاک‌های مدیریت شده کشاورزی دارند. به علاوه جوامع میکروبی در فرآیندهای تجزیه‌ای مانند حذف مواد سمی نقش کلیدی دارند و مسئول ۹۰ درصد از فعالیت‌های زیستی و شیمیایی خاک هستند (Wurst et al., 2012).

باوجود اهمیت میکروارگانیزم‌ها در عملکرد و پایداری خاک، هنوز دانش بشری در مورد ساختار و تنوع جوامع میکروبی کم است. نبود روش‌های مناسب، یکی از دلایل عمده فقدان دانش بشری در مورد تنوع زیستی پروکاریوت‌ها در اکوسیستم‌های مختلف از جمله خاک است. در واقع دانش ما در مورد تنوع میکروبی حداقل تا اوایل قرن ۲۱ محدود به میکروب‌های قابل کشت بوده است. شمارش مستقیم در زیر میکروسکوپ نشان داده است که هر گرم خاک دارای بیش از 10^9 باکتری است در حالی که تعداد باکتری‌ها رشد یافته در محیط‌های کشت ۱۰۰-۱۰۰۰ بار کمتر ارزیابی می‌شود (Torsvik & Øvreås, 2002 و Nannipieri, 2003).

طی یک دهه گذشته در حوزه اکولوژی میکروبی، پیشرفت‌های چشمگیری رخ داده است که این پیشرفت مرهون روش‌های جدید متاژنومیکس، و تکنیک‌های توالی‌یابی در این حوزه می‌باشد. استخراج مستقیم DNA و توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی این امکان را برای محققان فراهم کرده است که دنیای میکروارگانیزم‌ها را دقیق‌تر و عمیق‌تر مطالعه کنند (Hamady et al., 2008; Pinto & Raskin, 2012). بعلاوه، پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکنولوژی توالی‌یابی DNA این امکان را فراهم کرده است که بتوان میکروبیوم‌های محیط‌های پیچیده را از نظر تاکسونومیکی شناسایی کرد. با پیشرفت در زمینه تکنولوژی توالی‌یابی، میکروبیولوژیست‌ها توانسته‌اند شاخه‌ها، رده‌ها و جنس‌ها و ژن‌های میکروبی بیشتری را شناسایی کنند، بنحوی که تعداد میکروارگانیزم‌های شناسایی شده در ۱۵ سال اول قرن ۲۱ معادل تعداد میکروارگانیزم‌های شناسایی شده از زمان کشف آن‌ها بوده است. امروزه توالی‌یابی ژن‌های میکروبی به یک تکنیک پر کاربرد در تعیین ترکیب جوامع، تنوع و غنای میکروبی در نمونه‌های محیطی تبدیل شده است. این اطلاعات منجر به افزایش اطلاعات در مورد اثرات آسیب‌های طبیعی و آسیب‌های ناشی

از فعالیت‌های انسانی بر خاک و گیاهان و جوامع میکروبی شده است. توالی‌یابی های نسل دوم همچنین امکان تعیین توالی میکروارگانیسم‌ها را در حجم انبوه فراهم کرده است. بی شک روش‌های جدید توالی‌یابی بعد جدیدی را در تحقیقات تنوع زیستی میکروبی ایجاد کرده است که این تکنولوژی پیچیدگی‌هایی نیز دارد. یکی از مهمترین مراحل در این تکنیک، مرحله انتخاب پرایمری است که در تکثیر بکار می‌رود. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر 16S rDNA اغلب بخشی از نواحی بسیار متغیر 16S rRNA را در بر می‌گیرند که امکان شناسایی تاکسونومیکی در سطح گونه را فراهم می‌آورند (Fredriksson et al. 2013). انتخاب ناحیه متغیر و پرایمرهای مربوطه بایستی با دقت فراوان صورت گیرد تا بیشترین گروه‌های تاکسونومیکی میکروبی را در برگرد و ارزیابی واقعی از گروه‌های میکروبی داشته باشد. استفاده از پرایمرهای نامناسب باعث می‌شود که ارزیابی برخی گروه‌های تاکسونومیکی کمتر از مقدار واقعی باشد یا ارزیابی برخی از گونه‌های خاص، بیش از مقدار واقعی گزارش گردد و نیز موجب صرف هزینه‌های غیرضروری می‌شود.

هدف این مطالعه، بررسی کاربرد و مقایسه دو جفت پرایمر مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 در ارزیابی ترکیب جوامع میکروبی خاک نواحی نیمه بیابانی منطقه حفاظت شده حیات وحش خبر و روچون در دو اقلیم سرد و گرم و منطقه تحت چرا و قرق بود.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون، با ۱۷۰ هزار هکتار وسعت، در محدوده حوزه استحفاظی شهرستان بافت و در فاصله ۴۰ کیلومتری جنوب غرب شهرستان بافت واقع در استان کرمان و ۳۷ کیلومتری شهرستان حاجی‌آباد واقع در استان هرمزگان قرار دارد. میانگین بارندگی‌های سالانه ۲۵۳/۶۹ میلی‌متر و میانگین سالانه دمای روزانه بین ۱۳/۷ تا ۲۵/۳ درجه سانتی‌گراد متغیر است. متوسط تعداد روزهای یخبندان ۷۸ روز در سال و حداکثر میانگین سالانه رطوبت نسبی، ماهانه ۴۷ درصد است. برای نمونه برداری دو منطقه استپی گرم و استپی سرد در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده در منطقه حفاظت شده پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون استان کرمان انتخاب شد (شکل ۱) که مختصات جغرافیایی و ارتفاع و گونه غالب گیاهی آنها در جدول ۱ آورده شده است. در هر کدام از مناطق انتخاب شده یک پلات ۱ هکتاری پیاده شد. با ابزار از پیش استریل شده نمونه خاک از عمق ۱۰-۰ سانتی‌متری برداشت شد. نمونه های خاک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خاک پس از الک کردن (۲ میلی‌متری) و یکدست شدن، برای تعیین تنوع میکروبی با روش‌های مولکولی و نیز استخراج DNA، در فریزر -80°C قرار داده شد (Page, 1982).



شکل ۱- نمایی از مناطق نمونه برداری شده، بالا: راست، گرم دست نخورده و چپ گرم دست خورده. پایین: راست، سرد دست نخورده و چپ سرد دست خورده.

Figure 1. View of sampled areas. Above: right: warm-undisturbed; left: warm-disturbed. Down: right: cold-undisturbed; left: cold-disturbed.

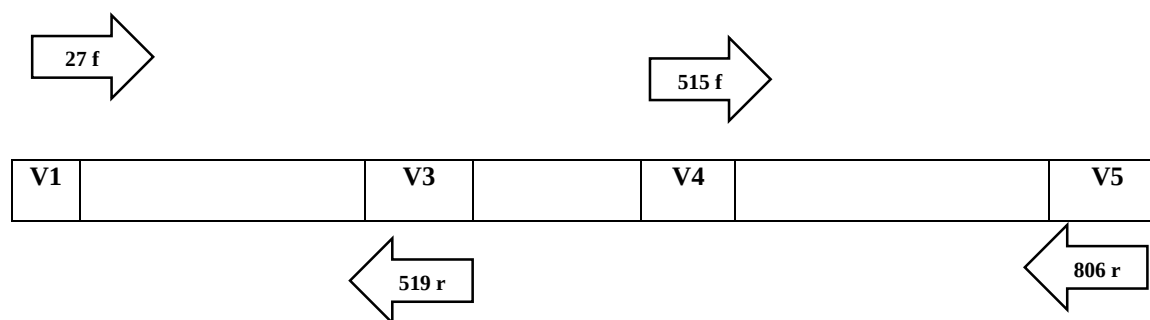
جدول ۱- خصوصیات عمومی مناطق نمونه برداری شده

Table1. General characteristics of sampled areas

گیاه غالب	ارتفاع	مختصات جغرافیایی		منطقه
درمنه	۱۶۵۴	۵۶°۱۸'۰۸"E	۲۸°۳۸'۰۸"N	استپی گرم دست نخورده
درمنه	۱۷۰۷	۵۶°۱۸'۳۹"E	۲۸°۳۹'۵۴"N	استپی گرم دست خورده
درمنه و Stipia	۲۳۸۹	۵۶°۲۳'۰۹"E	۲۸°۵۲'۱۶"N	استپی سرد دست نخورده
درمنه و Stipia	۲۳۶۵	۵۶°۲۲'۵۹"E	۲۸°۵۲'۲۷"N	استپی سرد دست خورده

استخراج DNA و تعیین تنوع باکتریایی

DNA از نمونه‌های خاک با استفاده از کیت PowerSoil® DNA Isolation متعلق به شرکت MO BIO Laboratories, Inc استفاده شد. بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت استخراج شد. کمیت و خلوص DNA با استفاده از نانودراپ (NaNo DROP 2000 spectrophotometer, ThermoScience) تعیین شد. کیفیت و عدم شکستگی مولکول‌های DNA به طریق الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد با بافر ۰/۵ X TBE حاوی تریس بیس، اسید بوریک و اتیلن‌دی‌آمین تتراسات تعیین شد. برای تعیین تنوع میکروبی با روش توالی‌یابی نسل جدید، ابتدا DNA استخراج شده با کیت Whole Genome Amplification (WGA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تکثیر شد و سپس با کمک کیت RNase Cocktail™ Enzyme Mix و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ناخالصی‌های RNA حذف شد. کتابخانه Illumina با تکنولوژی Illumina compatible Nextra Technology, Illumina, Inc, San Diego, CA, USA و بر اساس دستورالعمل دو مرحله‌ای PCR تهیه شد که منجر به تکثیر دو ناحیه V1-V3 و V4-V5 از ژنوم RNA ریبوزومی 16S در باکتری‌ها شد (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر شماتیکی از نواحی متغیر استفاده شده در توالی‌یابی 16S rRNA

Figure 2. Schematic presentation of hypervariable regions used in 16s rRNA sequencing

در اولین دور PCR برای تکثیر ناحیه V1-V3 از جفت پرایمر 27f-519r، و برای تکثیر ناحیه V4-V5 از جفت پرایمر 515f-806r استفاده شد (جدول ۲). پرایمرهای مورد استفاده در روش توالی‌یابی نسل دوم از سه بخش تشکیل شده‌اند که عبارتند از بخش متصل شونده Illumina Nextra adapter، جدا کننده (sapacer) و توالی پرایمر مورد استفاده در تکثیر و توالی‌یابی. این توالی‌ها در جدول بصورت ایتالیک، تیره و خطدار مشخص شده‌اند. ترکیبات موجود در محلول واکنش PCR اول و برنامه زمانی PCR برای جفت پرایمرهای ذکر شده به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده در تهیه کتابخانه Illumina برای تعیین تنوع باکتریایی

Table 2. Sequences of primers used in Illumina library to determine bacterial diversity

پرایمر	توالی
F 27	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TCGATCGGAAGKRGTTYGATYNTGGCTCAG

R 519	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGGACTTGATGTACGAACGINTBACCGCDGCTGCTG</u>
F 515	<u>CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCTGTCATGGAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</u>
R 806	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGTAGCTACGCACGGACTACHVGGGTWTCTAAT</u>

جدول ۳: مخلوط واکنش PCR برای جفت پرایمر F27/R519 و F515/R806

Table 3. PCR reaction mixture for primer pairs of F27/R519 and F515/R806

F 515/R 806	F 27/R 519	
مقدار	مقدار	ترکیب
۱۲/۵ µl	۱۲/۵ µl	GO® taq colorless Master mix
۰/۵ µl	۰/۵ µl	پرایمر پیش رو (۲۰ mM)
۰/۵ µl	۰/۵ µl	پرایمر پس رو (۲۰ mM)
۱ µl	۱ µl	DNA الگو
۱ µl	۱ µl	سرم آلبومین گاوی
۹ µl	۹ µl	آب مقطر دیونیزه
۲۵ µl	۲۵ µl	حجم نهایی

جدول ۴- شرایط واکنش PCR برای تکثیر نواحی (F27/R519) V1-V3 و (F515/R806) V4-V5

Table 4. PCR reaction conditions for amplification of V1-V3 (F27/R519) and V4-V5 (F515/R806) regions

مرحله	پرایمر	نام مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
اول	F 27/R 519	واسرشتی اولیه	۹۵	۴ min	۱
	F 515/R 806		۹۵	۶ min	
دوم	F 27/R 519	واسرشتی	۹۴	۱ min	۳۵
	F 515/R 806		۹۴	۴۵ sec	
	F 27/R 519	اتصال	۵۸	۱ min	
	F 515/R 806		۵۸	۱ min	
	F 27/R 519	طویل شدن	۷۲	۹۰ sec	
	F 515/R 806		۷۲	۹۰ sec	
سوم	F 27/R 519	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min	۱

	۱۰ min	۷۲		F 515/R 806	
۱	Δ min	۴	نگهداری	F 27/R 519	چهارم
	Δ min	۴		F 515/R 806	

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از بافر، الکتروفورز شد. قطعات دارای اندازه مناسب با اندازه ۴۹۰ bp برای ناحیه V1-V3 و ۲۹۰ bp برای ناحیه V4-V5 با استفاده از کیت QIAquick gel extraction و طبق دستورالعمل کارخانه از آگارز جدا شد. محصولات PCR خالص شده در مرکز Molecular and Cellular Imaging Center (MCIC) واقع در مرکز تحقیق و توسعه کشاورزی اوهایو (Ohio Agricultural Research and Development Center; OARDC) وابسته به دانشگاه ایالتی اوهایو تعیین توالی شد. تعیین توالی با دستگاه Illumina MiSeq instrument و با استفاده از MiSeq kit V3 و MiSeq Control Software و Reporter v 2.4.1 صورت گرفت. تعیین توالی نمونه‌ها به صورت دو طرفه (paired-end) و با خوانش ۲×۳۰۰ برای ناحیه V1-V3 و ۲×۱۵۰ برای تکثیر ناحیه V4-V5 انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار QIIME تجزیه و تحلیل شد. توالی‌ها از سایت Basespace به صورت خوانش‌های جداگانه R1 و R2 مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 دانلود شد. ابتدا توالی‌های بارکد نواحی V1-V3 و V4-V5 در R1 و R2 حذف شدند. با استفاده از نرم‌افزار pandaseq 8.2 توالی‌های R1 و R2 هر کدام از نمونه‌ها، به هم متصل و به یک فایل واحد با فرمت fasta تبدیل شد (Masella *et al.*, 2012). پس از اتصال خوانش‌های (R1 و R2) بقیه مراحل بررسی، با ترمینال لینوکس و توسط نرم افزار QIIME v 1.9 انجام شد.

نتایج

تعیین توالی ژنوم RNA ریبوزومی 16S امکان مقایسه ترکیب تاکسونومیکی باکتری‌ها را در نمونه‌های خاک فراهم ساخت. در جدول‌های ۵ و ۶ تعداد شاخه، راسته، رده، خانواده و جنس در هر کدام از مناطق مورد مطالعه در فصل بهار و پاییز با استفاده از جفت پرایمر ناحیه‌های V1-V3 و V4-V5 ارائه شده است.

جدول ۵- تعداد اعضا شناسایی شده توسط پرایمرهای F27/R519 و F515/R806 در فصل بهار در هر کدام از سطوح رده‌بندی در مناطق مطالعه شده

Table 5. Number of members identified by primers F27/R519 and F515/R806 in spring in each of the classification levels in the studied areas

منطقه	پرایمر	شاخه (کل)	شاخه (شناخته شده)	رده (کل)	رده (شناخته شده)	راسته (کل)	راسته (شناخته شده)	خانواده (کل)	خانواده (شناخته شده)	جنس (کل)	جنس (شناخته شده)
سرد دست‌خورده	F 27/R 519	۱۸	۱۸	۵۶	۵۱	۸۷	۶۶	۱۴۱	۸۳	۱۶۸	۵۷
	F 515/R 806	۱۹	۱۹	۶۰	۵۷	۱۰۴	۷۹	۱۶۲	۷۷	۲۰۱	۷۵
سرد دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۹	۱۹	۵۹	۵۶	۱۰۰	۷۴	۱۴۹	۸۹	۱۸۲	۶۱
	F 515/R 806	۱۹	۱۹	۶۳	۵۹	۱۰۴	۸۲	۱۷۲	۹۸	۲۱۲	۸۴
گرم دست‌خورده	F 27/R 519	۱۴	۱۴	۴۴	۴۱	۶۶	۴۷	۹۹	۵۷	۱۱۱	۲۸
	F 515/R 806	۱۷	۱۷	۵۱	۴۷	۸۲	۶۵	۱۳۳	۷۹	۱۵۸	۵۳
گرم دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۹	۱۹	۵۷	۵۱	۹۶	۷۲	۱۳۹	۷۵	۱۶۵	۵۲
	F 515/R 806	۲۰	۲۰	۶۰	۵۷	۱۰۰	۷۹	۱۶۴	۱۰۰	۱۸۹	۶۱

جدول ۶ - تعداد اعضا شناسایی شده توسط پرایمرهای F 27/R 519 و F 515/R 806 در فصل پاییز در هر کدام از سطوح رده‌بندی در مناطق مطالعه شده

Table 6. Number of members identified by primers F27/R519 and F515/R806 in autumn in each of the classification levels in the studied areas

منطقه	پرایمر	شاخه (کل)	شاخه (شناخته شده)	رده (کل)	رده (شناخته شده)	راسته (کل)	راسته (شناخته شده)	خانواده (کل)	خانواده (شناخته شده)	جنس (کل)	جنس (شناخته شده)
سرد دست‌خورده	F 27/R 519	۲۰	۲۰	۵۰	۴۷	۱۲۹	۱۹	۱۲۹	۵۵	۱۵۷	۹۳
	F 515/R 806	۲۰	۲۰	۶۳	۵۹	۱۰۲	۸۳	۱۷۹	۱۰۸	۲۲۰	۷۸
سرد دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۸	۱۸	۵۶	۵۱	۸۹	۲۲	۱۳۴	۵۵	۱۵۹	۱۰۵
	F 515/R 806	۲۱	۲۱	۶۷	۶۴	۱۱۱	۸۹	۱۸۵	۱۰۴	۲۲۰	۷۵
گرم دست‌خورده	F 27/R 519	۱۷	۱۷	۵۲	۴۸	۷۲	۱۷	۱۰۹	۴۵	۱۳۴	۸۸
	F 515/R 806	۱۸	۱۸	۵۴	۵۱	۸۸	۶۶	۱۴۲	۸۸	۱۸۶	۷۰
گرم دست‌نخورده	F 27/R 519	۲۲	۲۲	۶۴	۵۸	۶۴	۲۸	۱۴۴	۶۳	۱۷۱	۱۲۰
	F 515/R 806	۱۸	۱۸	۵۴	۵۲	۹۵	۷۳	۱۶۰	۹۳	۱۹۳	۶۹

با استفاده از پرایمر ناحیه V1-V3، ۲۲ شاخه باکتریایی در نمونه‌های مطالعه شده، مشاهده گردید (جدول‌های ۵ و ۶) که ۱۳ شاخه *Acidobacteria*، *Actinobacteria*، *Armatimonadetes*، *Bacteroidetes*، *Chloroflexi*، *FBP*، *Firmicutes*، *Gemmatimonadetes*، *Nitrospirae*، *Planctomycetes*، *TM7*، *Proteobacteria* و *Verrucomicrobia* در تمام نمونه‌ها ولی با فراوانی متفاوت وجود داشت. در این میان ۱۰ شاخه که بالاترین فراوانی را داشتند حدود ۸۷ درصد فیلوتیپ‌ها را در برمی‌گیرند. شاخه‌های *Actinobacteria* و *Proteobacteria* در هر دو فصل بهار و پاییز، در هر دو منطقه سرد و گرم و نیز نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده شاخه غالب محسوب می‌شوند که پس از آنها شاخه‌های *Chloroflexi*، *Acidobacteria* و *Bacteroidetes* قرار می‌گیرند. با تکثیر DNA باکتریایی با پرایمر ناحیه V4-V5، ۲۱ شاخه باکتریایی در نمونه‌های مطالعه شده مشاهده گردید (جدول‌های ۵ و ۶) که ۹ شاخه *Acidobacteria*، *Actinobacteria*، *Armatimonadetes*، *Bacteroidetes*، *Chloroflexi*، *Planctomycetes*، *TM7*، *Proteobacteria* و *Verrucomicrobia* در تمام نمونه‌ها اما با فراوانی متفاوت مشاهده شد. ۱۰ شاخه که بالاترین فراوانی را داشتند حدود ۹۵ درصد فیلوتیپ‌ها را در برمی‌گیرند. با استفاده از پرایمر V4-V5، در هر دو فصل بهار و پاییز و در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده در منطقه سرد *Proteobacteria* و در منطقه گرم *Actinobacteria* شاخه غالب بودند.

با استفاده از پرایمر ناحیه V1-V3 در نمونه‌های مورد مطالعه، ۶۴ رده باکتریایی یافت شد (جدول‌های ۵ و ۶) که ۱۸ رده در تمام نمونه‌ها مشاهده گردید. حدود ۶۹ درصد فیلوتیپ‌ها را ۱۰ رده غالب تشکیل می‌دهند. رده‌های *Actinobacteria*، *Alphaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria*، *Rubrobacteria* و *Thermoleophilia* در تمام نمونه‌ها و با فراوانی متفاوت یافت شدند. رده‌های *Alphaproteobacteria* (متعلق به شاخه *Proteobacteria*)، *Gammaproteobacteria* (متعلق به شاخه *Proteobacteria*) و *Actinobacteria* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) رده‌های باکتریایی غالب در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده مناطق سرد در فصل بهار هستند. در منطقه گرم رده *Thermoleophilia* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) جایگزین *Gammaproteobacteria* شده است. در نمونه‌های فصل پاییز منطقه سرد، رده *Rubrobacteria* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) جایگزین *Actinobacteria* در هر دو ناحیه دست‌نخورده و دست‌خورده شده است. در منطقه گرم برخلاف فصل بهار، فراوانی نسبی *Thermoleophilia* کم شده است و *Actinobacteria* و *Acidiomicrobia* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) به رده‌های غالب تبدیل شده‌اند. تعداد رده‌های یافت شده در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر ناحیه V4-V5 بیشتر و ۶۷ رده بود که ۱۸ رده در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. حدود ۶۹ درصد فیلوتیپ‌ها را ۱۰ رده غالب تشکیل می‌دهند. در فصل بهار، رده‌های *Gammaproteobacteria*، *Actinobacteria*، *Thermoleophilia* و *Alphaproteobacteria* جزء ۱۰ رده غالب در هر دو منطقه سرد و گرم و

نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده بود اگرچه فراوانی آن‌ها متفاوت بود. در نواحی دست‌خورده در هر دو منطقه سرد و گرم، درصد فراوانی رده Gammaproteobacteria (متعلق به شاخه Proteobacteria) بیش از نواحی دست‌نخورده بود اما در نواحی دست‌نخورده فراوانی Thermophilia بیشتر بود هرچند در هر دو ناحیه دست‌نخورده و دست‌خورده منطقه گرم فراوانی رده Thermophilia بیش از نواحی دست‌نخورده و دست‌خورده منطقه سرد بود. ۱۰ رده غالب در نمونه‌های منطقه سرد یکسان هستند و فقط از نظر فراوانی با هم فرق دارند، اما تفاوت میان نمونه‌های مناطق سرد و گرم در سطح رده نیز کاملاً آشکار است. رده‌های Acidobacteria-6 و Saprospirae فقط در مناطق سرد مشاهده شدند و رده MB-A2-108 در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده نواحی گرم مشاهده شد. نمونه‌های فصل پاییز و در منطقه سرد، در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده رده Alphaproteobacteria با بالاترین درصد فراوانی بود و برخلاف فصل بهار، تفاوتی بین درصد فراوانی Gammaproteobacteria بین نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده وجود نداشت. در منطقه گرم در نواحی دست‌خورده همچنان فراوانی Gammaproteobacteria بیش از نواحی دست‌نخورده بود. اگرچه فراوانی نسبی رده Thermophilia در فصل پاییز، در مقایسه با فصل بهار کاهش یافته بود اما همچنان جزء رده‌های غالب محسوب می‌شد و فراوانی آن‌ها در منطقه گرم بیش از منطقه سرد بود.

در سطح تاکسونومیکی بعدی یعنی رسته، ۱۳۱ رسته در نمونه‌هایی که با پرایمر V1-V3 تکثیر شدند یافت شد. ۱۸ رسته از رسته‌های شناخته شده در همه نمونه‌ها وجود داشت. به‌طور متوسط حدود ۶۰ درصد از باکتری‌ها متعلق به ۱۰ رسته با فراوانی بالاتر بودند. از این میان، رسته Actinobacteriales به عنوان رسته غالب شناسایی شد. در نمونه‌های بهار رسته‌های Oceanospirillales و Aeromonadales فقط در نواحی دست‌خورده مشاهده شدند. رسته Saprospirales نیز منحصراً در نواحی دست‌نخورده مشاهده شد. در نمونه‌های پاییزه، فراوانی Actinobacteriales در منطقه سرد کاهش یافته بود و در این منطقه در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده رسته‌های غالب Sphingomonadales و Rhizobiales بودند (شکل ۵-۳). در منطقه گرم تفاوت بین نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده نیز وجود داشت به‌نحوی که در ناحیه دست‌خورده رسته Aeromonadales و در ناحیه دست‌نخورده رسته Actinobacteriales بالاترین فراوانی را داشتند. توسط جفت پرایمر ناحیه V4-V5، ۱۱۱ رسته در نمونه‌های مطالعه شده، وجود داشت که ۸۹ رسته نام‌گذاری شده بودند. ۴۶ رسته از رسته‌های شناخته‌شده، در همه نمونه‌های وجود داشتند. به طور متوسط حدود ۵۸ درصد از باکتری‌ها به ۱۰ رسته برتر تعلق دارند رسته‌های Oceanospirillales، Actinomycetales، RB4، Solirubrobacterales، Gaiellales، Alteromonadales، Rubrobacterales، Sphingomonadales، Rhizobiales، Saprospirales، و Nitrososphaerales رسته‌های غالب را در نمونه‌های بهار تشکیل می‌دهند. رسته‌های Oceanospirillales، Actinomycetales، Solirubrobacterales، Gaiellales، Rubrobacterales، RB4 و Saprospirales به‌طور مشترک در همه مناطق و نواحی، جزء

راسته‌های غالب بودند. علاوه بر راسته‌های غالب ذکر شده در نمونه‌های بهاره، راسته‌های *Chthoniobacterales*، *Lactobacillales*، *Acidimicrobiales* و *0319-7L14* جزء راسته‌های غالب قرار گرفتند. در نمونه‌های پاییزه، تفاوت مناطق مختلف به‌وضوح دیده می‌شود به‌نحوی که فقط ۵ راسته *Actinomycetales*، *Solirubrobacterales*، *Gaiellales*، *Alteromonadales* و *Rubrobacterales* در تمام مناطق و نواحی مشترک هستند و در نمونه‌های بهاره، راسته اختصاصی برای هیچ کدام از مناطق گرم و سرد و یا نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده مشاهده نگردید. اما در نمونه‌های پاییزه راسته RB1 فقط در مناطق سرد و راسته *Acidimicrobiales* فقط در نواحی گرم مشاهده شد.

در مجموع، ۲۰۱ خانواده مختلف باکتریایی در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر V1-V3 تشخیص داده شد که ۹۷ خانواده آن نام‌گذاری شده‌اند. از این میان، ۵۰ خانواده از خانواده‌های باکتریایی شناخته شده، در همه نمونه‌های مطالعه شده وجود داشتند. حدود ۴۵ درصد از باکتری‌ها با بیشترین فراوانی، متعلق به ۱۰ خانواده هستند. نتایج نشان می‌دهد که وقتی به سمت سطوح پایین تر رده بندی حرکت می‌کنیم تفاوت در ترکیب جمعیت باکتریایی آشکارتر می‌شود، به‌نحوی که فقط ۴ خانواده مشترک در مناطق مختلف وجود دارد. در نمونه‌های بهاره خانواده‌های *Aeromonadaceae* و *Pseudonocardiaceae* به‌ترتیب فقط در نواحی دست‌خورده و منطقه گرم مشاهده شد. در نمونه‌های پاییزه نیز خانواده *Chthoniobacteraceae* و *Gaiellaceae* به‌ترتیب فقط در مناطق سرد و گرم مشاهده شدند. همانند فصل بهار خانواده‌های *Aeromonadaceae* فقط در نواحی دست‌خورده مشاهده شد. در سطح خانواده و در بین ۱۰ خانواده برتر، تعداد بیشتری از خانواده‌ها یافت شد که هنوز شناسایی نشده‌اند. در نمونه‌های تکثیر شده با جفت پرایمرهای متعلق به ناحیه V4-V5، ۱۶۷ خانواده مختلف باکتریایی در نمونه‌ها تشخیص داده شد که ۲۴ خانواده از خانواده‌های باکتریایی شناخته شده، در همه نمونه‌های مطالعه شده وجود داشتند. حدود ۴۱ درصد از باکتری‌ها متعلق به ۱۰ خانواده با بیشترین فراوانی هستند. خانواده‌های *Halomonadaceae*، *Gaiellaceae*، *Shewanellaceae*، *Rubrobacteraceae*، *Geodermatophilaceae*، *Sphingomonadaceae*، *Nitrososphaeraceae*، *Chitinophagaceae*، *Chthoniobacteraceae*، *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae* جزء ۱۰ خانواده غالب در نمونه‌های بهاره مناطق سرد بودند. ۲ خانواده *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae* در مناطق گرم مشاهده نشدند در حالی که خانواده‌های *Campylobacteraceae*، *Streptococcaceae*، *Solirubrobacteraceae* و *Conexibacteraceae* فقط در مناطق گرم مشاهده شدند. در نمونه‌های بهاره فقط ۵ خانواده مشترک در مناطق مختلف وجود داشت. در نمونه‌های فصل بهار، فراوانی خانواده‌های *Halomonadaceae* و *Shewanellaceae* در نواحی دست‌خورده هر دو منطقه سرد و گرم بیش از نواحی دست‌نخورده بود. در نمونه‌های پاییزه منطقه سرد، ۸ خانواده با خانواده‌های مشاهده شده در فصل بهار مشترک بودند و به جای خانواده‌های *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae*، خانواده‌های *Ellin6075* و

Beijerinckiaceae جزء ۱۰ خانواده برتر قرار گرفتند. برخلاف نمونه‌های بهاره، در نمونه‌های پاییزه خانواده *Campylobacteraceae* جزء ۱۰ خانواده برتر قرار نگرفت.

۱۰ جنس برتر به طور متوسط حدود ۳۰ درصد فیلوتیپ‌ها را در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر ناحیه V1-V3 در برمی‌گیرند. بیشترین اختلاف در ترکیب باکتریایی نمونه‌ها در سطح جنس مشاهده شد و جنس‌هایی که جز ۱۰ جنس غالب بودند شناخته شده نیستند که نشان‌دهنده عدم شناخت بخش اعظم تنوع میکروبی در این سطح تاکسونومیکی است. در نمونه‌های بهاره، باکتری *Rubrobacter* و در نمونه‌های پاییزه *Balnimous* و *Rubrobacter* در همه نمونه‌ها جزء ۱۰ جنس غالب بودند. از بین ۲۲۰ جنس باکتریایی مشاهده شده در نمونه‌های تکثیر شده با جفت پرایمر مربوط به ناحیه V4-V5 فقط ۶۹ جنس شناخته شده بود. ۱۰ جنس برتر به طور متوسط حدود ۲۹ درصد فیلوتیپ‌ها را در برمی‌گیرد. در نمونه‌های بهاره، ۴ جنس *Rubrobacter*، *Halomonas*، *Nitrososphaera* و *Geodermatophilus* در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده‌ی هر دو منطقه سرد و گرم یافت می‌شوند. جنس *Prevotella* و *Segetibacter* به ترتیب، جزء ۱۰ جنس غالب نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده قرار گرفتند. فراوانی جنس‌های *Halomonas* و *Shewanella* در نواحی دست‌خورده بیشتر بود در حالی که در نواحی دست‌نخورده جنس *Rubrobacter*، *Candidatus* و *Nitrososphaera* فراوانی بیشتری از خود نشان دادند. در نمونه‌های پاییزه، جنس‌های *Halomonas*، *Shewanella*، *Nitrososphaera* و *Segetibacter* در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده‌ی هر دو منطقه سرد و گرم یافت می‌شوند. در منطقه سرد و گرم بین نمونه‌های فصل بهار و پاییز به ترتیب ۶ و ۵ جنس مشترک یافت شد. در منطقه سرد *Geodermatophilus* و *Bacillus* به ترتیب فقط در نمونه‌های بهاره و پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار گرفتند. در نواحی دست‌خورده منطقه گرم، جنس‌های *Campylobacter* و *Fusobacterium* به ترتیب فقط در نمونه‌های بهاره و پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار گرفتند. جنس‌های *Prevotella* و *Euzebya* فقط در نمونه‌های بهاره جزء ۱۰ جنس غالب قرار می‌گیرند، در حالی که *Bacillus*، *Catonella* و *Marinilactibacillus* فقط در نمونه‌های پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار می‌گیرند.

بحث

در این مطالعه ساختار جمعیت باکتریها در در دو منطقه سرد و گرم دست‌خورده و دست‌نخورده، در دو فصل بهار و پاییز با روش توالی‌یابی نسل دوم و با استفاده از جفت پرایمرهای مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 مطالعه و مقایسه شد. در بالاترین سطح تاکسونومیکی یعنی شاخه در مجموع ۱۴ شاخه در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. تاکنون در کل، ۵۲ شاخه باکتریایی شناخته شده است

(Giovannoni & Rappe, 2003) که به نظر می‌رسد در بیشتر خاک‌ها، شاخه‌های غالب را تعداد معدودی از آن‌ها تشکیل می‌دهند. چنین بنظر می‌رسد که تیمارهای اعمال شده در این مطالعه، بر شاخه‌های غالب تاثیر داشته است به نحوی که *Proteobacteria* و *Actinobacteria* به ترتیب شاخه‌های غالب نواحی دست‌خورده مناطق سرد و گرم را تشکیل می‌دهند. *Actinobacteria* تا ۵۰ درصد جوامع میکروبی را در بسیاری از اکوسیستم‌ها به خود اختصاص می‌دهد که نشان‌دهنده اهمیت نقش آنها در خاک است (Hackl et al. 2010; Bachar et al. 2004). غلبه اعضای شاخه‌های *Proteobacteria* و *Actinobacteria* در محیط‌های نیمه خشک و خاک‌های قلیایی (شرایط مشابه مناطقی که در اینجا بررسی شد) قبلاً گزارش شده است (Aislabie et al. 2009; Makhalanyane et al. 2013; Wang, 2015, McHugh & Schwartz, 2015). شاخه *Chloroflexi* نیز جزء شاخه‌هایی است که فراوانی زیاد آن در خاک بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک و همین‌طور نواحی با شرایط محیطی نامتعارف گزارش شده است (Keshri et al. 2013; Rao et al. 2012). در سطح بعدی رده‌بندی یعنی کلاس، کلاس‌های *Alpha-Proteobacteria* و *Actinobacteria* در تمام نمونه‌ها غالب بودند که با فراوانی زیاد آنها در محیط‌های خاکی و نیز خاک مناطق نیمه‌خشک مطابقت دارد (Castro et al. 2010; Rao et al. 2016). تفاوت در ترکیب باکتریایی در سطوح پایین‌تر رده‌بندی بیشتر مشاهده می‌شود، به نحوی که در سطح خانواده فقط دو خانواده بین مناطق سرد و گرم مشترک بود. در سطح جنس، قسمت عمده‌ای از جنس‌ها به شکل ناشناخته گزارش شد که ممکن است دو دلیل داشته باشد: ۱- وجود تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌هایی که هنوز شناسایی نشده‌اند. ۲- با توجه به استفاده از بانک اطلاعاتی Greengenes، چنین بنظر می‌رسد که این بانک برای شناسایی نمونه‌های محیطی ایران کارآمدی لازم را ندارد. این تفاوت در سطوح پایین‌تر، با نتایج Dowd و همکاران (۲۰۰۸) و نیز Jesus da و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. مقایسه نتایج حاصل از دو جفت پرایمر V1-V3 و V4-V5 برای بررسی ترکیب جمعیت باکتریایی در نمونه‌های خاک، نشان می‌دهد که حداقل در سطح شاخه پرایمر V4-V5 عملکرد بهتری داشت و توانسته است که درصد بالاتری از باکتری‌ها را شناسایی کند (۹۷/۹ درصد در برابر ۹۰/۴ درصد ناحیه دیگر). در ضمن، جفت پرایمر V1-V3 توانسته است درصد بالاتری از *Proteobacteria* (۳۷/۸ درصد) را شناسایی کند حال آنکه جفت پرایمر V4-V5 در شناسایی *Actinobacteria* (۳۳/۶ درصد) عملکرد بهتری داشته است. مقایسه عملکرد دو جفت پرایمر متعلق به نواحی V1-V3 و V4-V5 در جدول ۷ آورده شده است.

شاخه‌های V1-V3، MVP-21، OD1 و WS2 فقط توسط جفت پرایمر V1-V3 و شاخه‌های *Crenarchaeota*، *Fusobacteria* و *Spirochaetes* فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شدند. شاخه‌های MVP-21، OD1 و WS2 فقط بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک از نمونه‌های محیطی مختلف شناسایی شده‌اند و تاکنون در شرایط آزمایشگاهی مه جداسازی آنها صورت نگرفته است.

در سطح بعدی طبقه‌بندی یعنی رده درصد بیشتری از *Alpha-Proteobacteria* و *Gamma-Proteobacteria* توسط پرایمر V1-V3 مشاهده شد. مقدار *Beta-Proteobacteria* شناسایی شده توسط هر دو جفت پرایمر مساوی بود اما درصد *Delta-Proteobacteria* شناسایی شده توسط پرایمر V1-V3 تقریباً دو برابر میزان شناسایی شده توسط جفت پرایمر V4-V5 بود. از نظر تعداد رده شناسایی شده، ۲۹ رده توسط هر دو پرایمر شناسایی شد اما به ترتیب ۳ و ۱۴ رده به شکل انحصاری توسط جفت پرایمر V1-V3 و V4-V5 شناسایی شدند.

جدول ۷- مقایسه کارایی پرایمرهای نواحی V1-V3 و V4-V5 در شناسایی سطوح مختلف رده‌بندی

Table 7. Comparison of primers efficiency V1-V3 and V4-V5 areas in identifying different levels of classification

مشترک	موارد انحصاری V1-V3	موارد انحصاری V4-V5
شاخه	۱۴	۳
رده	۲۹	۱۴
راسته	۵۰	۲۱
خانواده	۵۲	۲۵
جنس	۳۳	۲۵

از بین راسته‌های شناسایی شده، ۵۰ راسته مشترک، ۵ راسته توسط جفت پرایمر V1-V3 و ۲۱ راسته فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شد. در سطح خانواده نیز عملکرد جفت پرایمرها با هم متفاوت بود. علاوه بر ۵۲ خانواده که توسط هر دو جفت پرایمر شناسایی شدند به ترتیب ۱۲ و ۲۵ خانواده توسط جفت پرایمرهای V1-V3 و V4-V5 به شکل انحصاری شناسایی شدند که نشان می‌دهد در این سطح از طبقه‌بندی نیز، جفت پرایمر V4-V5 عملکرد بهتری از خود نشان داده است. در بین جنس‌هایی که شناسایی شدند علاوه بر ۳۳ جنس مشترک، ۹ جنس فقط توسط جفت پرایمرهای V1-V3 شناسایی شد در حالی که ۲۵ جنس فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شد. به نظر می‌رسد با وجود آنکه در بسیاری از مطالعات برای تعیین کنسرسیوم‌های میکروبی به‌ویژه در نمونه‌های کلینیکی در روش‌های مستقل از کشت، استفاده از ناحیه V1-V3 نتایج بهتری داشته و غنای میکروبی بیشتری را نشان داده است (Rintala et al., 2017)، اما نتایج این بررسی نشان داد که ناحیه V4-V5 که با جفت پرایمر 515f/806r تکثیر شده است توانست علاوه بر شناسایی غنای بیشتر در همه سطوح طبقه‌بندی از نظر کمی، درصد بالاتری از DNA میکروبی موجود در نمونه‌ها را نیز تکثیر کند. یافته‌های ما در عملکرد بهتر ناحیه V4-V5 با یافته‌های Tremblay و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد. در واقع بنظر

می‌رسد که خوانش‌های ۲۵۰ جفت بازی paired-end MiSeq که روی هم افتادگی زیادی دارند دارای کیفیت بالاتری بوده و این امر باعث بالا رفتن احتمال مشاهده باکتری‌های از قبل شناخته شده و نیز کشف انواع جدید می‌شود. بنابراین می‌توان گفت انتخاب نوع پرایمر اهمیت بیشتری از نوع پلت فرم مورد استفاده در روش NGS دارد.

نتیجه‌گیری

پرایمرها نقش مهمی در تعیین پروفایل باکتریایی محیط‌های پیچیده مانند خاک، به روش توالی یابی نسل دوم دارند. این نقش به‌ویژه وقتی اهمیت پیدا می‌کند که برخی از اعضای یک جمعیت با استفاده از یک جفت پرایمر خاص نادیده انگاشته و یا بیش از مقدار موجود ارزیابی می‌شوند و در نتیجه موجب خطا در ارزیابی‌ها می‌گردند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات مشابه، حداقل از دو سری پرایمر استفاده شود تا ارزیابی‌ها دقیق‌تر باشد.

تشکر و قدردانی

بخشی از این پژوهش با حمایت معاون محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء و در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی صنعتی دکتر شایسته سپهر انجام شده است که به این ترتیب تقدیر می‌گردد.

منابع

- Aislabie, J., Jordan, S., Ayton, J., Klassen, J. L., Barker, G. M. and Turnerb, S. (2009). Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 21-36.
- Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M.I., Sklarz, M.Y., Angel, R., Ungar, E.D. and Gillor, O. (2010). Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. *Microbial Ecology*, 60: 453-61.
- Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J. and Schadt, C.W. (2010). Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 999–1007.

- da C Jesus, E., Marsh, T. L., Tiedje, J. M., and de S Moreira, F. M. (2009). Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME Journal*, 3: 1004–1011.
- Dowd, S.E., Callaway, T. R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeegan, T., Hagevoort, R. G. and Edrington, T.S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8: 1-8.
- Fredriksson, N.J., Hermansson, M. and Wilen, B.M. (2013). The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8:e76431. doi:10.1371/journal.pone.0076431
- Hackl, E., Bachmann, G. and Zechmeister-Bolternstern, S. (2004). Microbial nitrogen turnover in soils under different types of natural forest. *Forest Ecology and Management*, 188: 101–112.
- Hamady, M., Walker, J.J., Harris, J.K., Gold, N.J., Knight, R. (2008). Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods*, 5: 235–237.
- Keshri, J., Mishra, A. and Jha, B. (2013). .Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics. *Microbiology Research*, 168:165-73
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41: e1
- Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Birkeland, N.K., Cary, S.C., Tuffin, I.M. and Cowan, D.A. (2013). Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities. *The ISME Journal*, 7: 2080–2090.
- Mc Hugh, T.A. and Schwartz, E. (2015). A watering manipulation in a semiarid grassland induced changes in fungal but not bacterial community composition. *Pedobiologia*, 59: 121-127.
- Nannipieri, P., Ascher, J. Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655–670.
- Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D. G., Neufeld, J.D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13, Article number: 31.

- Page, A. L. (1982). *Methods of Soil Analysis. Part 2-Chemical and microbiological Properties*, 2th Edition. American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc 1159 Pp. Wisconsin
- Pinto, A.J. and Raskin, L. (2012). PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLOS ONE*;7: Article e43093.
- Rao, S., Chan, Y., Lacap, D. C., Hyde, K. D., Pointing, S. B. and Farrell, R. L. (2012). Low-diversity fungal assemblage in an Antarctic Dry Valleys soil. *Polar Biology*, 35: 567–574.
- Rao, S., Chan, Y., Bugler-Lacap, D.C., Bhatnagar, A., Bhatnagar, M. and Pointing, S.B. (2016). Microbial diversity in soil, sand dune and rock substrates of the Thar Monsoon Desert. India. *Indian Journal of Microbiology*, 5: 35–45.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-394.
- Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J.P., Laiho, A., Pekkala, S. and Huovinen, P. (2017). Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16S rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *Journal of Biomolecular Techniques*, 28, 19–30.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinions in Microbiology*, 5: 240-245.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E.S. He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J.L. and Tring, S.G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontier in Microbiology*; 6: 771.
- Wang, M., Liu, S., Wang, F., Sun, B., Zhou, J. and Yang, Y. (2015). Microbial responses to southward and northward Cambisol soil transplant. *Microbiology Open*, 4: 931–940.
- Wurst, S., De Deyn, G.B. and Orwin, K. (2012). Soil biodiversity and function. Pages 28-44 in Wall, DH, ed. *Soil Ecology and ecosystem services* Oxford University Press.

Assay and comparison the impact of primer in evaluation of bacterial community structure in semiarid area by Illumina Miseq

M. Teimouri^{1,2}, P. Mohammadi^{1,3*}, A. Jalili³, R. Zarei⁴

Received: 2021.06.10

Accepted: 2021.9.4

Abstract

Introduction: The aim of this study was to compare the effect of primers in evaluating soil bacterial community structure. **Methods and Materials:** For this purpose, soil samples were taken from cold and warm area which grazed (disturbed) or not grazed (undisturbed) in spring and autumn. Microbial DNA was extracted and sequenced after amplification by two primers which amplify V1-V3 and V4-V5 area of 16S rRNA. Next generation sequencing data were analyzed by QIIME to determine bacterial community structure. **Results:** Results showed the effect of area, grazing and season on bacterial community structure. NGS data analysis showed that primers which amplified V4-V5 area identified more bacteria (97.9%) in compared to V1-V3 primers (90.4%). V1-V3 primers had better efficiency to identify Proteobacteria (37.85%) in compared to V4-V5 which identified more Actinobacteria (33.6%). In addition, V4-V5 primers identified more bacteria in class, family and genus taxonomic groups in compared to V1-V3 primer. **Discussion:** Although V4-V5 primer had better efficiency in bacteria identification, it is recommended to use both primers to evaluate precisely bacterial community structure.

Keywords: Biodiversity, Microbial Community, Next Generation Sequencing, Soil Microbiology, Taxonomy

1. PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran-Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Research Center, Al-Zahra University, Tehran.. (*Corresponding author: p.mohammadi@alzahra.ac.ir).

3. Professor, National Forestry and Pasture Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran.

ژئوبوتانی جنس *Onosma* L.(Boraginaceae) در بخش میانی زاگرس مرکزی: رویکرد حفاظتی

فرزانه خواجه‌وئی نسب^۱؛ احمدرضا محرابیان^{۲*}؛ محمدجواد نیکجویان^۳

چکیده

مقدمه: *Onosma* یکی از متنوع‌ترین جنس‌های تیره گاوزبانیان (Boraginaceae) است. مناطق اندمیسیم و مهمترین مراکز تنوع گونه‌ای این جنس در فلات ایران و فلات آناتولی و منطقه مدیترانه واقع شده‌اند. مطالعه حاضر به منظور تعیین الگوهای انتشار و مراکز تنوع و اندمیسیم و شناسایی گونه‌های در معرض تهدید این جنس در بخش میانی زاگرس مرکزی انجام شد. **روش‌ها:** طی مطالعات میدانی انجام‌گرفته، ۷۵ جمعیت از ۱۰ گونه از جنس *Onosma* در منطقه مورد مطالعه جمع‌آوری شد. **نتایج و بحث:** دامنه ارتفاعی پراکنش گونه‌های مورد مطالعه ۲۹۵۲-۸۰۳ متر است. به علاوه، گونه‌ها در رویشگاه‌هایی با اقلیم نیمه مرطوب، مدیترانه‌ای و نیمه خشک در خاک‌های قلیایی (۸/۴۸-۷/۳۳) انتشار یافته‌اند. ارزیابی میزان تهدیدها نشان می‌دهد که نیمی از گونه‌ها در منطقه مورد مطالعه در معرض تهدید قرار دارند. نتایج حاصل از این مطالعه بر نیاز به حفاظت خارج از زیستگاه برای گونه‌های این جنس تاکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: الگوی انتشار، جغرافیای گیاهی، غنای گونه‌ای

۱. دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. استادیار گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول: A_mehrabian@sbu.ac.ir)
۳. فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد سیستماتیک-اکولوژی گیاهی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

مقدمه

با تشدید انقراض گونه‌ها، اقدامات مدیریتی مبتنی بر شیوه‌های مدرن برای حفاظت از گونه‌های گیاهی با الویت حفاظتی افزایش یافته است. تهیه پایگاه‌های اطلاعاتی انتشار گونه‌ها به عنوان نخستین گام مهم در طرح ریزی‌های حفاظتی به شمار می‌آید (Barberousse & Bary, 2019). به علاوه تعیین غنای گونه‌ای و وضعیت حفاظتی از جمله مهمترین معیارهای مورد استفاده در تعیین الویت های حفاظتی هستند. با شناسایی نقاط داغ غنای گونه‌ای و مناطق با غنای گونه‌ای بالا برای گونه‌های در معرض خطر، عوامل محیطی موثر بر آن‌ها از بعد ژئوبوتانیکی (مانند عرض جغرافیایی، ارتفاع ، و....) مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه الگوهای انتشار و غنای گونه‌ای گروه های مختلف گیاهی در نقاط مختلف دنیا انجام شده است که شاخص‌ترین آن‌ها عبارتند از: الگوهای انتشار گیاهان آوندی در سطح جهانی (Kreft & Jetz, 2007)، الگوهای تنوع گیاهان آوندی در مقیاس قاره‌ای – جهانی (Mutke & Barthlott, 2005)، الگوهای انتشار جهانی گونه‌های درختی (Keil & Chase, 2019)، الگوهای انتشار گونه‌های گلدار اندمیک پرو (Werff & Consiglio, 2004)، تنوع و انتشار گیاهان دارویی و آروماتیک تیره نعنائیان در یونان (Cheminal et al., 2020) و تعیین غنای گونه‌ای و مراکز اندمیسم گروهی از نهاندانگان در مکزیک (Rodríguez et al., 2018). به علاوه از مطالعات انجام شده در این حوزه در ایران می‌توان به الگوهای اندمیسم در ایران (Hedge & Wendelbo, 1978)، الگوهای انتشار گیاهان آلباین ایران (Noroozi et al., 2008)، الگوهای انتشار و اندمیسم جنس *Onosma* L (Mehrabian, 2015)، الگوهای انتشار و اندمیسم در گیاهان کپه داغ (Memariani et al., 2016)، الگوهای انتشار گیاهان انگلی ایران (Mehrabian et al., 2019)، الگوهای انتشار اندمیک‌های درختی و درختچه‌ای (Mehrabian et al., 2020)، الگوهای انتشار نهانزادان آوندی ایران (Mehrabian et al., 2020)، تعیین مناطق اندمیسم جنس *Acantholimon* Boiss. (Khajoei Nasab & Khosravi, 2020c)، الگوهای انتشار گیاهان آبی ایران (Mehrabian & Khajoei Nasab, 2021b)، و الگوهای انتشار گونه‌های تک لپه‌ای اندمیک ایران (Mehrabian et al., 2021b)، اشاره نمود.

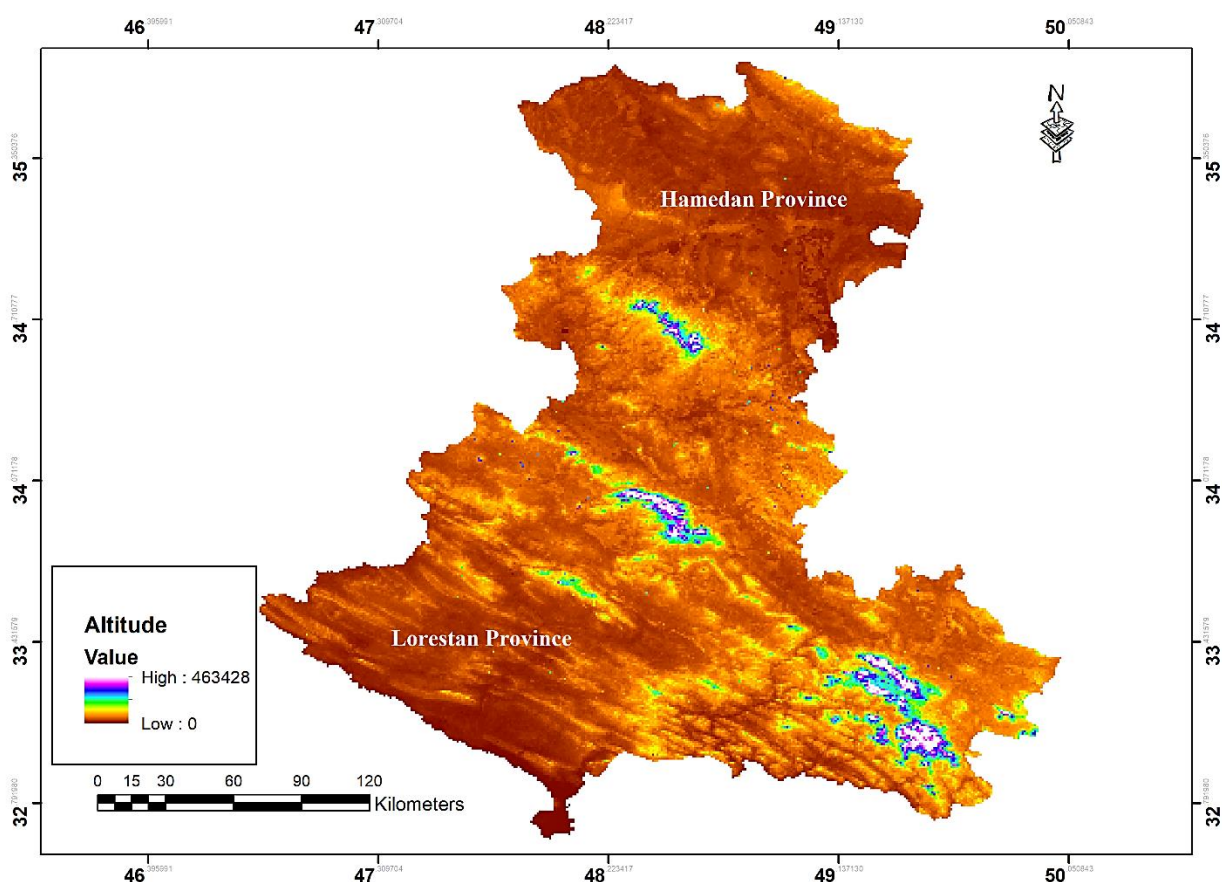
کشور ایران از جمله مهمترین مراکز تنوع گیاهی در ناحیه ایران-تورانی شناخته شده است (Zohary, 1973; Takhtajan, 1986 et al.) که ساختارهای پیچیده زمین‌شناختی (Stöcklin, 1974)، تنوع اقلیمی (Zahran, 2010) و ادافیکی حاکم بر این سرزمین، سبب ایجاد تنوع گیاهی بالا شده، به شکلی که در حدود ۷۳۰۰ گونه گیاهی در این منطقه شناسایی شده است. ایران با دارا بودن بیش از ۲۱۰۰ گونه انحصاری یکی از مراکز مهم بومزادی گیاهی در جنوب غرب آسیا محسوب می‌شود (Noroozi et al., 2008) و جنس‌هایی مانند *Onosma* و *Allium* L. *Acantholimon*، *Cousinia* Cass. *Astragalus* L. دارای

بیشترین تعداد گونه انحصاری در ایران هستند. جنس زنگوله‌ای یا *Onosma* یکی از متنوع‌ترین جنس‌های طایفه *Lithospermeae* Dumort. از تیره گاوبانیان (Boraginaceae) با ۲۴۰ گونه در دنیا است (He et al., 2020). مراکز مهم تنوع و بومزادی این جنس در منطقه ایران- تورانی (Cecchi et al., 2016) به ویژه فلات ایران (منطقه فلورا ایرانیکا) و فلات آناتولی (Mehrabian & Amini Rad, 2018a; Mehrabian & Mozaffarian, 2018b) شناخته شده است. گونه‌های جنس *Onosma* غالباً در زیستگاه‌های کوهستانی خشک و آفتاب‌گیر صخره‌ای تا شنی و استپی یافت می‌شوند. میزان تنوع و بومزادی این جنس از شرق به سمت غرب منطقه فلورا ایرانیکا به شدت افزایش می‌یابد. این جنس بر اساس فلورهای ایران و ایرانیکا دارای ۳۷ گونه در ایران است (Riedl, 1967; Khatamsaz, 2002). در طی مطالعات جدید تعداد گونه‌های این جنس در ایران به ۶۹ گونه رسیده است (Mehrabian et al., 2014; Mehrabian & Amini Rad, 2018a; Attar et al., 2020) و واحد ژئومورفولوژیک البرز مرکزی، واحد ژئومورفولوژیک شمال غرب و واحد ژئومورفولوژیک زاگرس به ویژه منطقه زاگرس شمالی و میانی به عنوان مهمترین مراکز اندمیسم و تنوع این جنس شناخته شده‌اند (Nikjooyan, 2018; Khajoei Nasab et al., 2020a). مطالعات اکولوژیک در این جنس در ایران برای نخستین بار توسط محرابیان (Mehranian, 2015) انجام شده است. از سایر مطالعات شاخص در مورد این جنس می‌توان به الگوهای انتشار و پهنه‌های تنوع این جنس در بخشی از پروانس جغرافیای گیاهی ارمنستان-ایران (Naghizadeh et al., 2020)، الگوهای انتشار و پهنه‌های تنوع در بخشی از واحد ژئومورفولوژیک شمال-غرب ایران (Moradi zeynab et al., 2019)، الگوهای انتشار و اندمیسم این جنس در البرز مرکزی (Nemati porshokooh, 2018) و مدل‌سازی آشیان اکولوژیکی برخی گونه‌های اندمیک *Onosma* در ایران (Khajoei Nasab et al., 2020b) اشاره نمود. این در حالی است که رشته کوه‌های زاگرس از جمله مراکز مهم تنوع و اندمیسم این جنس در ایران شناخته شده‌اند (Mehrabian, 2015). با این وجود، مطالعات ژئوبوتانیک این جنس در ناحیه زاگرس مرکزی به انجام نرسیده است. بنابراین انجام این مطالعات در راستای دستیابی به داده‌های اکولوژیکی و ویژگی‌های زیستگاه‌های این جنس و همچنین تهیه بانک اطلاعاتی حضور گونه‌ها در این منطقه بسیار ضروری به نظر می‌رسد. این در حالی است که تحلیل الگوهای انتشار این جنس نقش مهمی در تحلیل تاکسونومی و پیچیدگی‌های سیستماتیک این جنس دارد. مهمترین اهداف مطالعه حاضر عبارتند از: تعیین الگوهای انتشار و مراکز تنوع و اندمیسم جنس در زاگرس مرکزی، تعیین مناطق با غنای گونه‌ای بالای این جنس در منطقه مورد مطالعه، شناسایی گونه‌های در معرض تهدید و تهیه لیست سرخ از گونه‌های در معرض خطر و ارزیابی الویت‌های حفاظت گونه‌ای و زیستگاهی در راستای مدیریت تنوع زیستی و حفاظت این جنس در ایران.

مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه

مناطق اصلی مورد مطالعه بخش میانی واحد ژئومورفولوژیک زاگرس در محدوده استان های همدان و لرستان را در بر می گیرد (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه منطقه مورد مطالعه

Figure 2. Map of the study area

استان لرستان با مساحت ۲۹۳۰۸ کیلومتر مربع در غرب ایران، بین مدارهای ۴۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۳ دقیقه طول شرقی و ۳۲ درجه و ۳۷ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۲۲ دقیقه عرض شمالی قرار گرفته است. این استان از شمال به استان های مرکزی و همدان، از شمال غرب به استان کرمانشاه، از جنوب به استان های ایلام و خوزستان، از شرق به استان های مرکزی و اصفهان، از جنوب شرق به استان کهگیلویه و بویر احمد و از غرب به استان های کرمانشاه و ایلام محدود می گردد. کم ارتفاع ترین نقطه این استان ۲۳۹ متر و مرتفع ترین نقطه آن اشترانکوه با ارتفاع ۴۰۸۰ متر از سطح دریا است. این منطقه دارای آب و هوای سرد کوهستانی، معتدل مرکزی و گرمسیری است. اقلیم مدیترانه ای فصلی- قاره ای (Mediterranean pluviseasonal-continental) و مدیترانه ای خشک-

قاره‌ای (Mediterranean xeric-continental) از جمله مهمترین اقلیم زیستی حاکم بر این استان هستند و در مناطق محدود جنوبی نیز اقلیم خشک گرمسیری (Tropical xeric) وجود دارد (Djamali et al., 2011). حداکثر مطلق درجه حرارت هوا در این استان ۴۷/۸، و حداقل مطلق آن ۳۱- و متوسط درجه حرارت آن ۱۷/۲ درجه سانتی‌گراد است. گرم‌ترین ماه‌های سال با حداکثر دمای ۳۸/۱ درجه سانتی‌گراد، تیر و مرداد است و سردترین ماه‌های سال با میانگین کمتر از ۷- درجه سانتی‌گراد، دی و بهمن است. میزان سالانه بارندگی بیش از ۵۰۰ میلی‌متر است. این منطقه از نظر ژئومورفولوژیکی در زون زاگرس واقع شده و بخش عمده آن را سازندهای رسوبی، آذرینی و نهشته‌های کواترنری تشکیل داده است (Ghorbani, 2013). استان لرستان بر اساس سیستم رده‌بندی (1986) Takhtajan در پروانس فرعی کردستان-زاگرس (Kurdo-zagrosian subprovinc) متعلق به پروانس ارمنستان-ایران (Armeno- Iranian province) از ناحیه رویشی ایرانو-تورانی (Irano- Turanian region) طبقه بندی می‌گردد (Takhtajan et al., 1986). استان همدان نیز با مساحت ۷۳۵۷۶ کیلومتر مربع، بین مدارهای ۳۳ درجه و ۵۹ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی از خط استوا و ۴۷ درجه و ۳۴ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ قرار گرفته است. این استان از شمال به استان‌های زنجان و قزوین، از شرق به استان مرکزی، از غرب به استان‌های کرمانشاه و کردستان و از جنوب به استان لرستان محدود می‌گردد. بلندترین نقطه استان، قله الوند با ارتفاع ۳۵۸۴ متر بوده که در حدفاصل شهرهای تویسرکان و همدان قرار گرفته و کم ارتفاع‌ترین نقطه آن در ناحیه شمال شرقی و شرق ارتفاعات الوند قرار دارد. از نظر ساختار زمین‌شناسی، استان همدان در فصل مشترک چند قلمروی ساختاری متفاوت قرار گرفته به طوری که در یک روند جنوب غرب به شمال شرق می‌توان پهنه‌های زیر را در استان همدان معرفی کرد: ۱- زون سنندج-سیرجان ۲- زون زاگرس مرتفع ۳- زون ایران مرکزی و بخش عمده آن را سازندهای رسوبی، آذرینی و نهشته‌های کواترنری تشکیل داده است (Ghorbani, 2013). دو اقلیم زیستی مدیترانه‌ای فصلی-قاره‌ای (Mediterranean pluviaseasonal-continental) و مدیترانه‌ای خشک-قاره‌ای (Mediterranean xeric-continental) در این استان وجود دارند. حداکثر مطلق درجه حرارت هوا در این استان ۸/۳۶، و حداقل مطلق آن ۶/۲۹- و متوسط حرارت آن ۶/۹ درجه سانتی‌گراد است. گرم‌ترین ماه‌های سال با حداکثر دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تیر و مرداد است و سردترین ماه‌های سال، با میانگین ۴/۲۵- درجه سانتی‌گراد دی و بهمن است. میزان سالانه بارندگی بیش از ۳۰۰ میلی‌متر است. استان همدان بر اساس سیستم رده‌بندی (1986) Takhtajan در پروانس فرعی ایران مرکزی (Central Iran subprovinc) متعلق به پروانس ارمنستان-ایران (Armeno- Iranian province) از ناحیه رویشی ایرانو تورانی (Irano- Turanian region) طبقه بندی می‌گردد (Takhtajan et al., 1986).

روش مطالعه

جمع‌آوری داده‌های اکولوژیکی و حضور گونه‌ها

در ابتدا پایگاه اطلاعاتی انتشار حضور گونه‌ها با استفاده از مطالعات میدانی نویسندگان مقاله، اطلاعات موجود در فلورهای ایران (Khatamsaz, 2002) و ایرانیکا (Riedl, 1967) و همچنین داده‌های هرباریوم‌های شهیدبهبشتی (HSBU)، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور (IRAN)، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (TARI)، هرباریوم دانشگاه وین (WU) تهیه شد. مخفف نام هرباریوم‌ها طبق (Thiers, 2019) ارائه شد. سپس با استفاده از نرم افزار ArcGIS ver. 10.3 نقاط حضور گونه‌ها در نقشه ژئو رفرنس ژئومورفولوژی ایران استقرار یافته و الگوی اولیه انتشار گونه‌ها، تعیین گردید. در مرحله بعد براساس تنوع شرایط ژئومورفولوژیکی- اقلیمی، ایستگاه‌های متنوع جهت ارزیابی انتخاب شدند و مطالعات میدانی در این ایستگاه‌ها در طول شیب ارتفاعی انجام گردید. نمونه‌برداری بر مبنای تنوع زیستگاه‌ها مبتنی بر طبقه بندی ژئومورفولوژی ایران (Alai Taleghani, 2002)، سازندهای زمین شناسی ایران (Ministry of Industries and Mines Geological Survey of Iran, 2009)، آمار و اطلاعات هواشناسی (بارندگی و دما در بازه زمانی ۱۹۹۰-۲۰۱۷) در بازه زمانی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ انجام گردید. نمونه‌برداری‌ها به صورت پیمایشی و بر اساس زمان گلدهی تا میوه دهی گونه‌ها از اواسط فروردین تا اواسط مردادماه در فواصل هر ۱۰ روز یک بار انجام شد تا بازه گلدهی تمام گونه‌ها را پوشش دهد. در هر ایستگاه نمونه‌برداری براساس پیمایش در طول شیب ارتفاعی و استقرار پلات در هر ایستگاه به روش سیستماتیک- تصادفی بر اساس روش (Mueller - Dombois, 1974) و همکاران انجام شد. به همین منظور در هر ایستگاه براساس ترکیب گونه ای منطقه، سه تا پنج پلات 8×8 تا 16×16 متر در محل استقرار یافته و از هر پلات تعداد سه تا پنج فرد به عنوان نمونه سند جمع‌آوری گردید. پلات‌های 8×8 متر برای ارزیابی گونه‌ها در اجتماعات علفی-درختچه‌ای و با تراکم بیشتر و پلات‌های 16×16 متر برای بررسی گونه‌ها در اجتماعات درختچه‌ای با تراکم کمتر استفاده شد. جهت ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک زیستگاه‌ها، نمونه‌برداری از خاک تمام جمعیت‌های مورد مطالعه از سطح تا عمق نفوذ ریشه گیاه (از سطح تا ۲۰ سانتیمتری) صورت گرفت و فاکتورهایی نظیر pH، ماده آلی، فسفر، پتاسیم، درصد شن، سیلت و رس مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتورهای توپوگرافیکی مانند شیب، ارتفاع و جهت شیب در هر ایستگاه ثبت گردیدند. محدوده پراکنش گونه‌ها براساس تفکیک واحدهای زیست اقلیمی آرایه‌ها بر مبنای طبقه‌بندی اقلیمی جهان (Djmali et al., 2011) و طبقه‌بندی مناطق جغرافیای گیاهی ایران بر اساس سیستم طبقه‌بندی تختاجان (Takhtajan, 1986) انجام شد. همچنین در هر ایستگاه عوامل تهدید کننده نظیر میزان چرای دام براساس روش مصداقی (Mesdaghi, 2008)، دوری یا نزدیکی به شهرها و روستاها، جاده‌سازی، معدن‌کاری، مسیرهای کوهنوردی و گردشگری مورد ارزیابی قرار گرفت. نهایتاً جمعیت‌های موجود در جدول ۱، طی مطالعات میدانی در این تحقیق به دست آمدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- نمونه های مورد بررسی و محل جمع آوری، مختصات جغرافیایی و شماره هرباریومی آنها در ژئوبوتانی جنس *Onosma* L.(Boraginaceae) در بخش میانی

زاگرس مرکزی

Table 1. Specimens studied and their location, geographical coordinates, and herbarium number in the geobotany of the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) in the middle part of Central Zagros

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma</i> <i>bulbotricha</i> DC.	استان همدان: نهاوند-چشمه گاماسیاب	34.352705°	47.699855°	HSBU-	2019101
<i>Onosma</i> <i>bulbotricha</i> DC.	استان همدان: مسیر همدان به تویسرکان- تمیجان	34.696376°	48.334020°	HSBU-	2019102
<i>Onosma</i> <i>dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان: بالای افرینه	33.312601°	47.890794°	HSBU-	2019103
<i>Onosma</i> <i>dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان: خرم آباد به معمولان- نرسیده به معمولان	33.390354°	47.963814°	HSBU-	2019104

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان:ویسیان	33.481988°	48.040296°	HSBU-	2019105
<i>Onosma dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان:خرم آباد به ملاوی-تنگ تیر	33.481988°	47.938804°	HSBU-	2019106
<i>Onosma dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان:خرم آباد به معمولان- تنگ تیر	33.481988°	47.930443°	HSBU-	2019107
<i>Onosma dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان:مسیر خرم آباد به کوهدشت	33.481988°	47.855376°	HSBU-	2019108
<i>Onosma dasytricha</i> Boiss.	استان لرستان:خرم آباد-کوه سفید	33.481988°	48.331729°	HSBU-	2019109
<i>Onosma kotschy</i> Boiss.	استان لرستان:بروجرد-ارتفاعات گرین	33.481988°	48.62758°	HSBU-	2019110
<i>Onosma kotschy</i> Boiss.	استان همدان:نهادند-ازچشمه گاماسیاب	33.481988°	47.699855°	HSBU-	2019111
<i>Onosma kotschy</i> Boiss.	استان لرستان:شول آباد به الیگودرز-سرقلعه	33.481988°	49.292515°	HSBU-	2019112

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی		
			)Degree		
			Decimal(		
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	49.361790°	HSBU-	
<i>kotschy</i> Boiss.	لرستان:ازنا-دره تخت-اشترانکوه				2019113
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	47.737091°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	لرستان:خرم آبا به کوهدشت- حدود ۱۰ کیلومتر مانده به کوهدشت				2019114
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	48.871206°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	لرستان:بروجرد به خرم آباد -کیلومتر ۲۳				2019115
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	48.788087°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	لرستان:بروجرد				2019116
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	48.127128°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	همدان:گردنه اسد آباد				2019117
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	48.254745°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	همدان:تویسرکان به فیروزآباد-قلی لاله پایین				2019118
<i>Onosma</i>	استان	33.481988°	48.216039°	HSBU-	
<i>microcarpa</i> DC.	همدان:تویسرکان-کنجوران بالا				2019119

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma microcarpa</i> DC.	استان لرستان:الیگودرز	33.481988°	49.725692°	HSBU-	2019120
<i>Onosma microcarpa</i> DC.	استان همدان:همدان - بالای عباس آباد-کوه الوند	33.481988°	48.434251°	HSBU-	2019121
<i>Onosma microcarpa</i> DC.	استان همدان:همدان به تویسرکان-کنار جاده- کیلومتر ۱۲	33.481988°	48.408709°	HSBU-	2019122
<i>Onosma nervosa</i> Riedl.	استان لرستان:خرم آباد به بروجرد- زاغه	33.481988°	48.707368°	HSBU-	2019123
<i>Onosma nervosa</i> Riedl.	استان لرستان:بروجرد- کوه گرین	33.481988°	48.358901°	HSBU-	2019124
<i>Onosma nervosa</i> Riedl.	استان همدان:نهادند- از چشمه گاماسیاب	33.481988°	47.697538°	HSBU-	2019125

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی		
			)Degree		
			Decimal(		
<i>Onosma nervosa</i> Riedl.	استان لرستان: بروجرد به خرم آباد-ده سفید	33.481988°	49.565381°	HSBU-	2019126
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان: آوزمان-سلطان آباد	33.481988°	48.529081°	HSBU-	2019127
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان: همدان به تویسرکان- سوتلق	33.481988°	48.273603°	HSBU-	2019128
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان: نهاوند-آوزمان-دهلق	33.481988°	48.423202°	HSBU-	2019129
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان: شول آباد به الیگودرز-آب باریک	33.481988°	48.079488°	HSBU-	2019130
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان: تویسرکان	33.481988°	48.462849°	HSBU-	2019131
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان: مسیر ملایر به اراک-زنگنه	33.481988°	49.009623°	HSBU-	2019132
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان: بروجرد-کوه گرین	33.481988°	48.36764°	HSBU-	2019133

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان:دورود-سرآوند	33.481988°	49.162836°	HSBU-	2019134
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان:دورود-دریژان بالا	33.481988°	49.253567°	HSBU-	2019135
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان:اسدآباد-ملهمدر	33.481988°	48.148883°	HSBU-	2019136
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان:نرسیده به اسد آباد -گردنه	33.481988°	48.174645°	HSBU-	2019137
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان:همدان به اسد آباد-تاج آباد بالا	33.481988°	48.221377°	HSBU-	2019138
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان:اسدآباد-کوه الموقولاغ	33.481988°	48.149239°	HSBU-	2019139
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان:ازنا-اشترانکوه از دره تخت	33.481988°	49.342342°	HSBU-	2019140
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان همدان:همدان-بالای عباس آباد- کوه الوند	33.481988°	48.411156°	HSBU-	2019141

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی		
			()Degree		
			Decimal(		
<i>Onosma elwendica</i> Wettst.	استان لرستان:دورود-اشترانکوه	33.481988°	49.251672°	HSBU-	2019142
<i>Onosma kilouyense</i> Boiss. & Hausskn.	استان لرستان:مسیر شول آباد به الیگودرز-سرقلعه	33.481988°	47.122926°	HSBU-	2019143
<i>Onosma kilouyense</i> Boiss. & Hausskn.	استان همدان:ارتفاعات گرین از بروجرд	33.481988°	48.6668°	HSBU-	2019144
<i>Onosma kilouyense</i> Boiss. & Hausskn.	استان همدان:نهایوند به بروجرд- بالای اشترینان	33.481988°	49.537463°	HSBU-	2019145
<i>Onosma kilouyense</i> Boiss. & Hausskn.	استان لرستان:دورود-به سمت سرآوند-نزدیک سرآوند	33.481988°	49.183379°	HSBU-	2019146
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:ملاوی-ویسیان	33.481988°	47.764982°	HSBU-	2019147
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:دورود به سفیددشت-تپه تی	33.481988°	49.077391°	HSBU-	2019148

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:اطراف الشتر	33.481988°	48.296327°	HSBU-	2019149
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:الشتر-جوانمرد	33.481988°	48.3167°	HSBU-	2019150
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:چالان چولان	33.481988°	48.861634°	HSBU-	2019151
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان همدان:نهادوند- گیان	33.481988°	48.221538°	HSBU-	2019152
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان همدان:تویسرکان-کنجوران بالا	33.481988°	48.19861°	HSBU-	2019153
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان همدان:تویسرکان- اطراف قلی لاله	33.481988°	48.250622°	HSBU-	2019154
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:ملایر به اراک-جوزان	33.481988°	48.947158°	HSBU-	2019155
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:بین ازنا و الیگودرز-کشک	33.481988°	49.610999°	HSBU-	2019156

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی		
			()Degree		
			Decimal(		
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:دورود-دریژان بالا	33.481988°	49.253247°	HSBU-	2019157
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان همدان:گردنه اسدآباد	33.481988°	48.173528°	HSBU-	2019158
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:زاغه- بین بروجرد و خرم آباد	33.481988°	48.710924°	HSBU-	2019159
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:بروجرد به خرم باد -ده سفید و ده تپه	33.481988°	49.537463°	HSBU-	2019160
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان لرستان:ازنا- دره تخت	33.481988°	49.365757°	HSBU-	2019161
<i>Onosma sericea</i> Willd.	استان همدان:همدان-کوه الوند	33.481988°	48.415528°	HSBU-	2019162
<i>Onosma straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان: حدود ۳۰ کیلومتر از خرم آباد به ملاوی-تنگ تیر	33.481988°	47.938804°	HSBU-	2019163

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:دورود به سفیدشت- بیشه	33.481988°	48.871143°	HSBU-	2019164
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:بروجرد به خرم آباد-چالان چولان	33.481988°	48.865528°	HSBU-	2019165
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان همدان:تویسرکان به فیروزآباد-کریم آباد	33.481988°	48.293936°	HSBU-	2019166
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان همدان:نهادوند-آورزمان-سلطان آباد	33.481988°	48.529013°	HSBU-	2019167
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان همدان:همدان به تویسرکان-اشتران	33.481988°	48.303154°	HSBU-	2019168
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان همدان:همدان به اسدآباد-ملهمدر	33.481988°	48.142152°	HSBU-	2019169
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:دورود به ازنا-قلعه رستم	33.481988°	49.257558°	HSBU-	2019170

نام گونه	محل	عرض جغرافیایی	طول	شماره	هرباریومی
	جمع آوری	Decimal()Degree	جغرافیایی)Degree Decimal(		
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:دورود-دریژان بالا	33.481988°	49.253247°	HSBU-	2019171
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:ازنا-دره تخت	33.481988°	49.371208°	HSBU-	2019172
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:دورود به اشترانکوه-سرآوند	33.481988°	49.159514°	HSBU-	2019173
<i>Onosma</i> <i>straussii</i> (Riedl) Khat.	استان لرستان:ازنا-اشترانکوه	33.481988°	49.294266°	HSBU-	2019174
<i>Onosma platyphylla</i> Riedl.	استان لرستان:خرم آباد- جاده بعد از دره اشکفت-حدود ۱۷ کیلومتر-زیر اشکوب بلوط	33.481988°	47.764982°	HSBU-	2019175

ارزیابی حفاظتی

ارزیابی میزان تهدیدپذیری گونه‌ها، بر اساس دستورالعمل منطقه‌ای فهرست سرخ اتحادیه جهانی حفاظت (IUCN, 2012) انجام شد. بر این اساس، وضعیت حفاظتی گونه‌ها مطابق معیارهای IUCN در مقیاس منطقه‌ای و توسط نرم افزار GeoCAT محاسبه گردید (<http://geocat.kew.org/>) و نهایتاً گونه‌ها در یکی از دسته‌های زیر گروه‌بندی شدند: حداقل نگرانی (LC)، کمبود داده (DD)، در شرف تهدید (NT)، آسیب پذیر (VU)، در معرض خطر انقراض (EN) و به شدت در معرض خطر انقراض (CR). همچنین جهت تعیین اولویت‌های حفاظتی از شاخص نادر بودن گونه (RI- Rarity Index) استفاده شد (Williams et al., 1996). شاخص نادر بودن گونه (RI) براساس رابطه زیر به دست آمد:

$$RI = 1/C_i$$

که در آن C_i تعداد خانه‌هایی است که گونه i در آن حضور دارد. در رابطه فوق، عدد حاصل بین صفر تا یک می‌باشد که بالاترین عدد برای آرایه‌های به شدت نادر در نظر گرفته می‌شود.

آنالیز رسته‌بندی (PCA=Principal Component Analysis)

از آنالیز رسته‌بندی برای دسته‌بندی گونه‌های گیاهی موجود در منطقه مورد نظر، بر اساس تشابه ترکیب گونه‌ای و عوامل محیطی کنترل‌کننده آنها استفاده شد. گروه‌های اکولوژیک و فاکتورهای محیطی از جمله دما و بارش سالانه، ارتفاع، pH، ماده آلی، فسفر، پتاسیم و درصد شن، سیلت و رس با استفاده از نرم‌افزار PAST ver 2 مورد آنالیز رسته‌بندی (Principal Component Analysis = PCA) قرار گرفتند.

تهیه نقشه‌های انتشار گونه‌ها

تعیین عرصه گسترش و نقشه غنای گونه‌ای بر اساس خانه‌گرید

نقشه‌های غنای گونه‌ای با کمک اطلاعات حضور گونه‌ها در منطقه مورد مطالعه و با استفاده از سلول‌های شطرنجی (Grid cells) با قابلیت تفکیک $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$ UTM در محیط نرم‌افزار Diva-GIS ver7.5 و با توجه به اطلاعاتی مانند طول و عرض جغرافیایی و تعداد گونه‌ها در هر خانه‌گرید ساخته شد. نقشه غنای گونه‌ای گونه‌های اندمیک (Endemic) نیز به همین ترتیب و با استفاده از اطلاعات حضور گونه‌های اندمیک رسم گردید.

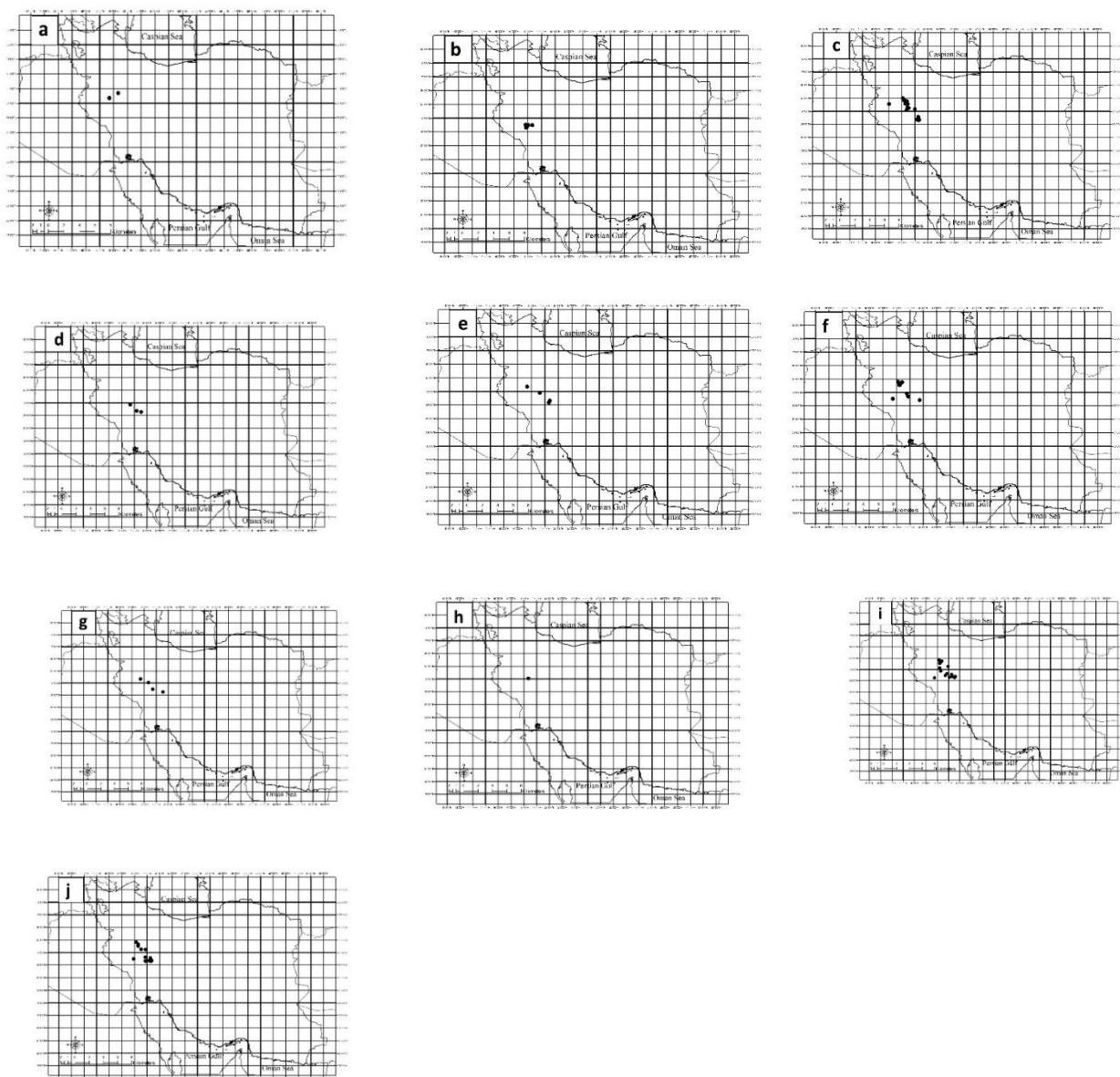
نتایج و بحث

طی مطالعات میدانی انجام گرفته، ۷۵ جمعیت از ۱۰ گونه مختلف از جنس *Onosma* در منطقه مورد مطالعه جمع آوری شد و این گونه‌ها متعلق به بخش *Onosma* هستند که شامل زیربخش‌های ذکر شده در ادامه است: ۱- زیر بخش *Asterotricha* Boiss که گونه‌های *O. dasytricha* Boiss. در آن قرار دارد ۲- زیر بخش *Heterotricha* Boiss. که شامل گونه‌های *O. kilouyense* Boiss. & *O. elwendica* Wettst. و *Hauskn.* است ۳- زیر بخش *Haplotricha* Boiss. که مشتمل بر گونه‌های *O. kotschy* Boiss.، *O. Riedl.*، *O. nervosa*، *O. platyphylla* Riedl.، *O. straussii* (Riedl) Khat.، *O. bulbotricha* DC.، *O. micocarpa* DC.، *sericea* Willd.، *Haplotricha* بزرگترین زیر واحد در جنس *Onosma* است که شامل تعداد زیادی گونه است. این زیر بخش غالبیت تعداد گونه‌های جنس مورد مطالعه را در ناحیه البرز مرکزی، زاگرس شمالی و بخشی از واحد ژئومورفولوژیک غرب ایران را به خود اختصاص داده است. نقشه پراکنش گونه‌های مورد مطالعه به شرح زیر است (شکل ۲):

تحلیل ویژگی های اکولوژیکی زیستگاه‌ها در منطقه مورد مطالعه

توپوگرافی

ارتفاع از سطح دریا نقش مهمی در مقدار و نوع بارش، درجه حرارت، میزان تبخیر و تعرق و نوع پوشش گیاهی دارد. دامنه پراکنش ارتفاعی گونه‌های مورد مطالعه ۲۹۵۲-۸۰۳ متر است که دامنه ارتفاعی زیربخش *Asterotricha* از ۱۲۰۳-۸۵۴ متر، زیر بخش *Heterotricha* از ۲۹۵۲-۱۷۸۵ متر و زیر بخش *Haplotricha* از ۲۷۹۵-۱۲۰۲ متر است. پایین‌ترین و بالاترین حد دامنه پراکنش ارتفاعی گونه‌های مورد مطالعه به ترتیب مربوط به گونه‌های *O. sericea* و *O. elwendica* است. گونه‌های این جنس اغلب رویشگاه‌های مرتفع کوهستانی (۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ متر) و کوهپایه‌ای (۹۰۰ تا ۱۵۰۰ متر) را اشغال کرده‌اند. شیب از جمله مواردی است که آب قابل دسترس گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری که تغییرات آن در طول یک گرادیان می‌تواند بر پوشش گیاهی اثرگذار باشد. اطلاعات شیب رویشگاه‌ها به صورت ۴ بازه کند (۰-۲۵ درصد)، ملایم (۲۵-۵۰ درصد)، نیمه‌تند (۵۰-۷۵ درصد) و تند (۷۵-۱۰۰ درصد) ثبت گردید، که اکثر جمعیت‌ها در رویشگاه‌هایی با شیب ملایم تا تند پراکنش داشتند. اغلب گونه‌های این جنس در البرز مرکزی و بخش‌هایی از واحد ژئومورفولوژیک شمال غرب ایران نیز در شیب‌های ملایم تا تند یافت می‌شوند. در صورتی که مطالعات قبلی در در بخشی از پروانس جغرافیای گیاهی ارمنستان-ایران نشان داد که اغلب گونه‌های این جنس در شیب‌های کند تا ملایم در زاگرس شمالی یافت می‌شوند. از نظر جهت دامنه، اکثر گونه‌ها و جمعیت‌ها، دامنه‌های جنوبی را جهت انتشار انتخاب کرده‌اند که نشان می‌دهد جنس *Onosma* نور پسند بوده و در نتیجه شرایط رطوبتی کمتر را ترجیح می‌دهند. نتایج حاصل از این تحقیق توسط مطالعات قبلی تایید می‌گردد.



شکل ۲- نقشه پراکنش گونه‌ها در منطقه مورد مطالعه (a) *O. bulbotricha* (b) *O. dasytricha* (c) *O. elwendica* (d) *O. microcarpa* (e) *O. kilouyense* (f) *O. kotschyi* (g) *O. nervosa* (h) *O. platyphylla* (i) *O. sericea* (j) *O. straussii*

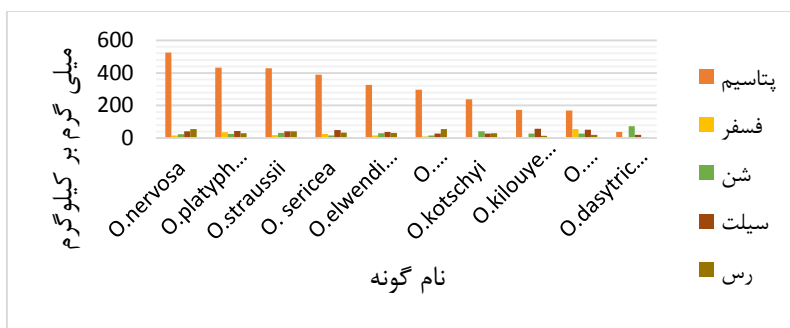
Figure 2. Species distribution maps in the study area a) *O. bulbotricha* b) *O. dasytricha* c) *O. elwendica* d) *O. microcarpa* e) *O. kilouyense* f) *O. kotschyi* g) *O. nervosa* h) *O. platyphylla* i) *O. sericea* j) *O. straussii*

اقلیم

از میان عوامل اکولوژیکی، فاکتورهای اقلیمی مهم‌ترین عواملی هستند که در پراکنش و تراکم پوشش گیاهی نقش عمده‌ای دارند. به‌طور کلی اقلیم منطقه مورد مطالعه، سرد و خشک است که به‌دلیل موقعیت کوهستانی و عرض جغرافیایی استان‌ها می‌باشد، ولی به‌علت تنوع توپوگرافیکی از اقلیم‌های متفاوتی برخوردارند. البته به جز جنوب لرستان، که آب و هوای مدیترانه‌ای و در بعضی شهرهای جنوبی‌تر به حالت نیمه گرمسیری‌اند. بنابراین اکثر گونه‌های مورد مطالعه در رویشگاه‌هایی با اقلیم نیمه مرطوب، مدیترانه‌ای و نیمه‌خشک پراکنش یافته‌اند. به علاوه گونه‌های این جنس در البرز مرکزی، بخش‌هایی از زاگرس شمالی و واحد ژئومورفولوژیک شمال غرب ایران در زیستگاه‌هایی با اقلیم نیمه مرطوب، مدیترانه‌ای و نیمه‌خشک یافت می‌شوند. اکثر گونه‌های مورد مطالعه در رویشگاه‌هایی پراکنش یافته‌اند که دارای میزان متوسط بارندگی سالیانه ۱۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالیانه ۰ تا ۱۰ و به ندرت ۱۰ تا ۱۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده مطابقت دارد.

خاک‌شناسی و زمین‌شناسی

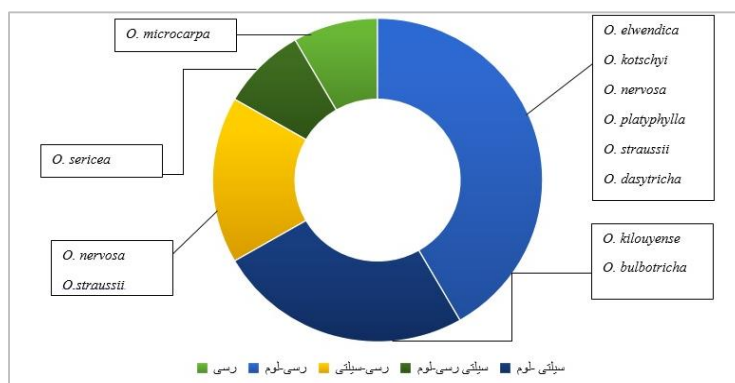
پراکنش غالب گونه‌های مورد مطالعه در واحدهای زمین‌شناسی با بسترهای رسوبی، آذرین و آتشفشانی- رسوبی است. فاکتورهای اسیدیته (pH)، ماده آلی خاک، بافت خاک و درصد فسفر و پتاسیم برای گونه‌های *Onosma* در منطقه مورد مطالعه تجزیه و تحلیل شدند. گونه‌های مورد مطالعه در خاک‌های قلیایی رشد می‌کنند و اسیدیته خاک‌های بررسی شده ۸/۴۸-۷/۳۳ است که کم‌ترین و بیشترین مقدار آن به ترتیب مربوط به گونه‌های *O. dasytricha* و *O. kotschy* است. میزان ماده آلی در خاک‌های بررسی شده ۵-۰/۳۱ است که کم‌ترین میزان آن مربوط به گونه *O. dasytricha* و بیشترین میزان آن مربوط به گونه‌ی *O. platyphylla* است. میزان پتاسیم خاک‌های مورد مطالعه ۳۸/۵۹ تا ۵۲۴/۷ است که کم‌ترین میزان آن مربوط به گونه *O. dasytricha* و بیشترین میزان آن مربوط به گونه‌ی *O. nervosa* است. میزان فسفر در خاک‌های مورد بررسی ۵۶/۱-۲/۸۶ است که کم‌ترین و بیشترین میزان آن به ترتیب مربوط به گونه‌های *O. kilouyense* و *O. bulbotricha* است (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج حاصل از آنالیز خاک زیستگاه های مورد مطالعه

Figure 3. Results of soil analysis of the studied habitats

همچنین بافت خاک‌های بررسی شده اکثراً از نوع رسی لومی است و در مجموع، پنج گونه از گونه‌های مورد مطالعه در زیستگاهی با این نوع بافت خاک رشد می‌کنند. نمونه‌های خاک سایر جمعیت‌های گونه‌های مورد مطالعه دارای بافت خاک رسی، سلیتی-لومی، سلیتی-رسی-لومی، شنی-لومی و شنی-سلیتی-لومی هستند (شکل ۴). نتایج حاصل از مطالعات قبلی توسط نقی زاده و همکاران (Naghizadeh et al., 2020) و مرادی و همکاران (Moradi zeynab et al., 2019) نشان می‌دهد که مراکز اندمیسیم و غنای گونه‌ای بالای این جنس در زیستگاه‌هایی با خاک‌های شنی رسی لومی است.



شکل ۴- بافت خاک زیستگاه‌های گونه های مختلف

Figure 4. Soil texture of habitats of different species

عمق خاک نقش مهمی در نوع و تراکم پوشش گیاهی هر منطقه ایفا می‌کند. شیب‌های تند غالباً در معرض فرسایش زیاد قرار دارند و بنابراین عمق خاک کم‌تری داشته و به تبع آن تنوع گیاهی در آن‌ها کم می‌باشد. به طوری که در مطالعه حاضر، تنها گونه های *O. kotschy*، *O. dasytricha* و *O. microcarpa* در شیب‌های تند یافت می‌شوند. سایر اطلاعات اکولوژیکی مربوط به زیستگاه های مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات قبلی نشان می‌دهد که برخی گونه‌ها مانند *O. microcarpa*، *O. bulbotracha*، *O. elwendica* و *O. sericea* در ناحیه البرز مرکزی و شمال غرب ایران در شرایط اکولوژیکی (توپوگرافی، خاک و اقلیم) و زمین‌شناسی نسبتاً مشابهی قادر به رشد هستند.

جدول ۲- اطلاعات اکولوژیکی رویشگاه‌های جنس *Onosma* در محدوده مطالعاتی: ایرانو-تورانی (IT-Irano-Turanian)، کردستان-زاگرس (Ku-Za-Kurdistan-Zagros)، زاگرس (Za-) Zagros)، رسوبی (Se-Sedimentary)، آذرینی (Ig-Igneous)، دگرگونی (Me-Metamorphic)، افیولیت (Op-Opiolite)، مدیترانه‌ای قاره‌ای خشک (Mediterranean Xeric-) continental)، مدیترانه ای چند فصلی قاره‌ای (Mpc- Mediterranean pluviseasonal-continental)، ملایم (G-Gentle)، تند (St-Steep)، تخریب شده (Ru-Ruderal)، پوشش گیاهی علفی (FV-Forb Vegetation)، گونه‌های پایه کوتاه و بالشتکی خاردار (DS & TC-Dwarf Scrub & Thorn Cushion)، بالشتکی خاردار تنک و باز (OC-Open Thorn Cushion)، چرای بی رویه (OG-Over Grazing)، معدن (Mi-Mine)، جاده سازی (Ro-Road)، تغییر کاربری زمین (LUC-land Use Change)، گردشگری (Ec-Ecotourism)، انتشار محدود (RD-Restricted Distribution)

Table 2. Ecological information of *Onosma* habitats in the study area: IT (Irano-Turanian), Ku-Za (Kurdistan-Zagros), Za (Zagros), Se (Sedimentary), Ig (Igneous), Me (Metamorphic), Op (Opiolite), Mxc (Mediterranean Xeric-continental), Mpc (Mediterranean pluviseasonal-continental), G (Gentle), St (Steep), Ru (ruderal), FV (Forb Vegetation), DS & TC (Dwarf Scrub & Thorn Cushion), OC (Open Thorn Cushion), OG (Over Grazing), Mi (Mine), (Ro (Road), LUC (land Use Change), Ec (Ecotourism), RD (Restricted Distribution)

وامل تهدید	یستگاه	یب	رتفاع (متر)	احد زیست‌اقلیمی	ختار زمین- شناسی	احد ژئومورفولوژیکی	غرافیای گیاهی	نه
G, LUC, Ro, Ec	u, DS & TC	-Gentle, t-Steep	۱۳۰۳-۵۷۲	Mxc ,pc	p, Me, Ig, Se	a	T(Ku-Za)	. <i>microcarpa</i>
D, OG	S & TC	G-Gentle	۱۵۰۰-۷۰۰	Mxc ,pc	e	a	T(Ku-Za)	. <i>platyphylla</i>

<i>. kotschy</i>	T(Ku-Za)	a	e,Me	Mxc .pc	۲۰۲۷-۳۰۲	t-Steep	S & TC, OC	G, Ro, Ec
<i>. sericea</i>	T(Ku-Za)	a	p, Me, Ig, Se	Mxc .pc	۸۰۳-۷۹۵	-Gentle	S & TC, FV	G, LUC, Ro, Ec
<i>. elwendica</i>	T(Ku-Za)	a	p, Ig, Se	.Mxc .pc	۱۷۸۵-۹۵۲	-Gentle	S & TC, OC, FV	G, LUC, Ro, Ec
<i>. bulbotricha</i>	T(Ku-Za)	a	g, Se	Mxc .pc	۲۰۲۹-۰۳۱	-Gentle	u, DS & TC, FV	G, LUC, Ro
<i>. dasytricha</i>	T(Ku-Za)	a	e, Me	Mxc .pc	۸۵۴-۶۳۸	t-Steep	S & TC, OC, FV	G, Mi
<i>. straussii</i>	T(Ku-Za)	a	e, Ig, Se	Mxc .pc	۲۰۳-۲۵۱۵	-Gentle	u, DS & TC	G, LUC, Ro
<i>. kilouyense</i>	T(Ku-Za)	a	g	Mxc .pc	۲۲۵۳-۸۸۱	-Gentle	S & TC	G, Ro
<i>. nervosa</i>	T(Ku-Za)	a	g, Se	Mxc .pc	۱۷۴-۱۹۴۴	-Gentle	S & TC, OC, FV	G, Ro

نتایج آنالیز رسته بندی

نتایج آنالیز همبستگی برای گونه‌های مورد مطالعه نشان داد که در محور ۱ با ۹۰/۹۲ درصد واریانس، متغیرهای ارتفاع محل و پتاسیم بیشترین همبستگی مثبت را نشان داده (جدول ۳) و در محور ۲ با واریانس ۷/۷۵ درصد، به ترتیب فاکتورهای میزان پتاسیم خاک، درصد ذرات رس خاک و میزان فسفر بیشترین همبستگی مثبت را نشان می‌دهند. در صورتی که فاکتورهای بارندگی، کربن آلی، اسیدیته خاک (PH) و هدایت الکتریکی خاک (EC)، در بخش‌هایی از زاگرس شمالی و واحد ژئومورفولوژیک شمال غرب ایران با گونه‌های مختلف جنس *Onosma* دارای بیشترین همبستگی مثبت هستند.

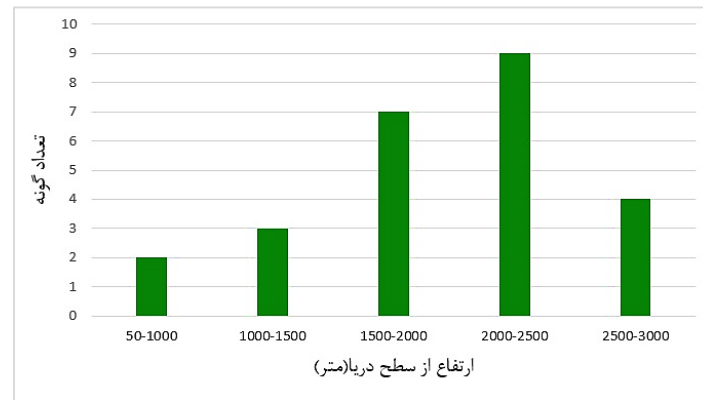
جدول ۳- مقادیر ویژه و درصد واریانس محورها اصلی

Table 3. Eigenvalues and percentage of variance of the main axes

مقادیر	محور ۱	محور ۲
ویژه و درصد واریانس محورها اصلی		
مقادیر	۱۷۳۵۴۱	۹۰/۹۲۶
ویژه		
درصد	۹۰/۹۲	۷/۷۵
واریانس		

مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که ارتفاع از جمله مهمترین عوامل محیطی موثر در تنوع گونه‌ای این جنس در البرز مرکزی است. ارتفاع یکی از مهمترین عوامل تنوع زیستگاه‌ها و تنظیم الگوهای غنای گونه‌ای در مناطق مختلف دنیا به شمار می‌آید (Körner, 2000). با تغییر در دسترس بودن منابع مورد نیاز مانند آب و دما در جهت شیب‌های ارتفاعی، تنوع گونه‌ای رخ می‌دهد. تغییرات در خصوصیات اکوسیستم‌ها در امتداد شیب‌های ارتفاعی شامل تنوع گیاهی، بهره‌وری، صفات گونه‌ای و فیزیولوژی است (Whittaker et al., 2001; Raich et al., 1997; Lomolino, 2001; Körner, 2007; Pellissier et al., 2010). بنابراین طبیعی است که ارتفاع از سطح دریا از جمله مهمترین عوامل ایجاد کننده تنوع گونه‌ای و غنای گونه‌ای بالا در جنس *Onosma* در منطقه مورد مطالعه باشد. برخی از گونه‌ها مانند *O. sericea* و *O. elwendica* در محدوده‌های ارتفاعی گسترده‌ای رشد می‌کنند در حالی که برخی دیگر مانند *O. dasytricha* در محدوده ارتفاعی کمتر از ۱۶۵۰ متر یافت می‌شوند (جدول ۲). شکل ۵ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد

گونه‌های این جنس در محدوده ارتفاعی ۲۰۰-۲۵۰۰ متر تمرکز یافته است. این الگوی افزایش تنوع و غنای گونه‌ای بالا در جهت شیب ارتفاعی با نتایج تحقیقات قبلی بر روی کل جنس در ایران مطابقت دارد (Mehrabian, 2015).

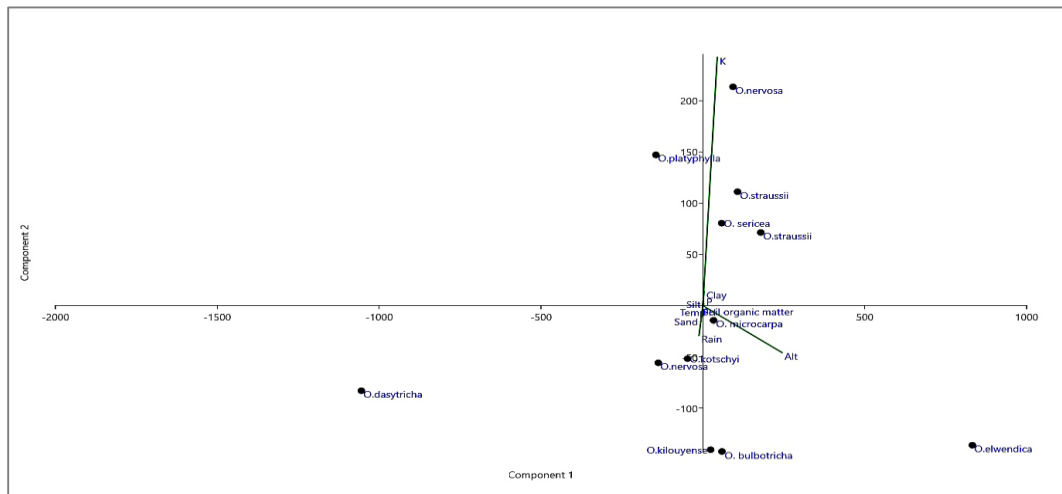


شکل ۵- رابطه ارتفاع و غنای گونه‌ای جنس *Onosma* در منطقه مورد مطالعه

Figure 5. Relationship between altitude and richness of *Onosma* species in the study area

خاک نیز یکی دیگر از فاکتورهای محیطی است که بسیاری از عملکردهای اکوسیستم‌ها به آن وابسته است. خاک هر زیستگاه دارای ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاصی است که در کنار سایر عوامل محیطی امکان رشد گونه‌های گیاهی مختلف را فراهم می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که پس از ارتفاع، میزان پتاسیم و فسفر و همچنین درصد ذرات رس خاک در تنوع زیستگاه‌ها و سپس تنوع گونه‌ها در مناطق مورد مطالعه نقش مهمی را ایفا می‌کنند. به عنوان مثال گونه‌های *O. dasytricha*, *O. bulbutricha* و *O. kiluyense* در خاک‌هایی با میزان پتاسیم کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، رشد می‌کنند در صورتی که گونه‌های *O. nervosa*, *O. platyphylla* و *O. straussii* در خاک‌هایی با میزان پتاسیم بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یافت می‌شوند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که چنین الگویی در رابطه با گونه‌های البرز مرکزی نیز صدق می‌کند و تنوع میزان پتاسیم خاک در بین زیستگاه‌های گونه‌های مختلف به شدت در الگوی انتشار گونه‌ها موثر هستند. همچنین فسفر یکی از عناصر اصلی و پر مصرف گیاه به شمار می‌آید که پاسخ‌های مختلف گیاهان به میزان فسفر در خاک می‌تواند به تغییر در الگوی تنوع زیستی تبدیل شود (Gartlan et al., 1986; Gleason et al., 2009). براساس شکل ۲، گونه‌های *O. kilouyense* و *O. dasytricha* غالباً در خاک‌های با میزان فسفر بسیار کم وجود دارند در صورتی که گونه‌های *O. bulbotricha*, *O. platyphylla* و *O. sericea* میزان بالای پتاسیم را برای رشد و نمو نیاز دارند. میزان ذرات رس خاک یکی دیگر از عوامل مهم تنوع گونه‌ای در منطقه مورد مطالعه است. خصوصیات فیزیکی خاک مانند میزان رس می‌تواند سبب افزایش تنوع گونه‌ای در مناطق مختلف شود (Medinski et al., 2010; Bahrami et al., 2014; Mirdeilam & Heshmati, 2014).

بر اساس نمودار حاصل از آنالیز رسته بندی (PCA)، جمعیت‌های اکولوژیکی متنوع بر اساس متغیرهای محیطی به گروه‌های اکولوژیکی نسبتاً مجزایی تقسیم شده‌اند به شکلی که جمعیت‌های گونه‌های مختلف در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند که نشانگر تنوع اکوتیپی بسیار گسترده در این جنس است (شکل ۶). نتایج فوق با نتیجه حاصل از مطالعات پیشین مطابقت دارد.



شکل ۶- پلات حاصل از آنالیز رسته‌بندی جمعیت‌های گونه‌های مختلف جنس *Onosma* بر اساس فاکتورهای اکولوژیکی: ارتفاع (Alt)، بارش (Rain)، دما (Temperature)، درصد شن (Sand)، درصد سیلت (Silt)، درصد رس (Clay)، میزان فسفر (P)، درصد ماده آلی خاک (Soil organic matter) و میزان پتاسیم خاک (K)

Figure 6. Plots obtained from the ordination analysis of populations of different species of the genus *Onosma* based on ecological factors: altitude (Alt), rainfall (Rain), temperature (Temperature), percentage of sand (Sand), percentage of silt (Silt), percentage of clay (Clay), amount of phosphorus (P), percentage of soil organic matter (Soil organic matter) and amount of soil potassium (K)

نتایج ارزیابی‌های حفاظتی

ارزیابی میزان تهدیدها نشان داد که نیمی از گونه‌ها در منطقه مورد مطالعه در معرض تهدید قرار دارند و گونه *O. platyphylla* در معرض خطر انقراض قرار دارد. به‌علاوه گونه *O. platyphylla* با توجه به شاخص نادر بودن، گونه نادر محسوب می‌شود (جدول ۴). این گونه اندمیک ایران بوده و در زیستگاه‌های خاصی از جنگل‌های بلوط زاگرسی در استان‌های لرستان، کردستان، فارس، همدان و کهگیلویه و بویراحمد یافت می‌شود. لازم به ذکر است خشکسالی‌ها و آتش سوزی‌های گسترده که سبب تخریب جنگل‌های غرب کشور شده، سطح وسیعی از زیستگاه‌های گونه مورد نظر را در معرض تهدید قرار داده است. گونه‌های *O. microcarpa* و *O. bulbotricha* در منطقه مورد نظر دارای انتشار بسیار محدودی هستند. در این منطقه گونه‌های نادر این جنس به دلیل تأثیرات مخرب چرای دام، فرسایش خاک، کاهش زادآوری و تغییرات اقلیمی به شدت در معرض تهدید قرار دارند. در منطقه مورد مطالعه چهار گونه

اندمیک ایران وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که رویشگاه‌های گونه *O. kotschyi* به شدت تحت چرای دام قرار دارند. این در حالی است که گونه اندمیک *O. straussii* در رویشگاه‌های تخریب شده رویش دارد که از تهدیدپذیری کمتری برخوردارند.

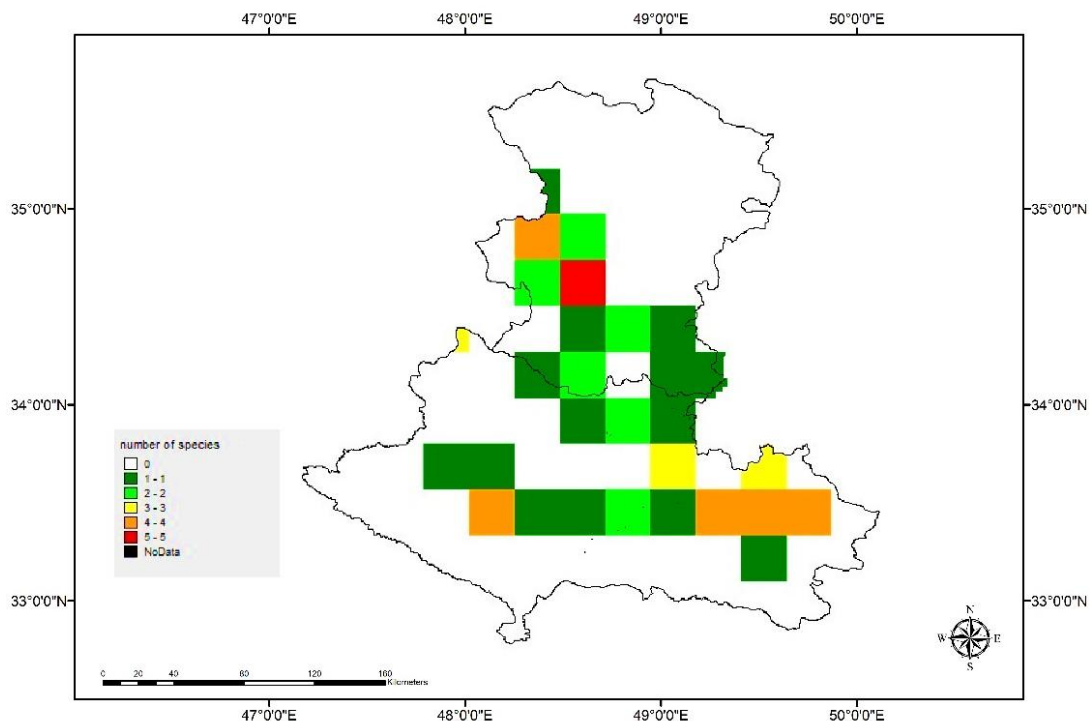
جدول ۴- نتایج حاصل از ارزیابی های حفاظتی گونه ها در منطقه مورد مطالعه

Table 4. Results from conservation assessments of species in the study area

و	اندمیک(End)	شا	گ
ضعیت حفاظتی	(emic)	خص نادر بودن (RI)	نه
ک	-		د
مترین نگرانی (LC)		0/049	<i>. microcarpa</i> DC.
در	اندمیک	0/	د
شرف تهدید (NT)		076	<i>. kilouyense</i> Boiss. & Hausskn.
ک	-	0/	د
مترین نگرانی (LC)		71	<i>. elwendica</i> Wettst.
در	-	0/	د
شرف تهدید (NT)		1	<i>. nervosa</i> Riedl
ک	اندمیک	0/	د
مترین نگرانی (LC)		1	<i>. straussii</i> Khat.
در	-	0/	د
شرف تهدید (NT)		11	<i>. dasytricha</i> Boiss.
در	اندمیک	0/	د
شرف تهدید (NT)		125	<i>. kotschy</i> Boiss.
در	اندمیک	0/	د
معرض خطر (EN)		25	<i>. platyphylla</i> Riedl
ک	-	0/	د
مترین نگرانی (LC)		038	<i>. bulbotricha</i> DC.
ک	-	0/	د
مترین نگرانی (LC)		83	<i>. sericea</i> Willd.

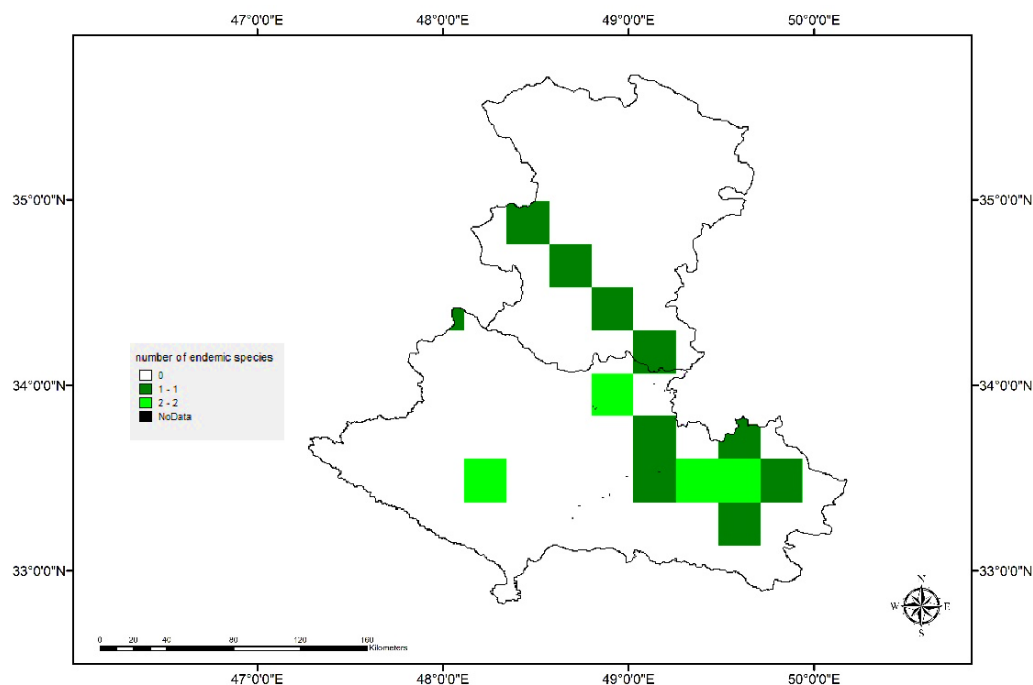
نقشه غنای گونه‌ای بر اساس خانه‌گرید

براساس نقشه غنای کل گونه‌ای، ۲۸ خانه گرید در منطقه مورد مطالعه، هر کدام بین ۱ تا ۵ گونه دارند (شکل ۷). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تعداد گونه‌ها با افزایش عرض جغرافیایی افزایش می‌یابد. نتایج فوق با نتایج قبلی در بخش‌هایی از واحد ژئومورفولوژیک شمال غرب مطابقت دارد و غنای گونه‌ای کل گونه‌ها در این جنس از جنوب به سمت شمال آن افزایش می‌یابد و بیشترین تعداد گونه در یک خانه گرید واقع در استان همدان رخ داده است (شکل ۷). این در حالی است که بیشترین تعداد گونه اندمیک در ۴ خانه گرید در استان لرستان وجود دارد (شکل ۸). همچنین تعداد گونه‌ها در جهت دامنه‌های غربی نواحی مورد مطالعه افزایش می‌یابد. این در حالی است که زاگرس میانی در شرایط گذار (اکوتونی) قرار دارد و اثرات اقلیم مدیترانه‌ای به ویژه در دامنه‌های غربی، وجود ساختارهای متنوع زمین‌شناسی و نیز تنوع در شرایط اداپتیکی، سبب شکل‌گیری آشیان‌های اکولوژیکی متعدد و ایجاد تنوع و اندمیسیم برای جنس مورد مطالعه گردیده است (Mehrabian, 2015) (شکل ۷).



شکل ۷- نقشه غنای گونه‌ای برای تمام گونه‌های مطالعه شده

Figure 7. Species richness map for all studied species



شکل ۸- نقشه غنای گونه‌ای برای گونه‌های اندمیک مطالعه شده

Figure 8. Species richness map for endemic species studied

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که الگوهای تنوع و اندمیسیم گونه‌های این جنس در منطقه مورد مطالعه مانند سایر مناطق کشور به شدت متأثر از فاکتورهای اقلیمی و ژئومورفولوژیکی است. این در حالی است الگوی انتشار گونه‌های این جنس از تنوع بسیار بالایی برخوردارند. به علاوه گونه‌های اندمیک این جنس به دلیل تهدید پذیری بالای زیستگاه‌های موجود در منطقه مورد مطالعه، به شدت در معرض تهدید قرار دارند. از طرفی بسیاری از گونه‌های نادر این جنس که براساس داده‌های فلورستیک پیشین، در منطقه مورد بررسی گزارش شده بود، دیگر در منطقه انتشار ندارند. در نهایت شرایط نامناسب زیستگاهی ضرورت حفاظت خارج از زیستگاه را برای بسیاری از گونه‌های این جنس تأکید می‌نماید.

منابع

- Attar, F., Sotoodeh, A. and Mirtadzadini, M. (2020). Four new species in subsection *Asterotricha* for the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) from flora of Iran. *Feddes Repertorium*, 131: 146–158.
- Alaee Taleghani, M. (2002). *Geomorphology of Iran*. Qoms publications, 360 Pp. Tehran.
- Bahrami, B., Erfanzadeh, R. and Motamedi, J. (2014). Plant diversity of bio-environmental units with respect to some

- soil and geopedologic characteristics in the mountain rangeland ecosystem. *Applied Soil Research*, 1:75-87.
- Barberousse, A. and Bary, S. (2019). Marine Biodiversity Databanks. In: Casetta, E., Marques da Silva, J. and Vecchi, D. (eds) *From Assessing to Conserving Biodiversity. History, Philosophy and Theory of the Life Sciences*, vol 24. Springer, 55-76 Pp. Cham.
- Cecchi, L., Coppi, A. and Selvi, F. (2016). *Onosma juliae* (Boraginaceae), a new species from southern Turkey, with remarks on the systematics of *Onosma* in the Irano-Turanian region. *Phytotaxa*, 288: 201–213.
- Cheminal, A., Kokkoris, I. P., Strid, A. and Dimopoulos, P. (2020). Medicinal and aromatic lamiaceae plants in greece: Linking diversity and distribution patterns with ecosystem services. *Forests*, 11: 661.
- Djamali, M., Akhiani, H., Khoshravesh, R., Andrieu-Ponel, V., Ponel, Ph. and Brewer, S. (2011). Application of the global bioclimatic classification to Iran: implications for understanding the modern vegetation and biogeography. *Ecologia Mediterranea*, 37:91e114.
- Gartlan, J.S., Newbery, D.M., Thomas, D.W. and Waterman, P.G. (1986). The influence of topography and soil phosphorus on the vegetation of Korup Forest Reserve, Cameroun. *Vegetatio*, 65: 131-148.
- Ghorbani, M. (2013). *The Economic Geology of Iran*. Springer Nature 581 Pp. Cham.
- Gleason, S.M., Read, J., Ares, A., and Metcalfe, D.J. (2009). Phosphorus economics of tropical rainforest species and stands across soil contrasts in Queensland, Australia: Understanding the effects of soil specialization and trait plasticity. *Functional Ecology*, 23: 1157-1166.
- He, Y., Xu, X.M., Zhou, Y. and Liu, Q.R. (2020). *Onosma fuyunensis* (Boraginaceae), a new species from Xinjiang, China. *PhytoKeys*, 144: 11-22.
- Hedge, I. C. and Wendelbo, P. (1978). Patterns of distribution and endemism in Iran. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh*, 36: 441-464.
- IUCN. (2012). *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional and National Levels: Version 4.0.*, IUCN. iii + 41 Pp. Gland.
- Keil, P. and Chase, J. (2019). Global patterns and drivers of tree diversity integrated across a continuum of spatial grains. *Nature Ecology and Evolution*, 3: 390-399.
- Khajoei Nasab, F., Mehrabian, A.R. and Nemati Parshkouh, A. (2020a). Distribution Patterns and Endemism of the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) in Central Alborz. *Iranian Applied Ecology*, 9:1-18.
- Khajoei Nasab, F., Mehrabian, A.R. and Mostafavi, H. (2020b). Mapping the current and future distributions of *Onosma* species endemic to Iran. *Journal of Arid Land*, 12: 1031-1045.
- Khajoei Nasab, F. and Khosravi, A.R. (2020c). Identification of the areas of endemism (AOEs) of the genus *Acantholimon* (Plumbaginaceae) in Iran. *Plant Biosystems*, 154: 726-736.
- Khatamsaz, M. (2002). Boraginaceae. Pages 114-168 in Assadi *et al.*, ed. *Flora of Iran*. Vol. 39. Research Institute of Forests and Rangeland Press. Tehran.
- Kreft, H. and Jetz, W. (2007). Global patterns and determinants of vascular plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 5925-5930.
- Körner, C. (2000). Why are there global gradient in species richness? Mountains might hold the answer. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 513-514.
- Lomolino, M.V. (2001). Elevation gradients of species-density: historical and prospective views. *Global*

- Ecology and Biogeography, 10: 3-13.
- Medinski, T.V., Mills, A.J., Esler, K.J., Schmiedel, U. and Jurgens, N. (2010). Do soil properties constrain species richness? Insights from boundary line analysis across several biomes in south western Africa. *Journal of Arid Environments*, 74: 1052-1060.
- Mehrabian, A.R., Sayadi, S., Majidi, K. M., Hashemi Yeganeh, V. and Abdoljabari, M. (2020). Priorities for conservation of Iranian endemic trees and shrubs. *Asia-Pacific journal of Biodiversity*, 13: 295-305.
- Mehrabian, A.R. (2015). Distribution patterns and diversity of *Onosma* in Iran: with emphasis on endemism conservation and distribution pattern in SW Asia. *Rostaniha*, 16: 36-60. (in Persian)
- Mehrabian, A.R., Khajoei Nasab, F., Karimi Bekr, Z. and Rahimi, S. (2019). Distribution patterns and conservation status of haloparsite plant of Iran. *Shahid Beheshti University, Tehran*.
- Mehrabian, A.R., Khajoei Nasab F., Fraser Jenkins, C.R. and Tajik, F. (2020). Distribution patterns and priorities for conservation of Iranian pteridophytes. *Fern Gazette*, 21:141-161
- Mehrabian, A.R., Khajoei Nasab, F. and Amini Rad, M. (2021a). Distribution patterns and priorities for conservation of Iranian Endemic Monocots: determining the Areas of Endemism(AOE). *Journal of Wildlife and Biodiversity* 5: 69-87.
- Mehrabian, A.R. and Khajoei Nasab, F. (2021b). Distribution patterns, diversity centers, and priorities for conservation of aquatic plants in Iran. In: Jawad, L.A., eds. *Southern Iraq's Marshes*. Coastal Research Library, vol 36. Springer, Cham.
- Mehrabian, A.R. and Amini Rad, M. (2018a). *Onosma moussavi* sp nov (Boraginaceae) from Zagros Mountain (s), Iran. *Feddes Repertorium*, 129: 304-311.
- Mehrabian, A.R. and Mozaffarian, V. (2018b). Seven New Species of *Onosma* L. (Boraginaceae) with emphasis on their habitats in Iran. *Taiwania*, 4:366-388.
- Mehrabian, A.R., Sheidai, M. and Mozaffarian, V. (2014). Three new species of *Onosma* L. (Boraginaceae) from Iran. *Feddes Repertorium*, 124: 69-79.
- Memariani, F., Zarrinpour, V. and Akhane, H. (2016). A review of plant diversity, vegetation and phytogeography of the Khorassan-Kopet Dagh floristic province in the Irano-Turanian region (northeastern Iran – southern Turkmenistan). *Phytotaxa*, 249:8-30.
- Mesdaghi, M. (2008). *Range management in Iran*, 5th Edition. Imam Reza University press, 328 Pp. Mashahd.
- Mirdeilam, S.Z. and Heshmati, G. (2014). Investigating the effect of soil and topographical factors on variations of plant species diversity (case study: Sabzkesheh summer rangeland at the Mohammad-abad Katool watershed, Golestan province). *Journal of Plant Ecosystem Conservation*, 2:31-46
- Moradi Zeinab, H., Mehrabian, A.R., Naghizadeh, S., Mostafavi, H. and Khajoei Nasab, F. (2019). Distribution patterns, diversity and conservation priorities of *Onosma* L. (Boraginaceae Juss.) in some sections of the northwestern geomorphologic unit of Iran. *Environmental Sciences*, 17: 73-94.
- Mueller-Dumbois, D. and Ellenberg, H. (1974). *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- Mutke, J. and Barthlott, W. (2005). Patterns of vascular plant diversity at continental to global scales. *Biologische Skrifter*, 55:521-31.

- Naghizadeh, S., Mehrabian, A.R., Moradi, Z. H., Mostafavi, H. and Khajoei Nasab, F. (2020). Distribution patterns, diversity and conservation Priorities of *Onosma* L. (Boraginaceae Juss.) in part of Armeno-Iranian Province of Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. (In press).
- Nemati porshokooh, A., (2018). Geobotanical assessment of habitats of *Onosam* L. (Boraginaceae) in order to conservation and habitat management in central Alborz. Thesis submitted to graduate studies for the degree of master of science (MSc), Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti university, Tehran, Iran.
- Nikjooyan, M. J., (2018). Geobotanical assessment of habitats of *Onosam* L. (Boraginaceae) in order to conservation and habitat management in central Zagros. Thesis submitted to graduate studies for the degree of master of science (MSc), Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti university, Tehran, Iran.
- Noroozi, J., Akhani, H. and Breckle, S-W. (2008). Biodiversity and phytogeography of the Alpine flora of Iran. *Biodiversity and Conservation*, 17:493-521.
- Pellissier, L., Fournier, B., Guisan, A. and Vittoz, P. (2010). Plant traits co-vary with altitude in grasslands and forests in the European Alps. *Plant Ecology*, 211: 351-365
- Raich, J.W., Russell, A.E. and Vitousek, P.M. (1997). Primary productivity and ecosystem development along an elevational gradient on Mauna Loa, Hawai'i. *Ecology*. 78: 707-721.
- Riedl, H. (1967). *Flora Iranica (Boraginaceae)*. Akademische Druck-u Verlagsanstalt, 169-212 Pp., Graz.
- Rodríguez, A., Castro- Castro, A., Vargas Amado, G., Vargas Ponce, O., Zamora Tavares, P., González- Gallegos, J., Carrillo Reyes, P., Anguiano- Constante, M., Carrasco- Ortiz, M., García- Martínez, M., Gutiérrez- Rodríguez, B., Aragón- Parada, J., Valdes- Ibarra, C. and Munguía- Lino, G. (2018). Richness, geographic distribution patterns, and areas of endemism of selected angiosperm groups in Mexico. *Journal of Systematics and Evolution*, 56: 537- 549.
- Stöcklin, J. (1974). Northern Iran: Alborz Mountains. *Geological Society* 4 :213e234.
- Takhtajan, A., Crovello, T.J. and Cronquist, A. (1986). *Floristic regions of the world (Vol. 544)*. Berkeley: University of California press.
- Thiers, B.M. (2019). Index of Herbariorum (http://sciweb.nbybg.org/science2/Index_Herbariorum.asp).
- van der Werff, H. and Consiglio, T. (2004). Distribution and conservation significance of endemic species of flowering plants in Peru. *Biodiversity and Conservation*, 13: 1699-1713.
- Whittaker, R.J., Willis, K.J. and Field, R. (2001). Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography*, 28: 453-470.
- Williams, P.H., Gibbons, D., Margules, C. et al. (1996). A comparison of richness hotspots, rarity hotspots, and complementary areas for conserving diversity of British birds. *Conservation Biology*, 10: 155-174.
- Zahran, M.A. (2010). *Climate-Vegetation: Afro-Asian mediterranean and red Sea coastal lands*. Springer Science & Business Media, 324 Pp. New York.
- Zohary, M. (1973). *Geobotanical Foundations of the Middle East. Vol. 2*. Gustav Fisher Verlag, 738 Pp. Stuttgart.

Geobotany of *Onosma* L. (Boraginaceae) genus in the middle part of the Central Zagros: A conservation approach

F. Khajoei Nasab¹, A. Mehrabian*, M. J. Nikjouyan²

Received 2020.11.28

Accepted: 2021. 06.14

Abstract

Introduction: *Onosma* is one of the most diverse genera of Boraginaceae. The areas of endemism as well the main diversity centers of the genus cover the Iranian as well Anatolian plateaus, and the Mediterranean region. The present study was conducted to determine the distribution patterns, diversity, and endemism centers, and endangered species in the middle part of the Central Zagros.

Methods: During field studies, 75 populations of 10 species of *Onosma* were collected in the target area.

Results and discussion: The studied species, demonstrated an elevation range of 803 to 2952 meters. Also, the species were distributed in semi-humid, Mediterranean, and semi-arid habitats with alkaline soil (8.48-37.48). Our results demonstrated that half of the species in the studied area are endangered species. Finally, the results of this study emphasize the need for ex-situ conservation for some species of this genre.

Keywords: *Distribution pattern, Phytogeography, Species richness.*

¹PhD, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (*Corresponding author: a_mehrabian@sbu.ac.ir)

³ MSc., Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

اثر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دوپایه بر رشد و برخی ویژگی های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه ای

الهه ریاضی، فرشاد رخشنده رو[✉]، وحید عبدوسی^۳

چکیده

مقدمه: در این بررسی اثر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دو پایه ایران (*Urtica dioica* L.) بر رشد و برخی ویژگی های بیوشیمیایی گیاه گوجه فرنگی، رقم Super chef، در شرایط گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش ها:** برای این منظور از بافت های خشک شده ساقه و برگ گزنه، عصاره های آبی و الکلی تهیه و به صورت مستقیم به ریزوسفر خاک گلدان ها تزریق و در زمان های معین پس از تیمار، برخی شاخص های بیوشیمیایی و رشدی گیاهچه های گوجه ارزیابی شد. همچنین با استفاده از آزمون RT-sq-PCR میزان بیان نسبی ژن کدکننده پذیرنده سیتوکینین SLHK4-Cytokinin inducer در نمونه ها در زمان ۱۴ روز بعد از تیمار ارزیابی گردید. **نتایج و بحث:** نتایج نشان داد که عصاره های آبی و الکلی گزنه توانستند در غلظت ۵۰۰ ppm با اختلاف معنی داری موجب افزایش میزان سرعت نسبی رشد، مقدار کلروفیل های a و b، فنل کل و فعالیت اختصاصی آنزیم های پراکسیداز (POX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) و همچنین افزایش نسبی میزان بیان ژن SLHK4-Cytokinin inducer در مقایسه با گیاهان شاهد شوند. نتایج حاصل از این پژوهش میتواند به عنوان روشی کاربردی برای بهبود رشد گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، آنزیم پلی فنل اکسیداز، بیان ژن، فنل، گیاه گزنه

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. (* نویسنده مسئول: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)
۳. استادیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L.، گیاهی از خانواده بادنجانیان (*Solanaceae*) و از گروه سبزی و صیفی جات است که به دلیل سرشار بودن از ویتامین های A، C، K، B، کلسیم، فسفر و آهن نقش بسزایی در تغذیه انسان ها دارد. ارقام زراعی گوجه فرنگی، دیپلوئید ($2n=24$) و خود گرده افشان بوده و به صورت گیاه علفی چند ساله رشد می نماید و معمولاً به عنوان یک محصول یک ساله کشت می گردد (Gerszberg et al., 2015). در ایران حدود ۸۰ درصد از گوجه فرنگی به صورت مزرعه ای و بقیه به صورت گلخانه ای تولید می شود. در چند سال اخیر افزایش چشمگیری در تولید گلخانه ای گوجه فرنگی به چشم می خورد. طبق آمار سازمان خواربار جهانی (FAO) سطح زیر کشت گوجه فرنگی در ایران بالغ بر ۱۴۰/۰۰۰ هکتار با متوسط عملکرد ۳۵۷۱۴ کیلو در هکتار و با تولید تقریبی ۵۰۰/۰۰۰ تن است (FAO, 2012). امروزه بدلیل ویژگی های درمانی که نتیجه حضور ترکیبات الکیل دار غیر اشباع کارتنوئیدی مانند لیکوپن در آن است، مصرف گوجه فرنگی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Di Cesare et al., 2012). از طرفی هورمون های رشدی تجارتي مورد استفاده معمول در بخش صنعت، از لحاظ اقتصادی گران قیمت هستند و به راحتی در اختیار تولید کننده ها قرار نمی گیرد. بنابراین استفاده از ترکیبات ارگانیک، در صورت افزایش عملکرد رشد گیاه، می تواند با هزینه کمتر و تاثیر بیشتر نسبت به نمونه های تجارتي شیمیایی موجود مورد استفاده قرار گیرد. در سال های اخیر توجه تولید کنندگان بیشتر به استفاده از ترکیبات گیاهی و ارگانیک (Organic farming) به جای ترکیبات شیمیایی جهت تسریع رشد گیاهان زراعی در تولید محصول معطوف شده است. ترکیبات ارگانیک علاوه بر اثرات مطلوب قابل توجهی که در تولید محصول دارند، برای زیست بوم نیز خطرناک نبوده و پس از تاثیر خود در گیاه هدف در طبیعت پوسیده شده و بعد از مدتی از بین می روند. چنین ترکیباتی با حفظ سلامت گیاهان موجب افزایش توان زیستی آن ها شده و سیستم های مقاومتی خاص و مسیرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی ویژه ای را در آن ها فعال می سازند که موجب افزایش توان رشدی و عملکرد زیستی در گیاهان در سطوح مختلف می شوند (Godlewska et al., 2021).

گیاه گزنه از جمله گیاهان بومی ایران با ۶۰ جنس و بیش از ۷۰۰ گونه است. گزنه دو پایه (*Urtica dioica*) گیاهی است علفی و در نقاط مرطوب و سایه دار به حالت خودرو می روید (Bisht et al., 2012). در نوار شمالی ایران، این گونه در نواحی جلگه ای، کنار رودخانه ها و جاده ها به صورت خودرو می روید (ابراهیم قوچی، ۱۳۹۸). گزنه دو پایه ایران از جمله گیاهان دارویی است که دارای خواص درمانی بوده و صدها سال است که در طب سنتی در قسمت های مختلف جهان جهت معالجه بیماری هایی همچون آگزما، ناراحتی های دستگاه گوارش و دردهای مفاصل و نیز کم خونی از عصاره آن استفاده می شود (Cowan, 1999). نتایج پژوهش های پیشین نشان داده است که عصاره گیاه گزنه دو پایه دارای خاصیت ضد باکتریایی است و به میزان چند برابر بیشتر از باکتری کش های شیمیایی از توان کنترل باکتری های گرم منفی و مثبت برخوردار است (Krope et al., 2012; Otlés & Yalcin, 2012). از این گیاه دارویی سال هاست که برای درمان بیماری های پوستی، گوارشی و درمان درد و کم خونی در سرتاسر جهان به خصوص کشورهای آسیایی استفاده می شود (Habibi-Lahigi et al., 2011). عصاره های آبی و الکلی گزنه از توان کنترل باکتری های مختلف آلوده کننده انسان و گیاه برخوردار است (Korpe et al., 2012; Murthy et al., 2014).

عصاره آبی گزنه غنی از ویتامین ها، کربوهیدرات ها، اسیدهای آمینه و عناصر معدنی همچون فسفات، نیتروژن، آهن و منیزیم است (Filipovic et al., 2011; Rivera et al., 2012). ریشه، ساقه، برگ و گل های آن دارای رنگ سبز تیره هستند. اندام های

هوایی این گیاه سرشار از ویتامین های A، C و K است. به طوری که در ۱ کیلوگرم از بافت سبز برگ آن حدود ۱۳۰ میلی گرم ویتامین C وجود دارد. همچنین حاوی ۱۸ درصد پروتئین و تا ۱۷ درصد آلومین است. در بافت خشک این گیاه انواع اسیدهای آلی مانند: فرمیک اسید، بوتریک اسید، سوکسینیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، مالیک اسید، کوماریک اسید، لینولئیک اسید و پالمیتیک اسید وجود دارد. همچنین منبع غنی از آلومین، آکالوئیدها، آگلوتنین، استیل کولین، هیستامین، لیگنان، ترپن، سروتونین، گزانتوفیل و کوئرسیتین است (Otlés & Yalcin, 2012; Kregiel et al., 2018). پژوهش های گذشته مشخص ساخت عصاره های آبی و الکلی برگ گزنه دوپایه حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی شامل Fumaric acid و Quercetin است (Otlés & Yalcin, 2012). ترکیبات مذکور از جمله فلاونوئیدهای گیاهی هستند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی فراوانی بوده و به عنوان مکمل های غذایی در پزشکی از آنها استفاده می شود (David et al., 2016).

نتایج پژوهش های گذشته نشان داد کاربرد عصاره آبی گزنه می تواند منجر به افزایش مولفه های رشدی شامل طول گیاهچه، طول ریشه چه، وزن خشک ریشه چه نسبت وزن ریشه چه به ساقه چه و میانگین زمان جوانه زنی در ارقام مختلف گندم شود (عقیقی شاهوردی و همکاران، ۱۳۹۴). اثر مثبت عصاره آبی گزنه در رشد جو و سیب زمینی نیز به اثبات رسیده است (Garmendia et al., 2018) در پژوهشی که به تازگی انجام پذیرفت از عصاره آبی گیاه گزنه دو پایه به عنوان کود زیستی مایع به دو صورت مه افشانی روی برگ ها و تزریق در خاک در زراعت لوبیا استفاده شد (Maricic et al., 2021). مولفه های رشدی همچون ارتفاع و قطر ساقه، سطح برگ و همچنین عملکرد تولید در گیاه های لوبیای تیمار شده با عصاره آبی گزنه در مقایسه با لوبیاهای تیمار نشده تا ۱۴ روز پس از تیمار افزایش یافت (Maricic et al., 2021). همچنین مشخص شده است که عصاره آبی گیاه گزنه دو پایه ایران موجب بهتر شدن عملکرد رشدی قلمه های گل سرخ در محیط کشت می شود و از این طریق آلودگی های ویروسی در این گیاه مهار می شود (Rakhshandehroo et al., 2009; Safamehr et al., 2012). بیش از دو دهه است که در کشورهای اروپایی از جمله اسپانیا استفاده از عصاره آبی گیاهان مختلف از جمله گزنه دوپایه به عنوان یک کود زیستی در زراعت های گلخانه ای استفاده می شود (Garmendia et al., 2018). گیاه گوجه فرنگی به عنوان پرکاربردترین گیاه مدل برای تحقیقات زیست شناسی میوه و بررسی رشد و نمو گیاهان محسوب می شود (Gerszberg et al., 2015). تا کنون تحقیقی در مورد اثر عصاره گیاه گزنه در بهبود عملکرد رشدی گیاه گوجه فرنگی انجام نشده است. در این بررسی کوشش به عمل آمد تا تاثیر عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دو پایه (*Urtica dioica* L.) بر روی برخی شاخص های رشدی و توان زیستی گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین تاثیر عصاره گیاه گزنه بر تولید سیتوکینین از طریق ارزیابی میزان حضور نسخه های ژن پروتئین تنظیمی متاثر شونده از این تنظیم کننده رشد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت گیاه گوجه فرنگی و تیمار با عصاره گزنه

برای این مطالعه، گیاه گزنه دوپایه کوهی (*U. dioica*) در طول فصل رشد رویشی در فصل بهار (اواخر اردیبهشت تا اوایل خرداد ماه) از رویشگاه طبیعی آن واقع در ارتفاعات ۱۸۰۰ متری از سطح دریا در روستای جواهرده شهرستان رامسر، استان مازندران جمع آوری گردید. بخش هوایی گیاه (برگ و ساقه) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتیگراد) و در تاریکی به مدت ۱۰

روز کاملاً خشک و سپس توسط دستگاه خردکن با یکدیگر کاملاً ترکیب شد. تهیه عصاره های آبی و الکلی مطابق دستورالعمل موجود انجام شد (Leser & Treutter, 2005). برای این منظور ۱۰ گرم از بافت های خشک شده گزنه به ترتیب در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر و الکل اتانل ۷۰ درصد در دستگاه Soxhlet برای مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و آماده بدست آمده برای حذف حلال در دستگاه (rotary evaporator (Heidolph, Heizbad Hei-VAP, Germany) در فشار کم و دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ فیلتر با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در شیشه های تاریک نگهداری شد.

برای این تحقیق از گوجه فرنگی رقم Super chef استفاده شد. کاشت، نگهداری و تیمار گیاهچه ها در شرایط استاندارد گلخانه ای شامل درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دوران متناوب نوری (۱۶ ساعت) و تاریکی (۸ ساعت) انجام شد. گیاهچه های گوجه فرنگی در گلدان های ۱۰۰ گرمی شامل خاک زراعی و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۲ کاشته و سپس در مرحله ۴ تا ۶ برگی با غلظت های ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰ (در حجم نهائی گلدان) از عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه به صورت مجزا تیمار شدند. عصاره ها به صورت مستقیم به ریزوسفر خاک گلدان ها تزریق شدند و در زمان های ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز پس از تیمار، برخی شاخص های بیوشیمیایی مرتبط با رشد و متابولیسم گیاهچه های گوجه فرنگی در مقایسه با گلدان شاهد، که تنها با آب تیمار شده بود، مقایسه شدند. این آزمون در ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۵ گلدان انجام شد. در کنار عصاره ها از غلظت های ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰ (در حجم نهائی گلدان) ماده اسیدسالیسیلیک (Sigma-Aldrich) جهت تیمار گیاهچه های گوجه فرنگی به عنوان القاکننده موثر رشد گیاه جهت مقایسه تاثیر مثبت عصاره ها در رشد و مولفه های بیوشیمیایی استفاده شد.

محاسبه سرعت نسبی رشد

جهت بررسی اثر غلظت های مختلف از عصاره های آبی و الکلی گزنه دو پایه در افزایش رشد گیاهچه های گوجه فرنگی (۳)، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از تیمار) سرعت نسبی رشد (RGR (Relative growth rate) با استفاده از رابطه زیر و مطابق روش Gardner و همکاران (۱۹۸۵) محاسبه و بر اساس $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ بیان شد. $\ln \text{RGR (Relative Growth Rate)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$: لگاریتم طبیعی وزن خشک (Natural logarithm of dry matter variations)، W_1 = وزن خشک برگ بر حسب میلی گرم (mg) در روز ۳ و W_2 = وزن خشک برگ بر حسب میلی گرم (mg) در روز ۱۴، t = زمان مشخص بر حسب روز. گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف از عصاره های آبی و الکلی گزنه در زمان های ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز بعد از تیمار و در تکرار های متفاوت انتخاب و پس از گرفتن آب سطحی، به مدت ۷۲ ساعت در آون ۶۵ درجه سانتیگراد خشک شدند و میزان ماده ی خشک آنها محاسبه شد.

تعیین مقدار کلروفیل

برای تعیین مقدار کلروفیل، مقدار ۰/۵ گرم برگ گوجه فرنگی با استفاده از نیتروژن مایع خرد و سپس میزان ۲۰ ml میلی لیتر استن ۸۰ درصد به نمونه اضافه و به خوبی همگن شد. سپس مخلوط واکنش در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب نوری روشنآور حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

(Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) در طول موج های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول های زیر مقدار کلروفیل های a و b بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد. در فرمول، V = حجم حلال مورد استفاده برای استخراج (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A = جذب نوری نمونه در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر و W = وزن تر نمونه بر حسب میلی گرم است (Lichtenthaler & Buschmann, 2001)

$\text{Chlorophyll a} = (12.3 * A_{663} - 0.86 * A_{645}) V/100W$

$\text{Chlorophyll b} = (19.3 * A_{645} - 3.6 * A_{663}) V/100W$

تعیین مقدار فنل کل

برای بررسی مقدار فنل کل در بافت برگ گیاهچه های گوجه فرنگی تیمار شده با هر یک از عصاره های آبی و الکلی گزنه از روش Duarte و همکاران (۲۰۰۸) به شرح ذیل استفاده شد: ابتدا ۰/۱ گرم برگ گوجه فرنگی در ۱ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به خوبی خرد و برای ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد تکان داده شد. سپس ۱ میلی لیتر از عصاره متانولی فوق به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین (Folin Ciocalteu) ۱ نرمال اضافه شد و مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد برای ۳ تا ۵ دقیقه نگهداری و سپس جذب نوری محلول آبی رنگ حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) خوانده شد. از گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده و مقدار فنل کل معادل میزان گالیک اسید بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر برگ بیان شد.

سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

جهت سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Rakhshandehroo و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. برای این منظور میزان ۰/۱ گرم از بافت برگ های فوقانی نمونه های گوجه فرنگی در حضور ازت مایع در درون هاون به خوبی خرد و سپس در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 6$ به خوبی حل گردید. ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و میزان ۰/۵ میلی لیتر از روشناور حاصل به عنوان محلول حاوی آنزیم استفاده شد. همچنین ۱ میلی لیتر از ماده Quaiacol با غلظت ۰/۰۱ مولار حل شده در بافر فسفات سدیم تامپونی ۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 6/5$ به عنوان سوپسترا مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز میزان ۰/۵ میلی لیتر آنزیم استخراج شده با ۷۸۰ میکرولیتر سوپسترا و ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد ترکیب و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) در مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرائت شد. در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میکروگرم پروتئین کل بافت گزارش شد.

جهت سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Chandrashekaraiah و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. برای این منظور میزان ۰/۱ گرم از بافت برگ نمونه های گوجه فرنگی در حضور ازت مایع در درون هاون به خوبی خرد و سپس در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 6/8$ به خوبی حل گردید. ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و از ۰/۵ میلی لیتر روشناور حاصل به عنوان محلول حاوی آنزیم استفاده شد. از ۱ میلی لیتر

ماده Catechol با غلظت ۰/۱ مولار در بافر فسفات سدیم تامپونی ۰/۱ مولار با pH=۶/۸ به عنوان سوبسترا استفاده شد. میزان جذب حاصل از فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد از ۴۰ تا ۶۰ ثانیه بعد از اضافه شدن ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه ۱ درصد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز بر حسب تغییرات جذب واکنش آنزیمی در دقیقه در میکروگرم پروتئین کل بافت گزارش شد.

به منظور سنجش غلظت پروتئین های محلول کل، میزان ۰/۱ گرم برگ گوجه فرنگی در هاون چینی ریخته شده و همزمان ازت مایع اضافه شده و در حین خرد کردن برگ، ۲۰ میلی گرم ماده پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم با pH=۷ حاوی ۰/۲ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر متابی سولفیت سدیم به آن اضافه شد. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. برای اندازه گیری غلظت پروتئین، ۳۰ میکرولیتر روشنآور استخراج شده را به همراه ۷۲۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط نموده و پس از ۵ دقیقه، میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV Mini 1240, Japan) خوانده شد. غلظت پروتئین در نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین آلبومین سرم گوساله گاوی، بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد (Bradford, 1976).

آزمون پی سی آر رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-sqPCR)

جهت سنجش بیان نسبی ژن SIHK4-Cytokinin inducer در نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با عصاره های آبی و الکلی گزنه، از آزمون پی سی آر رونویسی معکوس نیمه کمی (RT-sqPCR) مطابق روش (Antiabong et al., 2016) استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از معرف RNX-Plus (Sinaclon-Iran) مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. محاسبه میزان غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 1000 spectrophotometer) انجام شد. برای حذف آلودگی DNA ژنومی و سنتز رشته اول ژنومی cDNA کیت (Quanti Tect, Reverse transcription kit, Cat No. 205311) شرکت کیاژن و آغازگر تصادفی شش تایی (Random hexamer primer) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش دمایی و میزان حجم واکنشگرها در این آزمون برای تکثیر ژن SIHK4-Cytokinin inducer بر اساس مقاله موجود و با بهینه سازی آن بر اساس مواد و دستگاه های مورد استفاده انجام شد (Suzuki et al., 2010). برای انجام این آزمون، ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته و برای انجام آزمون PCR از آن استفاده شد. همچنین جهت تعیین بهترین چرخه تکثیر توالی ژنتیکی هدف از چرخه های ۲۵، ۳۰ و ۳۵ در PCR استفاده شد. مواد این آزمون برای یک واکنش به طور معمول شامل: 10X PCR Buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTP mix به میزان ۰/۵ میکرولیتر (از استوک ۱۰ میلی مولار)، MgCl₂ به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۵۰ میلی مولار)، Reverse Primer به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۱۰ پیکومول)، Forward Primer به میزان ۱ میکرولیتر (از استوک ۱۰ پیکومول) مطابق جدول ۱، آنزیم Taq DNA Polymerase (5 U/mL) شرکت فرمنتاس به میزان ۰/۲ میکرولیتر و آب مقطر استریل D.D.W (nuclease free) به میزان ۱۶/۸ میکرولیتر بود. برای آزمون RT-sqPCR از ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی برای نرمال کردن داده ها استفاده شد. برنامه دمایی استفاده شده برای آغازگرهای مختلف مورد استفاده شبیه بودند و آزمون PCR به صورت doublex RT-PCR انجام شد. برنامه حرارتی عبارت بود از ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد یک چرخه برای

واسرشت سازی اولیه و ۳۲ چرخه حرارتی شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای واسرشت سازی، ۲۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگر و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای طویل سازی و در نهایت یک چرخه حرارتی به مدت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت طویل سازی نهایی. بعد از اتمام PCR برای مشاهده مناطق تکثیر شده تولیدات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. از مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp (سیناکلن، ایران) در الکتروفورز استفاده شد. سنجش میزان رونوشت های RNA از ژن SIHK4-Cytokinin inducer در برگ گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره های آبی و الکلی گزنه و گیاهان تیمار نشده به عنوان شاهد با استفاده از RT-sqPCR صورت گرفت. مقدار عددی و انحراف از معیار ($\pm$ SD) هر نمودار از سنجش کمی میزان میانگین شدت نور مربوط به باندهای حاصل از PCR ژن هدف بر 18SrRNA در سه تکرار و توسط نرم افزار Image J و بر مبنی عدد ۱ محاسبه شده است.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای سنجش کمی بیان ژن SIHK4-Cytokinin inducer

Table 1. Informations for the primers used to quantitative assessment of SIHK4-Cytokinin inducer gene expression level.

نام آغازگر Primer Names	اندازه محصول PCR (bp) PCR amplicon size (bp)	نوع آغازگر Kind of primer	توالی آغازگر Primer Sequence	دمای ذوب (°C) Melting Temperature (°C)	منبع Reference
SLHK4-Cytokinin inducer	200	F	5'-ACTGGAGAATACTCATCTCT-3'	60	Suzuki <i>et al.</i> , 2010
		R	5'-GAGTACTTTTGCTGAGTACA-3'	63	
18srRNA	461	F	5'-AACGGCTACCACATCCAAG-3'	57	Suzuki <i>et al.</i> , 2010
		R	5'-TCATTACTCCGATCCCGAA-3'	55	

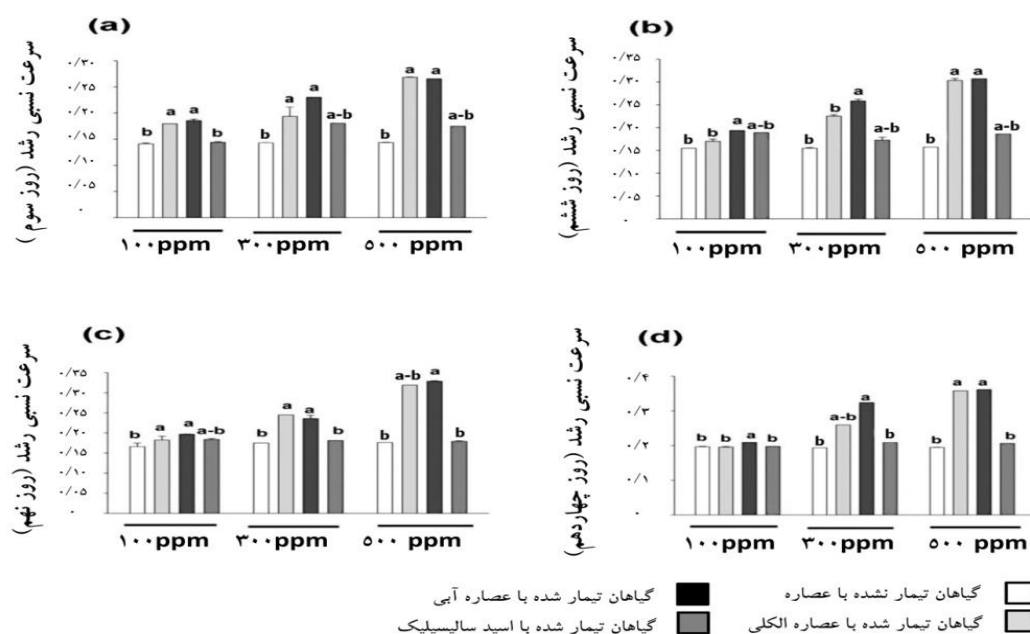
تجزیه و تحلیل آماری داده ها

آزمون های این پژوهش با سه تکرار و در هر تکرار با حداقل ۵ نمونه برای هر یک از تیمارها (عصاره الکلی و آبی) به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. گیاهان تیمار نشده با عصاره گیاه گزنه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. همچنین از اسیدسالیسیلیک به عنوان ماده موثر در افزایش مولفه های بیوشیمیایی و رشد گیاهان با غلظت های مشابه با عصاره های آبی و الکلی گزنه جهت ارزیابی میزان کارایی عصاره ها در القای مولفه های فوق استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده ها، از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱ درصد استفاده شد. تجزیه داده ها برای صفات مورد بررسی با استفاده از نرم افزار SAS (2009) انجام گرفت.

نتایج

در این بررسی، اثر عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه کوهی ایران در غلظت های مختلف بر خصوصیات زیستی و رشدی گیاه گوجه فرنگی مورد ارزیابی قرار گرفت تا الگویی مناسب برای استفاده از آن در سیستم های تولیدی گلخانه ای ارائه شود. با توجه به داده های حاصل، عصاره های آبی و الکلی گزنه موجب افزایش معنی دار سرعت نسبی رشد در گیاهان گوجه فرنگی شدند (شکل ۱). در اغلب تیمارها، تفاوت معنی داری بین عصاره آبی و عصاره الکلی گزنه از لحاظ افزایش سرعت نسبی رشد در گیاه گوجه فرنگی وجود نداشت و استفاده از غلظت های بالاتر هر یک از عصاره ها موجب شد سرعت نسبی رشد بیشتر افزایش

یابد. در واقع، رابطه معنی داری بین سرعت نسبی رشد و غلظت عصاره وجود داشت (شکل ۱). در روز ۱۴ پس از تیمار، بالاترین میزان رشد تا حدود ۲ برابر نمونه کنترل منفی در گیاهان تیمار شده با غلظت های ۵۰۰ ppm عصاره های آبی و الکلی و ۳۰۰ ppm عصاره آبی مشاهده شد. اگرچه در غلظت های مذکور از عصاره های آبی و الکلی تفاوت معنی داری در سرعت نسبی رشد گیاهان تیمار شده، در روزهای مختلف بعد از تیمار وجود نداشت. همچنین نتایج بیانگر آن بود که ماده اسید سالیسیلیک در غلظت ها و روزهای مختلف پس از تیمار موجب افزایش معنی دار سرعت نسبی رشد در نمونه های تیمار شده در مقایسه با شاهد نمی شود (شکل ۱). در مجموع می توان نتیجه گرفت که عصاره های آبی و الکلی گزنه با توان یکسان موجب افزایش سرعت نسبی رشد گیاهچه های گوجه فرنگی شدند و بیشترین تاثیر، ۱۴ روز پس از تیمار با غلظت ۵۰۰ ppm عصاره های آبی و الکلی گزنه مشاهده شد.

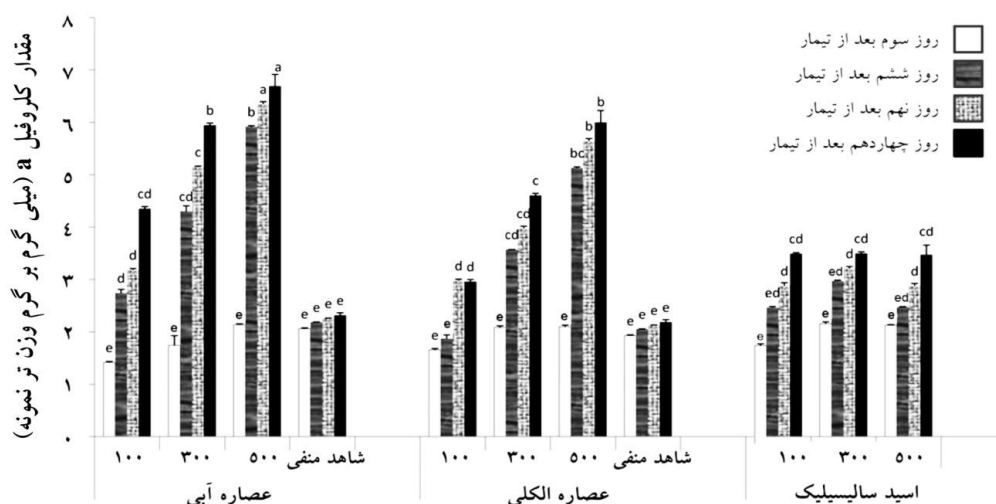


شکل ۱: مقایسه سرعت نسبی رشد در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ ppm)، از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسید سالیسیلیک پس از ۳ روز (a)، ۶ روز (b)، ۹ روز (c) و ۱۴ روز (d) بر مبنای میلی گرم ماده خشک تولید شده به ازای واحد ماده خشک اولیه برگ در طول زمان. گیاهان تیمار نشده به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.01$).

Figure 1. Comparing the relative growth rate between the treated tomato samples. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. The relative growth rate was assessed on the basis of the milligram of the produced dry mass during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment in relation to the primary dry mass of the leaf. Not treated plant just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$.)

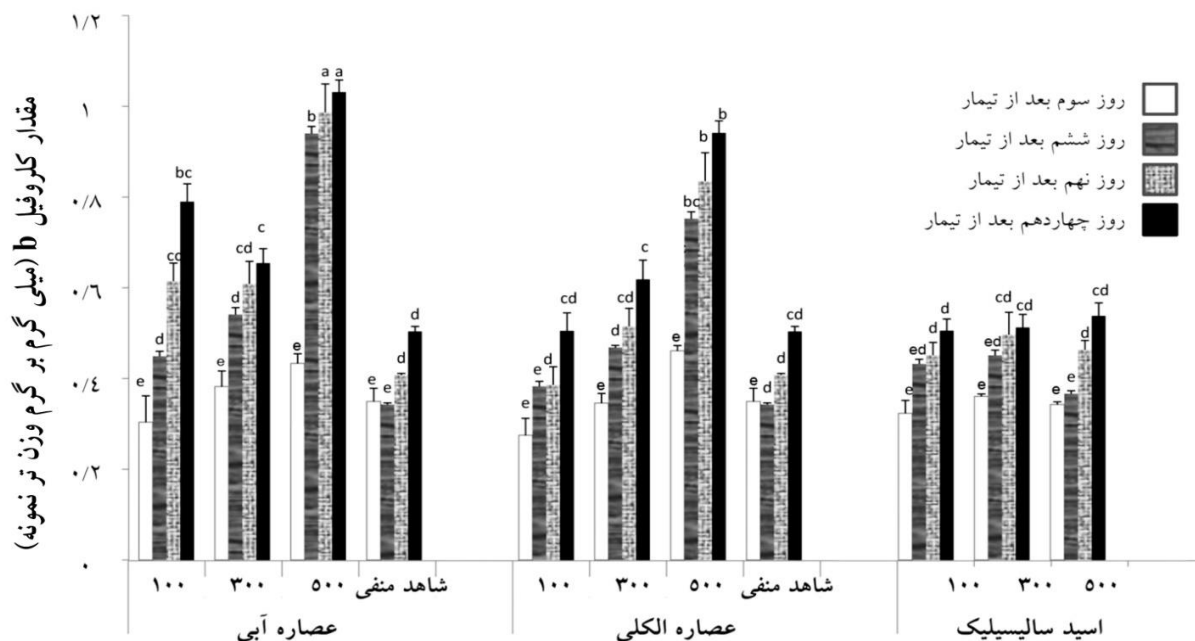
نتایج نشان داد که تیمار با عصاره های آبی و الکلی گزنه در غلظت های مختلف موجب افزایش معنی دار مقدار کلروفیل های a و b در گیاهان گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد می شوند (شکل های ۲ و ۳). در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm عصاره

های آبی و الکلی مقدار کلروفیل های a و b در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت و بهترین تاثیر در غلظت ۵۰۰ ppm عصاره های آبی و الکلی تا ۳/۵ برابر نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. نتایج بیانگر تفاوت معنی دار بین مقدار کلروفیل های a و b در تیمار با غلظت های ۱۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm، در روزهای ۹ و ۱۴ در مقایسه با شاهد بود. با این وجود غلظت های مورد استفاده عصاره های آبی و الکلی گزنه در روز سوم بعد از تیمار در مقایسه با سایر روزها در نمونه شاهد کمتر در افزایش مقدار کلروفیل های مورد سنجش تاثیر گذار بودند. همچنین نتایج نشان داد کاربرد عصاره آبی در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm موثرتر از عصاره الکلی در همان غلظت ها است (شکل ۲). اسیدسالیسیلیک تنها در زمان های ۹ و ۱۴ روز بعد از تیمار در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm موجب افزایش معنی دار مقدار کلروفیل های a و b در مقایسه با نمونه شاهد گردید ولی تاثیر آن در افزایش مقدار کلروفیل ها در سایر زمان ها و غلظت های عصاره گزنه معنی دار نبود (شکل های ۲ و ۳) و غلظت ۵۰۰ ppm موثرترین غلظت بود.



شکل ۲: مقایسه مقدار کلروفیل a در برگ گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۳۰۰ و ۵۰۰ ppm) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. مقدار کلروفیل a بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد. نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.01$).

Figure 2. Comparing the chlorophyll a content in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of chlorophyll a over the fresh weight unit during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just received water used as the negative controls, beside other treatments in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$).

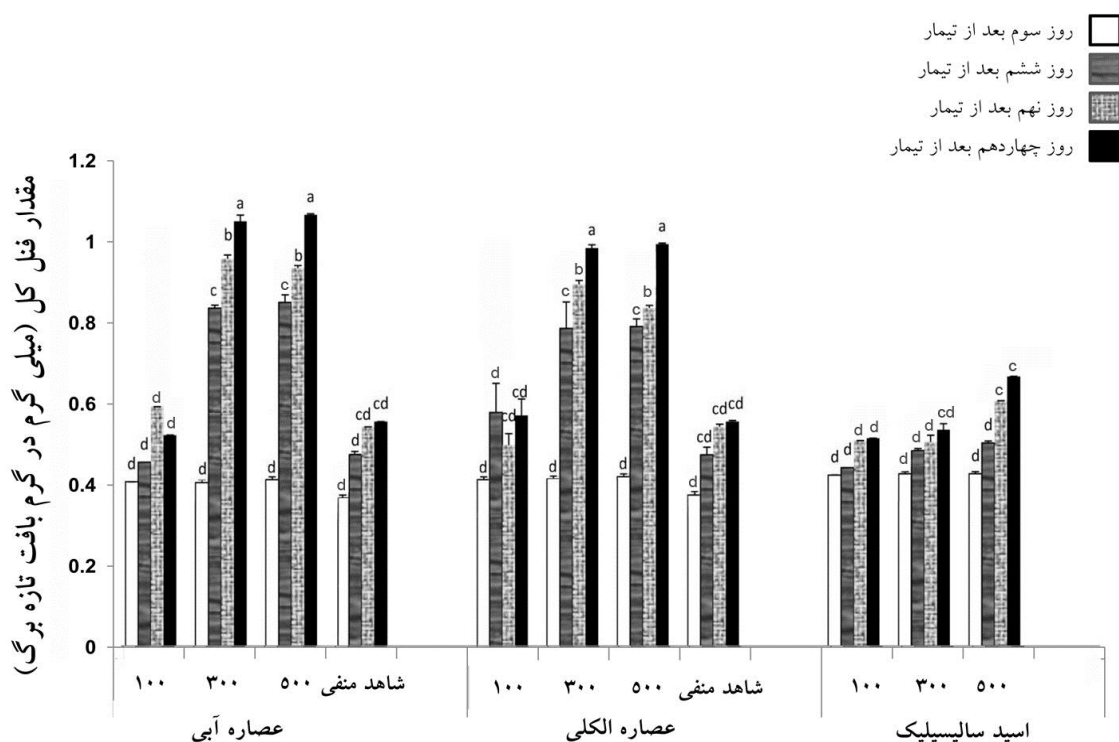


شکل ۳: مقایسه تغییر مقدار کلروفیل b در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ ppm) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. مقدار کلروفیل b بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد. نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.01$).

Figure 3. Comparing the chlorophyll b content in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of chlorophyll b over the fresh weight unit during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just relieved the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$.)

نتایج این تحقیق بیانگر تاثیر مثبت کاربرد عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه در افزایش مقدار فنل کل در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده به صورت وابسته به غلظت بود (شکل ۴). تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت های ۳۰۰ ppm و ۵۰۰ ppm عصاره های آبی و الکلی در روزهای ۶، ۹ و ۱۴ بعد از تیمار موجب افزایش معنی دار مقدار فنل کل تا ۲/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد شدند. غلظت ۱۰۰ ppm عصاره های آبی و الکلی گزنه در زمان های مورد تحقیق بعد از تیمار موجب افزایش معنی دار مقدار

فنل کل در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد نشد (شکل ۴). بهترین تاثیر هر کدام از عصاره ها در غلظت ۵۰۰ ppm عصاره دیده شد (شکل ۴). به غیر از غلظت ۱۰۰ ppm در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی داری بین روزهای ۶، ۹ و ۱۴ پس از تیمار و افزایش فنل کل در برگ گیاهان مورد بررسی در مقایسه با شاهد مشاهده شد. اسیدسالیسیلیک تنها در غلظت ۵۰۰ ppm در روزهای نهم و چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل در بافت برگ گیاهان گوجه فرنگی گردید و در سایر غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی، افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل بافت برگ در نمونه‌های گوجه فرنگی تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد منفی مشاهده نشد (شکل ۴).

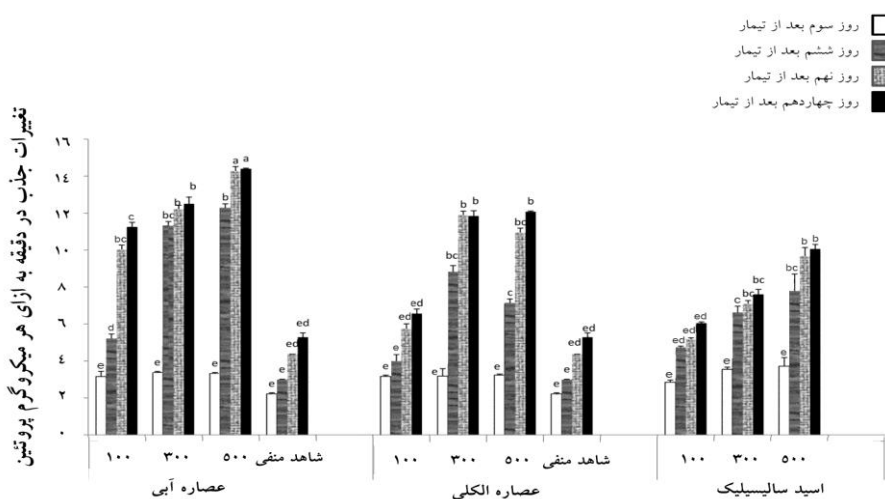


شکل ۴: مقایسه تغییر مقدار فنل کل در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۳۰۰، ۵۰۰ ppm و ۱۰۰) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.01$).

Figure 4. Comparing the amount of total phenol in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data expressed as the milligram of the available total phenol over the fresh weight of the treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment for each sample. Plants just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$).

نتایج بیانگر آن بود که فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX) در نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در روزهای ۶، ۹ و ۱۴ روز بعد از تیمار در مقایسه با گیاه شاهد بطور معنی دار افزایش یافته است و در هیچکدام از تیمارها افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم در روز سوم بعد از تیمار مشاهده نشد (شکل ۴).

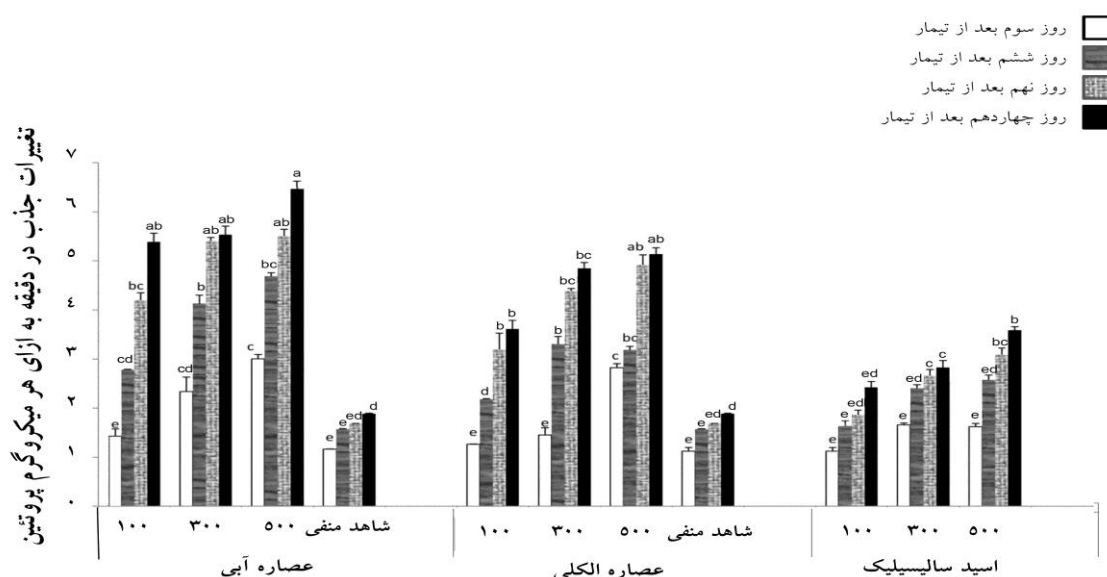
۵). به غیر از عصاره آبی در هیچکدام از تیمارها افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم POX در مقایسه با نمونه شاهد در غلظت ۱۰۰ ppm در زمان های بعد از تیمار مشاهده نشد (شکل ۵). با افزایش غلظت عصاره های آبی و الکلی گزنه از ۳۰۰ ppm به ۵۰۰ ppm میزان فعالیت اختصاصی POX در گیاهان تیمار شده در تمام روزهای مورد بررسی به غیر از روز سوم بعد از تیمار در مقایسه با نمونه شاهد منفی بطور معنی دار افزایش یافت. تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm عصاره آبی در روزهای ۹ و ۱۴ بعد از تیمار به ترتیب موجب افزایش معنی دار فعالیت اختصاصی آنزیم POX به میزان ۳ برابر و با عصاره الکلی در غلظت ها و زمان های مذکور تا ۲ برابر نمونه شاهد شد. همچنین مشخص شد عصاره آبی گزنه تاثیر بیشتری را در افزایش فعالیت اختصاصی این آنزیم در مقایسه با عصاره الکلی دارد. در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با اسیدسالیسیلیک نیز فعالیت این آنزیم در مقایسه با گیاهان تیمار نشده به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت. غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک در روزهای نهم و چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی دار فعالیت اختصاصی POX به ترتیب به میزان ۲ و ۱/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی شدند و غلظت ۱۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک تاثیر معنی داری در فعالیت آنزیم POX در روزهای مختلف بعد از تیمار نداشت (شکل ۵).



شکل ۵: ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX) در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۳۰۰، ۵۰۰ ppm) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم بر مبنی میزان واحد آنزیم بر پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.01$).

Figure 5: valuating the peroxidase (POX) specific activity in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data evaluated by the level of the POX enzyme unit over the microgram of the total protein of treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment. Plants just received the water

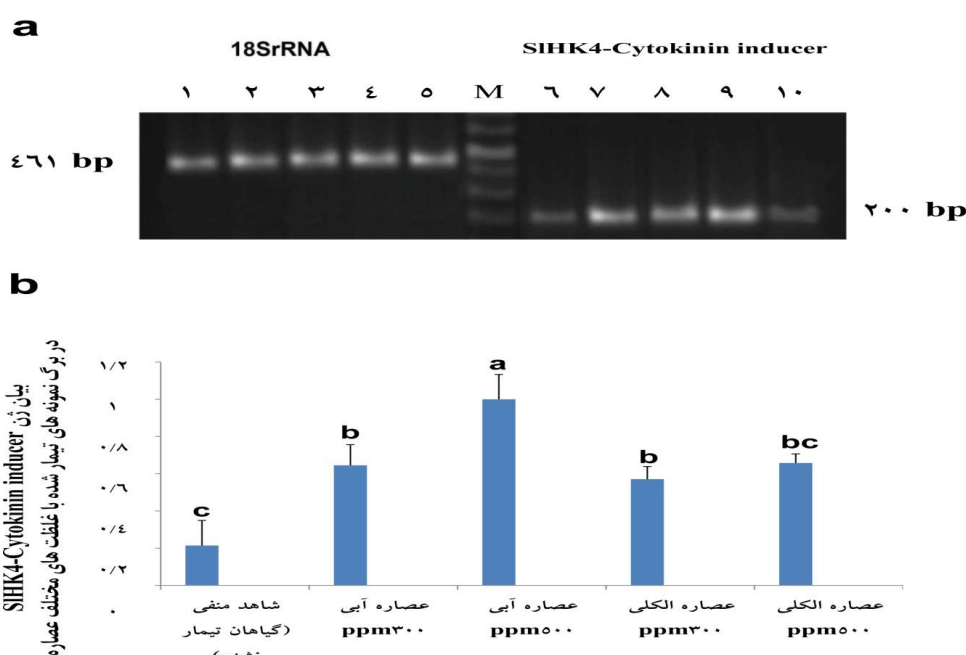
فعالیت اختصاصی آنزیم PPO در نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با عصاره های گزنه نیز مانند، آنزیم POX در روزهای ششم، نهم و چهاردهم پس از تیمار روند افزایشی معنی دار در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد. هردو عصاره آبی و الکلی گزنه موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم PPO در تمامی غلظت های مورد استفاده شدند و بیشترین میزان افزایش در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm عصاره های آبی گزنه در روز چهاردهم پس از تیمار به میزان ۴ و ۳/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۶). عصاره الکلی گزنه در غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm در روز چهاردهم پس از تیمار موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم PPO به میزان ۳ برابر در مقایسه با نمونه شاهد شد (شکل ۶). نتایج نشان داد غلظت ۵۰۰ ppm عصاره آبی گزنه دوپایه در مقایسه با سایر تیمارها به میزان بیشتری موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم PPO در گیاهان گوجه فرنگی تیمار می شود. تیمار گیاهان گوجه فرنگی با غلظت های ۵۰۰ ppm و ۳۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک تنها در زمان های ۹ و ۱۴ روز پس از تیمار موجب افزایش معنی دار فعالیت اختصاصی آنزیم PPO به میزان ۲ برابر در مقایسه با نمونه شاهد شد و غلظت ۱۰۰ ppm آن در هیچکدام از زمان های بعد از تیمار موجب افزایش معنی دار PPO نشد (شکل ۶).



شکل ۶: ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در برگ نمونه های گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف (۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰) از عصاره های آبی و الکلی گزنه دوپایه و اسیدسالیسیلیک پس از ۳، ۶، ۹ و ۱۴ روز. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم بر مبنی میزان واحد آنزیم بر پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. از نمونه های تیمار نشده با عصاره به عنوان شاهد استفاده شد. حروف غیر یکسان روی نمودارها نشان دهنده تفاوت معنی دار است

Figure 6. Evaluating the Polyphenoloxidase (PPO) specific activity in tomato leaves treated with the alcoholic and aquatic of Bipod nettle weed extracts. Tomato samples treated with the 100, 300 and 500 ppm concentrations of the salicylic acid and the alcoholic and aquatic extracts of the Bipod nettle weed extracts, distinctly. Data evaluated by the level of the PPO enzyme unit over the microgram of the total protein of treated tomato leaf during the 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 14 (d) days after treatment. Plants just received the water used as the negative controls in each assay. Letters on the histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$). ($P < 0.01$)

در این پژوهش میزان بیان نسبی ژن مسئول تولید پروتئین القاشونده توسط سیتوکینین (SIHK4-Cytokinin inducer) به عنوان شاخصی برای ارزیابی میزان تولید این تنظیم کننده رشدی در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با عصاره گزنه مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت های ۳۰۰ ppm و ۵۰۰ ppm از عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه میزان بیان ژن SIHK4-Cytokinin inducer را به طور معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش دادند (شکل ۷). اگرچه عصاره آبی تاثیر بیشتری را در مقایسه با عصاره الکلی داشت. با توجه به نتایج بدست آمده، تیمار با غلظت های ۳۰۰ ppm و ۵۰۰ ppm عصاره آبی گزنه به مدت ۱۴ روز، به ترتیب موجب افزایش ۳ و ۵ برابری میزان بیان ژن مذکور نسبت به شاهد شد در صورتی که غلظت های مختلف عصاره الکلی هر یک موجب افزایش میزان بیان ژن تا حدود ۳ برابر گیاهان شاهد شدند (شکل ۷). در عصاره های آبی و الکلی گزنه با افزایش میزان غلظت عصاره توان تاثیر در افزایش میزان بیان ژن افزایش پیدا کرد.



شکل ۷: بررسی بیان ژن SIHK4-Cytokinin inducer در برگ گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های ۳۰۰ ppm و ۵۰۰ ppm از عصاره های آبی و الکلی گیاه گزنه دوپایه پس از ۱۴ روز، واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن های SIHK4-Cytokinin inducer (۲۰۰ جفت باز) و 18SrRNA (۴۶۱ جفت باز): ۱ و ۶: شاهد منفی (گیاهان تیمار نشده) و ۲ و ۷: گیاهان تیمار شده با غلظت ۳۰۰ ppm عصاره آبی گزنه، ۳ و ۸: گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ ppm عصاره آبی گزنه، ۴ و ۹: گیاهان تیمار شده با غلظت ۳۰۰ ppm عصاره الکلی گزنه، ۵ و ۱۰: گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ ppm عصاره الکلی گزنه. M: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp. (b) میزان بیان نسبی ژن SIHK4 Cytokinin inducer در برگ گوجه فرنگی تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره های آبی و الکلی گزنه در مقایسه با گیاهان شاهد. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.01$) است.

Figure 7. Semi-quantitative RT-PCR (RT-sqPCR) for the transcript level analysis of the SIHK4-Cytokinin inducer gene in Tomato samples treated with the, 300 and 500 ppm concentrations of aquatic and alcoholic extracts of the Bipod nettle weed extracts, 14 days after treatment. (a) Electrophoresis analysis of the 18SrRNA and SIHK4-Cytokinin inducer gene amplicons after 25

cycles of PCR. Amplified products for SIHK4-Cytokinin inducer and 18SrRNA genes are 200 and 461 bp in size, respectively. Numbers indicate to the different concentrations of the treated nettle extracts for 18SrRNA (1 to 5) and SIHK4-Cytokinin inducer (6 to 10) genes as follow: 1 and 6: negative control in which cDNA from tomato sample treated with just water used as template for PCR; 2 and 7: tomato samples treated with the 300ppm concentration of aquatic nettle extract; 3 and 8: tomato samples treated with the 500ppm concentration of aquatic nettle extract; 4 and 9: tomato samples treated with the 500ppm concentration of ethanolic nettle extract spermidine; 5 and 10: tomato samples treated with the 300ppm concentration of ethanolic nettle extract. M: 100 bp DNA ladder (SinaClon Inc, Iran). The levels of SIHK4-Cytokinin inducer messenger RNA accumulation compared with that of the housekeeping gene 18SrRNA. (b) Assessment by RT-sqPCR of SIHK4-Cytokinin inducer gene transcript levels in leaf tissue of tomato plants treated with the water as control and different concentrations of aquatic and ethanolic nettle extracts. Control: negative control. Each histogram represents the mean +SD (standard deviation) and values obtained from the relative densitometry analysis by Image J software for three independent RT-sqPCR reactions which given as an arbitrary value of 1. Relative band intensities were normalized to the 18srRNA band intensity. Letters on the (histogram indicated to the significant level ($p < 0.01$).

بحث

گیاهان دارویی به عنوان منابع سرشار از ترکیبات آلی مختلف مانند پروتئین‌ها، فنل‌ها، پتیدها و متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (Waziri, 2015). در حال حاضر در نقاط مختلف جهان توجه محققین به شناسایی انواع گونه‌های گیاهی با اثرات مطلوب در پزشکی و کشاورزی جلب شده است (Chrubasik *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2012). در این میان در خصوص استفاده از آنها به عنوان تنظیم کننده‌های رشد در گیاهان با امکان تولید گلخانه‌ای مانند گوجه فرنگی توجه زیادی نشده است. پژوهش‌ها نشان داده است که بیشترین میزان ترکیبات شیمیایی گزنه در برگ‌های آن وجود دارد (Gulcin *et al.*, 2004) از اینرو برای این تحقیق از عصاره برگ گزنه استفاده شد. نتایج این بررسی در مجموع بیانگر آن بود که هر دو نوع عصاره خام گیاه گزنه (آبی و الکلی) می‌توانند در غلظت ۵۰۰ ppm در طول زمان موجب افزایش قدرت زیستی گیاه و بهتر شدن رشد گیاه گوجه فرنگی شوند. در این بررسی مشخص شد که هریک از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از توان افزایش سرعت نسبی رشد گیاه گوجه فرنگی برخوردارند و با افزایش میزان غلظت عصاره‌ها سرعت نسبی رشد افزایش پیدا می‌کند. سرعت نسبی رشد تابعی از وزن خشک گیاهچه‌های گوجه فرنگی بوده و افزایش آن بیانگر تثبیت بیشتر CO_2 در بافت‌های در حال رشد است. به این مفهوم که عصاره‌ها توانسته‌اند موجب بالا رفتن نرخ فتوسنتز، افزایش متابولیسم و احیای بیشتر CO_2 در بافت‌های نمونه های تیمار در مقایسه با نمونه کنترل بدون تیمار شوند. در تحقیقات گذشته مشخص شده بود که بین سرعت نسبی رشد و افزایش متابولیسم در گیاهان رابطه مستقیم وجود دارد (Macfarlane *et al.*, 2005; Pyl *et al.*, 2012). Garmendia و همکاران (۲۰۱۸) از عصاره آبی گزنه برای آبیاری مزرعه سیب زمینی استفاده نمودند و مولفه‌های مختلف رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی برگ سیب زمینی های تیمار را در کنار میزان تولید محصول با نمونه شاهد مورد مقایسه قرار داده و نشان دادند که میزان تولید محصول در نمونه های سیب زمینی تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش یافته‌است. این محققین با آنالیز مقدار عناصر معدنی موجود در عصاره آبی گزنه تاثیر مثبت آنرا در افزایش مولفه‌های رشدی سیب زمینی را مرتبط با مقدار بالای نیتروژن و فسفر موجود در عصاره

آبی دانستند. در تحقیقی که به تازگی انجام پذیرفت مشخص شد که استفاده از عصاره آبی گزنه به صورت اسپری رو برگ ها و یا به عنوان کود در خاک می تواند موجب افزایش شاخصه های رشدی و بیوشیمیایی در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) شود (Maricic *et al.*, 2021).

نتایج نشان داد که در نمونه های گوجه فرنگی، تیمار با هر کدام از عصاره های آبی و الکلی گزنه محتوای کلروفیل های a و b در برگ افزایش می دهد. احتمال دارد که عصاره های آبی و الکلی گزنه موجب القای تولید تنظیم کننده های رشدی همچون سیتوکینین در گیاهچه های گوجه فرنگی تیمار شده باشند و از این طریق علاوه بر تسریع رشد گیاه موجب تجمع رنگدانه های فتوسنتزی در گیاهان تیمار شده باشند. افزایش تجمع کلروفیل های a و b در غشاء های تیلاکوئیدی موجب بهتر شدن رشد گیاه گوجه فرنگی می شود (Jianfeng *et al.*, 2015). در تایید نتایج این تحقیق، Maricic و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند عصاره آبی گزنه با افزایش تجمع آهن در برگ های لوبیا موجب بهتر شدن فتوسنتز و تقویت مولفه های بیوشیمیایی مرتبط با رشد و در نهایت بهتر شدن رشد و عملکرد تولید محصول در لوبیا می شود. افزایش میزان محتوی کلروفیل a در بافت برگ گوجه فرنگی می تواند موجب تجمع رنگدانه لیکوپن در میوه و افزایش کیفیت میوه گوجه فرنگی شود (Antiabong *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2018). در مجموع می توان نتیجه گرفت که عصاره های آبی و الکلی گزنه توانسته اند موجب بهتر شدن رشد گیاه گوجه فرنگی شوند.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه گزنه دوپایه می تواند موجب افزایش میزان فنل کل در بافت های گیاه گوجه فرنگی شود. فنل ها ترکیبات آروماتیکی هستند که در جریان چرخه بیوشیمیایی وابسته به اسید شیکیمیک در گیاهان تولید می شوند و عملکردهای زیستی متفاوتی در سلول ها دارند (Duarte *et al.*, 2008). تعداد زیادی از آنها در پاسخ به تنش های زیستی و غیر زیستی محیط نقش دارند (Leser & Treutter 2005; David *et al.*, 2016). همچنین اهمیت این ترکیبات در فرایندهای رشد و نمو گیاهان، تجمع رنگدانه، بهتر شدن کیفیت میوه، ایجاد سدهای فیزیکی در برابر آسیب های مکانیکی، همچنین جلب حشرات گرده افشان، پاسخ های دفاعی گیاه و دفع علف های هرز اثبات شده است (Lo & Nicholson, 1998; Al-Amri, 2013). در یک بررسی، تیمار بذر گوجه فرنگی با اسید شیکیمیک قبل از کاشت، موجب افزایش فاکتورهای رشدی مانند رنگدانه های فتوسنتزی، فندهای محلول در میوه، وزن تر و خشک و مقدار مواد آلی و معدنی شد (Al-Amri, 2013). به این مفهوم که مواد فنلی می توانند موجب بهبود رشد در گیاه گوجه فرنگی شوند.

افزایش مقدار فنل در برگ گوجه فرنگی تیمار شده با هر یک از عصاره های گزنه همزمان با افزایش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز سنجش شده در این تحقیق مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در نمونه های تیمار شده با عصاره های آبی و الکلی گزنه افزایش یافت و در زمان دو هفته پس از تیمار، بیشترین میزان فعالیت آنزیم های مذکور در نمونه های گوجه فرنگی دیده شد (اشکال ۵ و ۶).

پراکسیدازها با کاتابولیسم و اکسیداسیون هورمون اکسین (IAA) در بافت های گیاهان جهت رشد و تمایز ضرورت دارند (Shi *et al.*, 2013) و موجب مقاومت آنها به تنش های زیستی و غیر زیستی می شوند (Almagro *et al.*, 2009; El-Gaied *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2017). نتایج پژوهش ها نشان داده است که پراکسیدازها با افزایش مقدار تنظیم کننده های رشد گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین در گیاهان خانواده بادنجانیان مانند گوجه فرنگی و فلفل موجب افزایش رشد و میزان مقاومت

آنها به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند (Maki & Morohashi, 2006; Pandey et al., 2017). آنزیم پلی فنل اکسیداز در غشاء تیلاکوئید کلروپلاست‌ها به بیشترین میزان در گیاه گوجه‌فرنگی وجود دارد و وظیفه آن اکسیداسیون ترکیبات است (Maki & Morohashi, 2006). اگرچه فعالیت بیش از اندازه آن در میوه گوجه‌فرنگی در انبارداری و پس از برداشت میوه فاکتوری منفی برای حفظ سلامت میوه محسوب شده و موجب قهوه‌ای شدن و فساد میوه می‌شود ولی نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که فعالیت آنزیم مذکور در بهتر رشدن رشد و نمو گیاهان تولید کننده میوه نقش موثری دارد (Thipyapong et al., 2007). تیمار گیاه قاشقک (*Scutellaria alpina* L.) با فرم‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی مانند زآتین و کینتین موجب افزایش محتوی ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی، رنگدانه‌ها، آنزیم‌های مرتبط با پاسخ‌های تنش مانند پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در گیاه و در نهایت موجب افزایش رشد و نمو و مقاومت آن در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی شد (Gerszberg et al., 2015).

در این بررسی مشخص شد که غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی گزنه قادر به افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن مربوط SIHK4-Cytokinin inducer در نمونه‌های گوجه‌فرنگی هستند. به این مفهوم که باعث تحریک به تولید تنظیم کننده رشدی سیتوکینین در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شوند (Shi et al., 2013). در حقیقت نام این ژن مخفف *Solanum lycopersicum* histidine kinase 4 (SIHK4) است. این ژن حاوی اطلاعات ژنتیکی برای ترجمه پروتئینی است که در سلول‌های برگ گیاه گوجه‌فرنگی به عنوان گیرنده سیتوکینین عمل نموده و لذا با افزایش میزان این تنظیم کننده رشدی میزان بیان ژن مذکور و نسخه برداری و تولید mRNA از آن به نسبت میزان سیتوکینین افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش‌های پیشین مشخص ساخت که افزایش تنظیم کننده رشدی سیتوکینین می‌تواند موجب افزایش میزان کلروفیل و ترکیبات فنلی مختلف در بافت‌ها و همچنین جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو منجر به مرگ در بافت‌ها گردد (Honig et al., 2018). در تایید نتایج پژوهش‌های پیشین (Honig et al., 2018)، نتایج این پژوهش نیز نشان داد با افزایش میزان سیتوکینین در بافت‌های تیمار شده با عصاره‌های آبی و الکلی، مقدار کلروفیل‌های a و b و میزان فنل کل موجود افزایش یافته است و عصاره آبی گزنه در غلظت ۵۰۰ ppm بیشترین تاثیر را در این افزایش داشته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عصاره‌های آبی و الکلی گزنه از طریق تاثیر در سیستم ژنتیکی میزبان و افزایش سیتوکینین توانسته اند با تحریک به تولید ترکیبات فنولی در گیاه گوجه‌فرنگی، موجب رشد بهتر و افزایش متابولیسم و توان زیستی آن شوند. از آنجائی که در گذشته ارتباط مستقیمی بین تیمار گیاه گوجه‌فرنگی با اسیدسالیسیلیک و افزایش رشد مشاهده شده بود (Wasti et al., 2012) لذا در این تحقیق از غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک به عنوان تاثیر کننده مثبت در رشد برای تیمار گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی استفاده شد. با این وجود به غیر از تاثیر مثبت معنی‌داری که در افزایش تجمع ماده کلروفیل در بافت برگ گوجه‌فرنگی‌های تیمار مشاهده شد، در سایر فاکتورهای رشدی مورد تحقیق ارتباط معنی‌داری بین نمونه‌های کنترل و تیمار، در غلظت‌های مورد بررسی مشاهده نشد. این احتمال وجود دارد که مصرف اسیدسالیسیلیک به صورت مستقیم در خاک به دلایل متفاوتی از جمله جذب نشدن آن از طریق ریشه، نتوانسته موجب القا بیشتر فاکتورهای رشدی در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با آن در مقایسه با عصاره‌های گزنه مورد بررسی تحت شرایط گلخانه‌ای شود. با این وجود در همین شرایط، عصاره‌های خام گزنه موثر واقع شدند.

پژوهش های گذشته مشخص ساخت که عصاره های آبی و الکلی برگ گزنه دوپایه حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی شامل Fumaric acid و Quercetin است (Otlés & Yalcin, 2012). تاثیر مثبت ترکیبات مختلف فنلی در رشد گیاهان اثبات شده است (Makoi & Ndakideimi, 2007; Sulusoglu, 2014; Ertani *et al.*, 2016). شاید تاثیری که در تحریک رشد گیاهچه های گوجه فرنگی مشاهده می شود بدلیل حضور این ترکیبات فنلی در عصاره های آبی و الکلی گزنه دو پایه باشد.

نتیجه گیری

به طور کلی، محلول پاشی با عصاره های آبی و الکلی گزنه در غلظت مناسب می تواند به عنوان روشی کاربردی برای بهبود رشد گیاه گوجه فرنگی رقم Super Chef مورد استفاده قرار گیرد. تاثیر تیمار با عصاره های آبی و الکلی گزنه بر افزایش خصوصیات رشدی گوجه فرنگی را می توان به دلیل تاثیر آن بر فعالیت آنتی اکسیدانی و تجمع ترکیبات فنلی و همچنین افزایش مقدار تنظیم کننده رشدی سیتوکینین گیاه مرتبط دانست. در مجموع عصاره های آبی و الکلی گزنه توانسته اند در غلظت ۵۰۰ ppm با اضافه شدن مستقیم در خاک تا ۱۴ روز پس از تیمار، با افزایش توان متابولیسمی گیاه گوجه فرنگی، موجب افزایش رشد آن شوند. با این وجود عصاره آبی گزنه در غلظت ۵۰۰ ppm موثرتر از سایر تیمارها بود. بهترین این نتایج می تواند برای استفاده از عصاره های گیاه گزنه به عنوان یک ترکیب زیستی و جایگزین تسریع کننده های شیمیایی رشد موجود در سطح گلخانه های کشور مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

ابراهیم قوچی، ز.، محسن آبادی، غ. (۱۳۹۸). تاثیر نیتروژن آلی و معدنی بر عملکرد و خصوصیات فیتوشیمیایی دو گونه گزنه در منطقه رامسر. مجله فن آوری تولیدات گیاهی. ۱۹ (۲): ۱۶۹-۱۷۹.

عقیقی شاهوردی، م.، عطایی سماق، ح.، ممیوند، ب. (۱۳۹۴). تاثیر عصاره آبی گیاه گزنه (*Urtica dioica L.*) بر مولفه های جوانه زنی و رشد اولیه گیاهچه دو رقم گندم. مجله اکوفیزیولوژی بذر. ۱ (۲): ۸۹-۱۰۴.

Al- Amri, S.M. (2013) Improved growth, productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants through application of Shikimic Acid. Saudi Journal of Biological Sciences 20 (1): 339-345

Almagro, L., Gómez-Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. and Pedreño, M.A. (2009). Class III peroxidases in plant defense reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377-390.

David, A.V.A., Arulmoli, R. and Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. Pharmacognosy Reviews 10 (20): 84-89.

- Antiabong, J.F, Ngoepe, M.G. and Abechi, A.S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World* (9): 935-939.
- Bisht, S., Bhandari, S. and Bisht, N. S. (2012). *Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant. *International Journal of Agricultural Science Research* 2: 250-252.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (7): 248-254.
- Chrubasik, J.E., Boufogalis, B.O., Wagner, H. and Chrubasik, S. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle, effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 14 (7): 568- 579.
- Chandrashekaraiyah, S., Niranjana, S.R. and Umesha, S. (2009). Role of Phenylalanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase in Host Resistance to Bacterial Wilt of Tomato. *Journal of Phytopathology* 157 (9): 552-557.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Di Cesare, L.F., Migliori, C., Ferrari, V., Parisi, M., Campanelli, G., Candido, V. and Perrone, D. (2012). Effects of irrigation-fertilization and irrigation-mycorrhization on the alimentary and nutraceutical properties of tomatoes. In: Lee, T.S. (Ed.), *Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments*. In Tech Press, Rijeka, China. 207-332.
- Duarte, L.M.L., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Negri, G. and Barradas, M.M. (2008). Effect of Potato virus X on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. *Summa Phytopathology* 34 (2): 65-67.
- El-Gaied, L.F., El-Heba, G.A.A. and El-Sherif, N.A. (2013). Effect of growth hormones on some antioxidant parameters and gene expression in tomato, *GM Crops & Food*. 4 (1): 67-73. <https://doi.org/10.4161/gmcr.24324>.
- FAOSTAT. (2012). FAOSTAT Database results from FAO website. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org>.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tinti, A. and Nardi, S. (2016). Biological Activity of Vegetal Extracts Containing Phenols on Plant Metabolism. *Molecules* 21(2): 205. <https://doi.org/10.3390/molecules21020205>.
- Filipovic, V., Ugrenovic, V., Glamoclija, D., Jevdovic, R., Grbic, J. and Sikora, V. (2011). Analysis of Ca, Mg, Fe, and Zn contents in aboveground biomass of wild nettle (*Urtica dioica* L.). *Lek. Sirovine* 31: 47-54.

- Gardner, F.P., Pearce, R.B., and Mitchell, R.L (1985). Physiology of Crop Plants, pp. 187-208. Iowa State University Press, U.S.A.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T. and Kononowicz, A.K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. Plant Cell Tissue and Organ Culture 120 (3): 881-902.
- Godlewska, K., Ronga, D. and Michalak, I. (2021). Plant extracts - importance in sustainable agriculture. Italian Journal of Agronomy 16 (2). 1851-1875.
- Garmendia, A., Raigoin, M.D., Marques, O., Ferriol, M., Royo, J., and Merle, H. (2018). Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. Peer J. 7: :e4729. <https://doi.org/10.7717/peerj.4729>.
- Gulcin, O., Kufrevioglu, I., Oktay, M. and Buyukokuroglu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology 90: 205-215.
- Habibi-Lahigi, S.K., Amini, Moradi, P. and Asaadi, K. (2011). Investigating the chemical composition of different parts extracts of bipod nettle *Urtica dioica* L. in Tonekabon region. Iranian Journal of Plant Physiology 2: 339-342.
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husíčková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms19124045>.
- Jianfeng, W., Dongxian, H., Jinxiu, S., Haijie, D. and Weifen, D. (2015). Non-destructive measurement of chlorophyll in tomato leaves using spectral transmittance. International Journal of Agricultural and Biological Engineering (8) 5: 73- 78.
- Jing, B., Ma, Z., Feng, J., Liang, H., Li, C. and Zhang, X. (2012). Evaluation of the Antiviral Activity of Extracts from Plants Grown in the Qinling Region of China Against Infection by Tobacco mosaic virus (TMV). Journal of Phytopathology 160: 181-186.
- Korpe, D., Iserl, D.A., Sahin, O.D., Cabi, F.I. and Haberal, M. (2012). High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. International Journal of Food Sciences and Nutrition 64 (3): 355-362.
- Kregiel, D., Pawlikowska, E. and Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. Molecules 23 (7): 1664. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>.

- Leser, C. and Treutter, D. (2005) Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds, and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Plant Physiology* 123 (3): 49-56.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement UNIT F4.3 and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemism*. (S1): F4.3.1-F4.3.8.
- Lo, S.C. and Nicholson, R. L. (1998). Reduction of light-induced anthocyanins accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: Implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiology* 116 (3): 979-989.
- Macfarlane, C., Hansen, L.D., Edwards, J., White, D.A. and Adams, M.A. (2005). Growth efficiency increases as relative growth rate increases in shoots and roots of Eucalyptus globulus deprived of nitrogen or treated with salt. *Tree Physiology* 25 (2): 571- 582.
- Maki, H. and Morohashi, Y. (2006). Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. *Journal of Plant Physiology* 163 (1): 1-10.
- Makoi, J.H.J. and Ndakidemi, P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology* 6 (12): 1358-1368.
- Maricic, B., Radman, S., Romic, M., Perkovic, J., Major, N., Urlic, B. Palcic, I., Ban, D., Zoric, Z. and Ban, S.G. (2021). Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Sustainable Agriculture. *Sustainability* 13: 4042-4054. [https:// doi.org/10.3390/su13074042](https://doi.org/10.3390/su13074042).
- Murthy, K.N., Uzma, F. and Srinivas, C.C. (2014). Induction of Systemic Resistance in Tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Plant Sciences* 5 (2): 1799-1811.
- Pandey, V.P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S. and Dwivedi, U.N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem Anal Biochem* 6 (1): 308. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>.
- Pyl, E.T., Piques, M., Ivakov, A., Schulze, W., Ishihara, H., Stitt, M. and Sulpice, R. (2012). Metabolism and Growth in Arabidopsis Depend on the Daytime Temperature but Are Temperature-Compensated against Cool Nights. *The Plant Cell* (24): 2443-2469.
- Rakhshandehroo, F., Modarres, A. and Zamanizadeh, H.R. (2009). Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of *Urtica dioica* L. on rose mosaic viral disease in vitro culture. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 25 (3): 403-413.

- Rakhshandehroo, F., Shahsavan Behboodi, B. and Mohammadi, M. (2012). Changes in Peroxidase Activity and Transcript Level of the MYB1 Gene in Transgenic Tobacco Plants Silenced for the RDR-1 Gene After Systemic Infection with Potato virus Y^o. *Journal of Phytopathology* 160 (4):187-194.
- Rivera, M.C., Wright, E.R., Salice, S. and Fabrizio, M.C. (2012). Effect of plant preparations on lettuce yield. *Acta Horticulture* 933: 173-179.
- Safamehr, A., Mirahmadi, M. and Nobakht, A. (2012). Effect of nettle (*Urtica dioica*) medicinal plant on growth performance, immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chickens. *International journal of basic science in medicine*. 3 (1): 721-728.
- Shi, X., Gupta, S., Lindquist, I.E., Cameron, C.T., Mudge, J. and Rashotte, AM. (2013). Transcriptome Analysis of Cytokinin Response in Tomato Leaves. *PLoS ONE* 8.1:e55090. doi:10.1371/journal.pone.0055090.
- Sulusoglu, M. (2014). Phenolic Compounds and Uses in Fruit Growing. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 1: 947-956.
- Suzuki, Y., Kihara-Doi, Kawazu, T., Miyake, C. and Makino, A. (2010). Differences in Rubisco content and its synthesis in leaves at different positions in Eucalyptus globules seedlings. *Plant Cell Environ* 33: 1314-1323.
- Wasti, S., Mimouni, H., Smiti, S., Zid, E. and Ben Ahmed, H. (2012). Enhanced salt tolerance of tomatoes by exogenous salicylic acid applied through rooting medium. *OMICS* 16 (4): 200-207.
- Waziri, H.M.A. (2015). Plants as Antiviral Agents. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6 (2): 254-259.

The effect of the aquatic and alcoholic extracts of bipod nettle weed on the growth and some biochemical features of tomato plant under the greenhouse condition

E. Ryazi¹, F. Rakhshandehroo^{2*}, V. Abdossi³

Received: 2021.8.6

Accepted: 2021.9.4

Abstract

In this research, the effects of bipod nettle aquatic and alcoholic extracts on the growth and some biochemical parameters of the tomato plant, Superchef cultivar, were investigated under the greenhouse condition. For this purpose, aquatic and alcoholic extracts are prepared from dried stems and leaves of the nettle weed plant. Tomato seedlings were treated by direct injection of the extracts into the soil rhizosphere medium at the defined concentrations of 100, 300 and 500 ppm. The growth and some biochemical parameters in treated tomato plants were assessed 3, 6, 9, and 14 days after treatment. The expression level of the SIHK4-Cytokinin inducer gene was also evaluated 14 days after the treatment using RT-sqPCR assay. Results showed that aquatic and alcoholic extracts of the nettle plants at the concentration of 500ppm significantly increased the relative growth rate, chlorophyll a and b concentrations, total phenol content, the specific activities of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) as well as the expression level of SIHK4-Cytokinin inducer gene in treated tomato plants. The results of this study can be used as an applicable method to improve the growth of the tomato plant under greenhouse condition.

Keywords: *Gene expression, Nettle, Peroxidase enzyme, Polyphenol oxidase enzyme, Total phenol*

¹ MS.c graduated, Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran,

² Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran, (*corresponding Author: akhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)

³ Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

تاثیر عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار (*Polygonum bistorta* L) بر غلظت گلوکز خون موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

الهام صالحی^{۱*}، مجید مروتی شریف اباد^۱، مهدیه کریمی^۲، مهناز سازی زواره^۲

چکیده

مقدمه: دیابت از شایع‌ترین بیماری‌های قرن حاضر است. عوارض زیاد داروهای شیمیایی مورد استفاده در درمان دیابت، گرایش به درمان توسط گیاهان دارویی را که دارای عوارض جانبی کمتری هستند، روز به روز افزایش می‌دهد. بخشی از اثر ضد دیابتی گیاهان دارویی به فلاونوئیدهای موجود در آن‌ها مرتبط است که با اثر آنتی اکسیدانی خود توانایی مهار استرس اکسیداتیو و دیابت ناشی از آن را دارند. فلاونوئیدهای مختلفی در گیاهان وجود دارد و انجبار گیاهی حاوی فلاونوئید کوئرستین است. لذا در این مطالعه تاثیر عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار بر غلظت گلوکز خون موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین ارزیابی شده است. برای انجام این مطالعه، دیابت با دوز ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین به صورت داخل صفاقی در ۱۵ موش کوچک آزمایشگاهی القا شد و موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند و یک گروه هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. گروه کنترل و دیابتی، نرمال سالین را دریافت کردند و گروه‌های تیمار به ترتیب ۵ mg/kg، ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg، ۴۰ mg/kg و ۸۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار را به مدت ۱۵ روز دریافت کردند. در پایان روزهای دوم، هفتم و پانزدهم مطالعه، خونگیری انجام و میزان گلوکز خون اندازه گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی به کمک نرم افزار SPSS ورژن ۲۵ تحلیل شد. در این مطالعه در تمامی موارد اختلاف آماری $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. **نتیجه:** داده‌ها حاکی از آن بود که به دنبال القای دیابت، میزان گلوکز خون در تمامی گروه‌های دیابتی در طی روزهای سوم، هفتم و پانزدهم افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($P < 0.05$). سطح گلوکز در گروه تیمار شده با عصاره ریشه انجبار در روز هفتم و پانزدهم نسبت به گروه دیابتی، کاهش معنی داری داشت. نتایج این مطالعه نشان داد

۱. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران (* نویسنده مسئول (esalehi@ardakan.ac.ir))

۲. دانشجوی ارشد علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی، دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

که عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار می تواند اثر کاهشی مطلوبی بر غلظت گلوکز خون در موش های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین داشته باشد و بنابراین انتظار می رود که در درمان دیابت مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: استرپتوزوتوسین، انجبار، دیابت شیرین، گلوکز خون، موش کوچک آزمایشگاهی

مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از شایع ترین بیماری های غدد درون ریز است که بر اساس پیش بینی به عمل آمده، بروز آن در آینده در جامعه انسانی افزایش خواهد یافت (Tripathi & Srivastava, 2006). این بیماری موجب افزایش گلوکز خون ناشتا یا بعد از غذا می شود (Whiting *et al.*, 2011). تنظیم و نگهداری گلوکز خون در سطح نرمال نتیجه عملکرد صحیح انسولین است؛ بنابراین کمبود مطلق یا نسبی انسولین در بافت هدف در متابولیسم گلوکز و لیپید تداخل ایجاد می کند و در نتیجه میزان گلوکز خون افزایش می یابد (Jayaprakasam *et al.*, 2005). افزایش میزان گلوکز خون با آسیب به اندام های انتهایی، اختلال در عملکرد و نارسایی اندام ها و بافت ها از جمله شبکه، کلیه، اعصاب، قلب و عروق خونی همراه است (Whiting *et al.*, 2011). افزایش گلوکز خون مزمن ناشی از دیابت به واسطه تولید و تجمع رادیکال های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) سبب بروز فرآیند استرس اکسیداتیو در بافت های بدن، به ویژه سلول های بتای پانکراس می گردد (Tsutsui *et al.*, 2009).

آلوکسان و استرپتوزوتوسین از برجسته ترین عوامل شیمیایی دیابت زا در تحقیقات آزمایشگاهی هستند که هر دو با مکانیسم های مختلف و به طور انتخابی سلول های بتا پانکراس را تخریب می کنند و سپس باعث دیابتی شدن حیوانات می شوند (Szkudelski *et al.*, 1998). استرپتوزوتوسین یکی از آنالوگ های ان استیل گلوکز آمین است بنابراین می تواند باعث آزاد شدن نیتریک اکساید، افزایش گلیکوزیله شدن پروتئین های پانکراسی و زیاد شدن تولید رادیکال های آزاد اکسیژن شود که یکی از دلایل تخریب سلول های بتا پانکراس است و موجب کاهش سطح انسولین می گردد (Donner *et al.*, 1997; Lenzen, 2008). نقش اصلی انسولین پایین آوردن گلوکز خون توسط مکانیسم های مختلف است (Genuth *et al.*, 2003). گلی بنکلامید متداول ترین داروی خوراکی کاهنده گلوکز خون است (Nathan *et al.*, 2009). زمانی که گلوکز خون افزایش می یابد، گلی بنکلامید با تحریک ترشح انسولین از سلول های بتا موجود در لوزالمعده، موجب کاهش گلوکز خون می شود (Rajasekaran *et al.*, 2005). در حال حاضر درمان اصلی و مؤثر دیابت نوع ۱ استفاده از انسولین و داروهای کاهنده گلوکز خون است که دارای عوارض جانبی نامطلوبند (Graham *et al.*, 2007).

با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، بسیاری از گیاهان به عنوان منابع آنتی اکسیدان طبیعی پیشنهاد شده اند که می توانند این اثرات جانبی را کاهش دهند (Malekiran, 2016). انجبار با نام علمی *Polygonum bistorta* L گیاهی چند

ساله متعلق به خانواده علف هفت بند Polygonaceae است. معمولاً با نام‌های bistort یا Snakeroot شناخته می‌شود (Manoharam *et al.*, 2005; Thulesen *et al.*, 1997). این گیاه در مناطق غرب کشور در همدان، ارتفاعات کوهستان الوند و نیز ارتفاعات کوه سهند در آذربایجان می‌روید (Heydari *et al.*, 2015). انجبار از طریق ساقه صاف، ساده و برگ‌هایی که در بالا سبز و در زیر کدر هستند و همچنین ساقه زیرزمینی ضخیم، استوانه‌ای، به هم چسبیده و پوشیده شده با ریشک‌های فراوان، شناسایی می‌شود (Ozbay & Alim, 2009; Delima *et al.*, 2010). این گیاه در فواصل ماه ژوئن تا سپتامبر شکوفا می‌شود (Srivastava, 2014). گل‌های کوچک سفید، سبز یا صورتی رنگ می‌دهد (Narasimhula *et al.*, 2014). انجبار دارای ترکیبات زیست فعالی مانند فلاونوئید، تانن و اسید فولیک است که برای درمان هموروئید، واژینیت، التهاب غدد لنفاوی، عفونت حاد تنفسی و اپستاز استفاده می‌شود (Intisar *et al.*, 2012). فلاونوئیدها گلوکز خون را از طریق فعالیت تزایدی گیرنده‌های گاما پراکسی زوم کاهش می‌دهند (Shahabinezhad *et al.*, 2007; Nickavar *et al.*, 2008). بنابراین وجود آنتی اکسیدان‌هایی مثل فلاونوئیدها در رژیم غذایی می‌تواند اثرات حفاظتی در بیماران دیابتیک داشته باشد (Kato *et al.*, 2008; Custro *et al.*, 2001; Lecube *et al.*, 2004).

با توجه به اینکه گیاه انجبار حاوی فلاونوئید و ترکیبات آنتی اکسیدانی است، بنابراین تجویز عصاره گیاه منظور ممکن است در کاهش غلظت گلوکز خون مؤثر باشد و چون در مورد خواص ضد دیابتی این گیاه تحقیقی صورت نگرفته است بر آن شدیم تا تاثیر عصاره هیدروالکلی این گیاه را بر غلظت گلوکز خون موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی تحت تاثیر استرپتوزوتوسین، مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

ریشه‌های تازه گیاه انجبار از ارتفاعات سهند در آذربایجان جمع آوری شد و جنس و گونه آن توسط کارشناس هرباریوم دانشکده کشاورزی یزد تایید شد. نمونه‌ای از این جنس در هرباریوم این دانشکده با کد ۷۴۱ نگهداری می‌شود. ابتدا ریشه‌ها به قطعات کوچکتر تبدیل و سپس در سایه خشک شدند (Babre *et al.*, 2010). بعد از پودر کردن ریشه‌ها با آسیاب، ۳۰ گرم از پودر بدست آمده در ۱۲۰۰ میلی لیتر مخلوط اتانول و آب مقطر خیسانده شد و بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق، آن را فیلتر و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ انجام شد و سپس مایع رویی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شد (Ahangarpour *et al.*, 2012). سرانجام توده نیمه جامد بدست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Babre *et al.*, 2010).

مراحل آزمون و دیابتی کردن موش‌ها

در این پژوهش، از ۲۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد Balb/c خریداری شده از مرکز تحقیقات ناباروری یزد با میانگین وزنی 36 ± 3 گرم، استفاده شد. جهت ایجاد تطابق با محیط جدید، موش‌های خریداری شده در محل اتاق حیوانات دانشکده دامپزشکی با رعایت دمای حدود ۲۷-۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد به مدت یک هفته نگهداری شدند. لازم به ذکر است که همه‌ی حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. بعد از سپری شدن دوره سازش پذیری، موش‌ها وزن و نشانه گذاری شدند و تزریق داخل صفاقی با دوز مشخص در دمای ۲۵ درجه بر روی آنها انجام گرفت. برای ایجاد دیابت در موش‌ها، به جز گروه کنترل، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از روش تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن داروی استروپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلدریج) به صورت تک‌دوز استفاده شد (Gupta et al., 2004) و از بافر سیترات ۰/۱ مولار به عنوان حلال استفاده گردید (Damasceno et al., 2014). ۴۸ ساعت بعد از القای دیابت با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Beurer medical, Art. Nr.461.10, 89077 ULM Germany) و (Khalili et al., 2020) با اخذ یک قطره خون از ورید دمی میزان گلوکز خون اندازه‌گیری شد. مبنای دیابتی شدن میزان گلوکز خون بالای ۳۰۰ mg/dl در نظر گرفته شد (Farajpour et al., 2017).

گروه بندی حیوانات

در این مطالعه، حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه کنترل، دیابتی، تجربی ۱ و تجربی ۲ تقسیم شدند ($n=5$). گروه کنترل، این گروه در طول آزمایش فقط نرمال سالین دریافت کردند. گروه دیابتی، این گروه در روز اول پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، استروپتوزوتوسین را به صورت تک‌دوز به میزان ۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و در طول آزمایش، نرمال سالین به صورت گاوژ به آنها خوراندند. گروه تجربی ۱، این گروه در روز اول پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، استروپتوزوتوسین را به صورت تک‌دوز به میزان ۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و سپس روزانه داروی گلی‌بنگلامید (شرکت مینو) (Shokri et al., 2015) را با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ تا ۱۵ روز دریافت کردند. گروه تجربی ۲، این گروه در روز اول پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، استروپتوزوتوسین را به صورت تک‌دوز به میزان ۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و سپس روزانه عصاره ریشه گیاه انجبار با دوز ۱۵۰ mg/kg وزن بدن را به صورت گاوژ تا ۱۵ روز دریافت کردند. در دومین و هفتمین روز بعد از القا دیابت، خون‌گیری از ورید دمی انجام شد و در پانزدهمین روز پس از القا دیابت، کلیه موش‌ها از طریق قرار گرفتن در ظرف محتوی کلروفرم بیهوش و سپس یوتنایز شدند و پس از اخذ خون از قلب حیوانات میزان گلوکز خون کلیه نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه، نرم‌افزار SPSS Version 25 برای آنالیز داده‌های کمی مورد استفاده قرار گرفت (Morovati sharifabad et al., 2020). تمام مقادیر به دست آمده در این مطالعه به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند (Shokri et al., 2015). تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از اندازه‌گیری مکرر آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و به دنبال آن مقایسه فردی بین گروه‌های آزمایشی با آزمون تکمیلی توکی برآورد شد (Kiasalari et al., 2013). در این مطالعه اختلاف آماری $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد (Shokri et al., 2015).

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه به شرح زیر است:

مقایسه داده‌های حاصل از سنجش میزان گلوکز خون (میلی گرم در دسی لیتر) در گروه‌های مختلف آزمایش و در روزهای مختلف که با عصاره گیاه انجبار درمان شده‌اند.

میزان گلوکز خون (میلی گرم در دسی لیتر)			
گروه‌ها	روز سوم	روز هفتم	روز پانزدهم
گروه ۱	$97/28 \pm 2/3^b$	$75/08 \pm 3/5^b$	$61/92 \pm 2/6^b$
گروه ۲	$233/98 \pm 9/6^a$	$220/44 \pm 7/9^a$	$235/22 \pm 6/1^a$
گروه ۳	$206/46 \pm 25/7^c$	$183/98 \pm 7/3^c$	$130/50 \pm 4/9^c$
گروه ۴	$232/24 \pm 5/25^a$	$191/84 \pm 3/03^{c,d}$	$133/96 \pm 9/3^{c,d}$

گروه ۱: کنترل، گروه ۲: دیابتی، گروه ۳: تجربی ۱ (تیمار شده با داروی گلی بنکلامید)، گروه ۴: تجربی ۲ (تیمار شده با عصاره ریشه انجبار). حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف

معنی دار بین گروه‌ها است. ($P < 0.05$)

طبق نتایج نشان داده شده در جدول و با توجه به آنالیز آماری صورت گرفته در پایان تیمار، میزان گلوکز خون در گروه دیابتی طی روزهای سوم، هفتم و پانزدهم، افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. مقادیر گلوکز خون در روزهای سوم، هفتم و پانزدهم آزمایش در گروه تیمار شده با گلی بنکلامید و همچنین مقادیر گلوکز خون در روزهای هفتم و پانزدهم آزمایش در گروه تیمار شده با عصاره ریشه گیاه انجبار نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده کاهش معنی داری را نشان داد. همچنین اختلاف معنی داری بین گروه تیمار شده با عصاره و گلی بنکلامید در روزهای هفتم و پانزدهم مشاهده نشد. تیمار با دارو در روز هفتم نسبت به روز سوم کاهش معنی داری را نشان نداد ولی میزان گلوکز خون در روز پانزدهم نسبت به روز هفتم کاهش معنی داری را نشان داد. تیمار با عصاره در روز هفتم نسبت به روز سوم و همچنین روز پانزدهم نسبت به روز هفتم کاهش معنی داری را نشان داد.

بحث

در این مطالعه اثر عصاره گیاه انجبار برافزایش غلظت گلوکز خون ناشی از دیابت تجربی ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تیمار با عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه انجبار با دوز ۱۵۰ mg/kg به صورت معنی دار باعث کاهش غلظت گلوکز خون در مقایسه با گروه دیابتی گردید.

بیماری دیابت به دلیل نقص در تولید انسولین بوجود می‌آید (Gallou *et al.*, 1993). مصرف برخی از گیاهان دارویی در درمان دیابت مؤثر واقع شده است (Khaksari, 2000). آنتی اکسیدان موجود در گیاهان با تاثیر بر سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس، باعث افزایش میزان انسولین و کاهش گلوکز در بدن می‌شوند (Kaneto *et al.*, 1999). در مطالعات انجام شده توسط Byres ، Threpe به استفاده از آنتی اکسیدان‌ها برای تیمار دیابت تاکید کرده‌اند (Tiwari & Rao, 2002). بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره ریشه انجبار نشان داده است که این عصاره دارای ویژگی آنتی اکسیدانی بالا و سمیت سلولی متوسط است (Khalid *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای هیانگ و همکاران (۲۰۰۵) در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی انجبار نشان دادند که عصاره α -بوتیل الکل از گیاه انجبار با افزایش سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش مالون دی آلدئید در بافت میوکارد، کاهش لاکتات دهیدروژناز سرم و کراتین فسفوکیناز، حذف رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها دارای اثرات محافظتی آشکاری بر میوکارد، به صورت وابسته به دوز است (Heyang *et al.*, 2005). Dastoor و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که گیاه انجبار دارای سطح بالایی از فلاونوئیدها است (Dastoor *et al.*, 2018). با توجه به اینکه فلاونوئیدها اثرات ضد التهابی، ضد اکسیدانی و ضد چربی دارند، گیاهانی که دارای ترکیبات فلاونوئید هستند را به عنوان داروی ضد دیابت در نظر گرفته‌اند که این نتیجه در تعداد زیادی از مطالعات *invitro* و *in vivo* منعکس شده است (Burton-Freeman *et al.*, 2019; Ghorbani *et al.*, 2019). پودر ریزوم انجبار دارای ترکیبات منعقد کننده است که دو مورد از آن‌ها به عنوان فلاونول از فلاونوئیدها شناخته شده است (Partovia & Zabihia, 2012). در فرانسه نیز از انجبار در بیماری بواسیر برای قطع خونریزی استفاده می‌شود (Heydary *et al.*, 2015). از انجبار در چین و ژاپن برای درمان برونشیت و اختلالات ریوی و ضایعات پوستی چرکدار و سوزاک استفاده شده است (Coffey, 1994; Ogwuru & Adamczeski, 2000). همچنین Ghelich و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی گیاه انجبار بر رشد برخی از باکتری‌ها را مورد بررسی قرار دادند (Ghelich *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای، کومار و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که انجبار در موش‌های آلبینو که با تتراکلرید کربن و پاراستامول دچار مسمومیت کبدی شده بودند اثر محافظتی دارد (Kumar *et al.*, 2012).

نتایج این مطالعه نشان داد که داروهای شیمیایی فراوانی برای کنترل و درمان دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی متأسفانه تهیه این داروها هزینه بر بوده و باعث درمان قطعی نشده و دارای آثار جانبی نیز می‌باشند. بنابراین به کارگیری

گیاهان در دراز مدت می‌تواند اثر مکملی بر این داروها داشته باشند و با توجه به عوارض جانبی و هزینه کمتر، جایگزینی مناسب برای آنها باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این مطلب است که تیمار با عصاره هیدروالکلی ریشه انجبار می‌تواند در بهبود افزایش غلظت گلوکز خون ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین مؤثر باشد. القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین موجب افزایش گلوکز خون شد. تیمار با عصاره ریشه انجبار موجب کاهش معنی‌دار در غلظت گلوکز خون گردید که نشان دهنده اثرگذاری مؤثر ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌ی فوق بر غلظت گلوکز خون است. هر چند مطالعات بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری جهت استفاده از این گیاه باید انجام شود تا بتواند بر روی نمونه‌های انسانی مورد ارزیابی و استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

در پایان از کلیه عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نموده‌اند به ویژه کارشناس بخش هماتولوژی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

- Ahangarpour, A., Mohammadian, M., & Dianat, M. (2012). Antidiabetic Effect of Hydroalcoholic *Urtica dioica* Leaf Extract in Male Rats with Fructose-Induced Insulin Resistance. *Iranian Journal Medical Sciences*, 37(3): 181–186.
- Babre, N. P., Subal, D., Yalagatti, M., Gajanan, D., Hariprasath, K., & Kukkala, S. (2010). Hypolipidemic effect of hydro-alcoholic extract of *Barringtonia acutangula* Linn. Root extract on streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(11): 368-371
- Burton-Freeman, B., Brzezinski, M., Park, E., Sandhu, A., Xiao, D., & Edirisinghe, I. (2019). A Selective Role of Dietary Anthocyanins and Flavan-3-ols in Reducing the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Recent Evidence. *Nutrients*, 11(4): 841
- Coffey, T. (1994). *The History and Folklore of North American WildFlowers*. Houghton Mifflin Harcourt: Boston, USA, 210-215
- Castro, N., Carroccio, A., Ganci, A., Scafidi, V., Campagna, P., Prima, L. Di., & Montalto, G. (2001). Glycemic homeostasis in chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. *Diabetes & Metabolism*, 4(1): 476-481

- Damasceno, D. C., Netto, A. O., Iessi, I. L., Gallego, F. Q., Corvino, S. B., Dallaqua, B., & Rudge, M. V. C. (2014). Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes, BioMed Research International, (Vol 2014)
- Dastoor, R., Bakhshi, D., & Aliakbar, A. (2018). Evaluation of Total phenolic and Flavonoid content, Antioxidant capacity and Resveratrol of selected medicinal plant of northern iran. Agriculturea conspectus scientificus, 83(2): 175-180
- Delima, S., Moreira, L., Affonso, V. R., Henriques, A. B., Sato, A., Esquibel, M. A., & Lago, C. L. S. (2010). Micropropagation of *Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* (mart.) Meisn, and seasonal variation of tannins in acclimatized plans. Journal of medicinal plant research, 4(7): 573-578
- Donner, H., Rau, H., Walfish, P. G., Braun, J., Siegmund, T., Finke, R., ... & Badenhop, K. (1997). CTLA4 Alanine-17 Confers Genetic Susceptibility to Graves' Disease and to Type 1 Diabetes Mellitus 1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 82(1): 143-146
- Farajpour, R., Sadigh-Eteghad, S., Ahmadian, N., Farzipour, M., Mahmoudi, J., & Majdi, A. (2017). Chronic Administration of *Rosa canina* Hydro-alcoholic extract attenuates depressive-Like behavior and recognition Memory Impairment in diabetic Mice: a possible role of Oxidative Stress. Medical Principles and Practice, 26(3): 245-250
- Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allanic, H., & Cloarec, L. (1993). Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. Clinica Chimica Acta, 214(2): 227-234
- Genuth, S., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., & Zimmet, P. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus: The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2, Diabetes Care, 26(11): 3160–3167
- Ghelich, T., Hashemi-karouei, M., & Ghlampor-Azizi, I. (2014). Antibacterial effect of Methanolic Extraction of *Polygonum Bistorta* on some Bacteria. Medical laboratory Journal, 8(2): 41-47
- Ghorbani, A., Rashidi, R., & Shafiee-Nick, R. (2019). Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: a mechanistic review. Biomedecine & pharmacotherapies, (vol 111): 947–957 [Article in persion]
- Graham, J. E., Stoeber May, D. G., Ostir, G. V., Snih, S. AL., Peek, M. K., Markides, K., & Ottenbacher, K. J. (2007). Health related quality of life in older Mexican Americans with diabetes: a cross-sectional study. Health and Quality of life Outcomes, 5(1): 1-7 [Article in persion]
- Gupta, S., Kataria, M., Gupta, P. K., Murganandan, S., & Yashroy, R. C. (2004). Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozitocin in rats. Journal of Ethnopharmacology, 90(2-3):185-189
- He-yang, Y., Zhi-hua, H., Xiu-rong, W., Zhou, L., Zhi-ping, H., Wei, H., Jing, Z. (2005). Protective effect of *Polygonum bistora* L. n-butyl alcohol extract on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats in a dosage dependent manner. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation. 699
- Heydari, M., Hashempur, M. H., Ayati, M. H., Quintern D, Nimrouzi, M., & Mosavat, S. H. (2015).The use of Chinese herbal drugs in Islamic medicine. Journal of Integrative Medicine, 13(6): 363-367
- Intisar, A., Zhang, L., Luo, H., Kiazolu, B. J., Zhang, R., & Zhang, W. (2012). Anticancer constituents and cytotoxic activity of methanol-water extract of *Polygonum bistorta* L. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 10(1): 53-59
- Jayaprakasam, B., Vareed, S. K., Olson, L. K., & Nair, M. G. (2005). Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins in Present in fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(1): 28-31

- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J. I., Matsuoka, T. a., Fujitani, Y., Umayahara, Y., & Hori, M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48(12): 2398-2406
- Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. A., & Nash, R. J. (2008). Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 56(17): 8206-8211
- Khaksari, M. (2000). Effect of nutrients containing bean and choicory on blood glucose of diabetic rats .*kowsar Medical journal*, 6(1): 1-8
- Khalid, A., Waseem, A., Saadullah, M., Urreham, U., Khiljee, S., Sethi, A., & Murtaza, Gh. (2011). Antibacterial activity analysis of extracts of various plants against gram-positive and-negative bacteria. *African Journal of Pharmacy and pharmacology*, 5(7): 887-893
- Khalili, R., Hasanzadeh, Sh., Jalali, A. Sh ., Shahrooze, R., Najafi, Gh., & Eimani, M. (2020). The effects of liraglutide on invitro fertilization in mice following exprimental diabetes.Qom university of medical sciences journal, 14(1): 51-60
- Kiasalari, Z., Khalili, M., Roghani, M., Heidari, H., & Azizi, Y. (2013). Antiepileptic and antioxidant effect of hydroalcoholic extract of ferula assa foetida gum on pentylentetrazole-induced kindling in male mice. *Basic and clinical neuroscience*, 4(4): 299 -306
- Kumar, M. D., Deepmala, J., Sangeeta, S. (2012). Hepatoprotective effects of polygonum bistorta and its active principles on albino rats intoxicated with carbon tetrachloride and paracetamol. *Open access scientific report*, 1(4): 226-230
- Lecube, A., Hernandez, C., Genesca, J., Esteban, J. I., Jordi, R., & Simo, R. (2004). High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care*, 27(5): 1171-1175
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxanand-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2): 216-226
- Malekirad, A. A., Nabiyouni, F., Vaezi, Gh., & Abdullahi, M. (2016). The effect of ethanol extract of *Alhagi camelorum* on hepatic and renal functions in streptozotocin induced diabetic rat. *Journal of Experimental Animal Biology*, 1(5): 38-31[Article in Persian]
- Manoharan, K. P., Benny, T. K., & Yang, D. (2005). Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. *Phytochemistry*, 66(19): 2304–2308
- Morovati Sharifabad, M., Lotfi, Z., & Salehi, A. (2020). Protective effects of alcoholic extract of marshmallow (*Althaea officinalis* L.) on diazinon induced liver damage in adult male hamsters. *Journal of Al-Zahra University*, 3 (33): 153-136 [Article in Persian]
- Narasimhula, G., Reddy, K. K., & Mohamed, J. (2014). The genus Polygonum (Polygonaceae): An ethnopharmacological and phytochemical perspectives: review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2): 21-45
- Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Shervin, R., & Zinman, B. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy .*Diabetes care*, 32(1): 193-203

- Nickavar, B., Abou Alhasani, L., & Izadpanah, H. R. (2008). α -Amylase inhibitory activities of Six salvia species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 7(4): 297-303
- Ogwuru, N., & Adamczeski, M. (2000). Bioactive natural products derived from polygonum species of plants: their structures and mechanisms of action. Studies in Natural Products Chemistry, 22(C): 607-642
- Ozbay, H., & Alim, A. (2009). Antimicrobial Activity of Some Water Plants from the Northeastern Anatolian region of Turkey. Molecules, 14(1): 321-328
- Partovia, T., Zabihi, M. (2012). Coagulant compound from rhizomes of *polygonum bistorta* (Linn). Global advanced research journal of engineering, technology and innovation. 1(6): 127-130
- Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., & Subramanian, S. (2005). Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin – induced diabetes in rats. pharmacol Rep, 57(1): 90-96
- Sanchez, A., Schuster T. M., Burke J. M., & Kron, K.A. (2011). Taxonomy of Polygonoideae (Polygonaceae): a new tribal classification. Taxon, 60(1): 151-160
- Shahabinezhad, M., Rahmani, M. R., Khaksari-Hadad, M., Sepehri, Gh., Mahmoodi, M., & Karimghasemi, E. (2007). The Effect of Licorice Root Extract on Blood Sugar Level in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 6(4): 237-244.
- Shokri, H., Farrokhi, F., Heydari, R., & Manaf Far, R. (2015). The effect of hydroalcoholic extract of rhubarb root on blood Glucose and histopathological changes of pancreas in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Qom University of Medical Sciences, 8 (5): 20-26 [Article in Persian]
- Srivastava, R.C. (2014). Family polygonaceae in India. Indian Journal of Plant Sciences, 3(2): 112-150
- Szkudelski, T., Kandulska, K., & Okulicz, M. (1998). Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. Physiological Research, (vol 47): 343-346
- Thulesen, J., Orskov, C., Holst, J. J., & Poulsen, S. S. (1997). Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. Endocrinology, 138(1): 62-68
- Tiwari, A. K., & Rao, J. M. (2002). Diabetes mellitus and multiple therapeutic of phytochemical: present status and future prospect. current science, 83(1):30_38 .
- Tripathi, B. K., Srivastava, A. K. (2006). Diabetes mellitus: complication and therapeutics. Med Sci Monit, 12(7): 130-147
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, Sh. (2009). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. cardiovascular research, 81(3):449-456
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes research and clinical practice, 94(3): 311-321

The effect of hydro alcoholic extract of Bistort (*Polygonum bistorta* L) root on blood glucose concentration of streptozotocin induced diabetic mice

E.Salehi,¹ M. Moravati Sharifabad,¹ M. Karimi,² M. Sazi zavareh²

Received:2021.7.27

Accepted:2021.11.1

Abstract

Diabetes is one of the most common diseases of the present century. The many side effects of the chemical drugs used to treat it increase the tendency to be treated by herbs that have fewer side effects. Part of the anti-diabetic effect of herbs is related to the flavonoids in them, which with their antioxidant effect have the ability to inhibit oxidative stress and diabetes. There are different flavonoids in herbs and Bistort contains quercetin flavonoids, so in this study, the effect of hydroalcoholic extract of Bistort root on blood glucose in streptozotocin diabetic mice has been assessed in the present study. In this experimental study, diabetes was induced by administration of 60 mg/kg of streptozotocin intraperitoneally in 15 mice and they were randomly divided into 3 groups. One group is considered as control. The control and diabetic groups received normal saline and the treatment groups received glibenclamide at a dose 0.5 mg/kg and hydroalcoholic extract of Bistort root at doses of 150 µg/kg for 15 days. At the end of the second, seventh, and fifteenth days of the study, blood samples were taken and blood glucose levels were measured. The data were analyzed by one way Anova and Turkey's test using SPSS 25. In this study, $P<0/05$ was considered. In this study, following the induction of diabetes blood glucose levels in all diabetic groups on the third, seventh, and fifteenth days had a significant increase compared to the control group ($P<0/05$). Blood glucose levels in the group treated with bistort root extract in the seventh and fifteenth days had a significant decrease compared to the diabetic group. The results of this study showed that the hydroalcoholic extract of Bistort root can have a beneficial effect on blood glucose concentration in streptozotocin induced diabetic mice, so it is expected to be effective in the treatment of diabetes.

Keywords: *Blood glucose, Diabetes mellitus, Mice, Polygonum bistorta L, Streptozotocin*

¹Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Paramedical Sciences, Ardakan University, Ardakan, Iran
(*corresponding author esalehi@ardakan.ac.ir)

² Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Paramedical Sciences, Ardakan University, Ardakan, Iran

تأثیر جنسیت، طول و وزن بر تغییرات کیفیت لاشه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

مجید محمدنژاد^{*}، رها فدایی راینی^۲

چکیده

مقدمه: ترکیب شیمیایی گوشت ماهی شامل آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. محتویات ترکیبات شیمیایی (پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر) در بدن آبزیان به نوع تغذیه، محیط زندگی، سن و جنسیت موجود زنده بستگی دارد. **روشها:** تحقیق حاضر با هدف بررسی ترکیب لاشه (پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر) در ماهیان قزل آلائی رنگین کمان با گروه‌های وزنی 50 ± 10 و 250 ± 10 گرم و گروه‌های طولی 12 ± 5 ، 22 ± 5 و 38 ± 5 سانتیمتر و جنسیت‌های مختلف انجام پذیرفت.

نتایج و بحث: مقایسه نتایج نشان دادند مقادیر پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه ماهیان در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) بطوریکه در ماهیانی که دارای بیشترین طول و وزن بودند، مقدار پروتئین و چربی در بالاترین مقدار قرار داشت و رابطه عکس بین خاکستر و رطوبت مشاهده گردید و بین گروه‌های 50 و 250 گرمی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج جنسیت‌های مختلف، نشان داد پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت لاشه ماهیان در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) بطوریکه در جنس نر بطور معنی‌داری بیشتر از جنس ماده بود. بر طبق نتایج، تأثیر طول، وزن و جنسیت بر ترکیبات لاشه، معنی‌دار بوده است و ماهیان 600 گرمی و طول متوسط 38 سانتیمتری کیفیت بهتری داشته‌اند. مقدار پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در جنس نر بطور معنی‌داری بیشتر از جنس ماده ماهی قزل آلائی رنگین کمان است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، رطوبت، چربی، خاکستر، ماهی قزل آلائی رنگین کمان

۱. دانشیار گروه شیلات، واحد بندرگز، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرگز، ایران، (نویسنده مسئول: majid_m_sh@bandargaziau.ac.ir)

۲. مربی گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

مقدمه

امروزه باتوجه به روند رو به رشد جمعیت جهان و نیاز انسان ها به دستیابی به منابع پروتئینی متنوع و سالم، آبري پروري می تواند به عنوان یکی از طرق تأمین پروتئين مورد نیاز نقش مهمی را ایفاء کند. از همین رو پیش بینی می شود در دو دهه آینده آبري پروري نقش بسزایی را در تأمین غذای بشر و کاهش فقر جهانی ایفاء کند (Sorvachev, 2017). قزل آلاي رنگين کمان (*Onchorhynchus mykiss*) از گونه های مهم پرورشی ایران محسوب می گردد و در حال حاضر در آب شیرین و لب شور پرورش داده می شود و در زمره ماهیانی است که بیشترین تولید را دارد (ستاری، ۱۳۸۶). ترکیب شیمیایی گوشت ماهی شامل آب، پروتئين، چربی، کربوهیدرات، ویتامین ها و مواد معدنی است و منبع غنی از انواع اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه است (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰). لیپیدها جزئی از ترکیب شیمیایی عضله هستند که بیشترین اختلاف را از نظر مقداری در بدن ماهی نشان می دهند. حتی در یک گونه خاص نیز ممکن است این اختلاف در فصول مختلف سال مشاهده شود که حداقل مقدار آن معمولاً هنگام تخم ریزی است. لیپیدها منابع انرژی متابولیک هستند (Gioacchini *et al.*, 2013). خاکستر تولید شده اغلب شامل موادی مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، منگنز، کلسیم، آهن، گوگرد، فسفر و کلر می باشد. میزان خاکستر، بیانگر میزان مواد معدنی ولی ضروری در بافت آلی است و شامل عناصری است که به میزان محدود در بدن آبريان وجود دارد (Javaheri Baboli & Velayatzadeh, 2013). مقدار آب در ماهی و دیگر فرآورده های دریایی بسیار زیاد بوده و حدود ۸۰ تا ۸۵ درصد وزن عضلات را تشکیل می دهد (میرزایی، ۱۳۸۸). پروتئين ها مهمترین جزء خوراکی عضله ماهی بوده و حدود ۲۵-۱۵ درصد مجموع وزن قسمت گوشتی را تشکیل می دهند. پروتئين های عضله را می توان بر اساس میزان حلالیت آنها در محلول های آبی به سه گروه اصلی سارکوپلاسما میک (محلول در آب)، میوفیبریل (محلول در محلول های نمکی) و استروما (غیر محلول در آب و محلول های نمکی) تقسیم نمود (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰). میزان پروتئين، چربی، کربوهیدرات و خاکستر در عضله آبريان در گونه های مختلف متفاوت است. مقادیر ترکیب شیمیایی در بدن آبريان به نوع تغذیه، محیط زندگی، سن و جنس موجود زنده بستگی دارد. بدون شک مهمترین دلیل تفاوت ترکیب شیمیایی میزان و نوع غذای دریافتی توسط موجود زنده است. همچنین روش اندازه گیری این ترکیبات نیز تاثیرگذار است (ولایت زاده، ۱۳۹۲؛ کوچکیان صبور و یاسمی، ۱۳۹۰) از طرفی دانستن میزان ترکیبات شیمیایی به انتخاب گونه مناسب برای تغذیه انسان و صنایع غذایی کمک می نماید (عسکری ساری و همکاران، ۱۳۹۰). مطالعات زیادی در رابطه با اثر عوامل محیطی و جیره غذایی (Solberg *et al.*, 2006)، دما، فصل و زیست شناختی (Cui & Wootton, 2015)، اندازه بدن و مراحل رسیدگی جنسی (Sorvachev, 2017) بر ترکیب شیمیایی بدن آبريان صورت گرفته است. در زمان وفور غذا، زمانی که گنادها غیر فعال است انرژی به شکل چربی و پروتئين در قسمت های مختلف بدن گونه های مختلف ذخیره می گردد. آنالیز تقریبی فیله ماهی قزل آلاي رنگين کمان در برخی گزارش های دیگر مقادیر متفاوتی را به خصوص در میزان چربی

خام نشان می دهد. (Coban, 2012; Oraei *et al.*, 2012) این تفاوت ها می تواند به عواملی نظیر تغذیه، فصل پرورش و صید، اندازه ماهی و شرایط محیط پرورش، مرتبط باشد (Oraei *et al.*, 2012). همچنین ثابت شده است که با افزایش وزن بدن محتوی چربی افزایش می یابد (Fauconneau *et al.*, 1995). از این رو به دلیل اهمیت غذایی و اقتصادی ماهی قزل آلا رنگین کمان و نیز اهمیت بررسی ترکیبات شیمیایی آن و با توجه به تغییرات این ترکیبات تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از جمله اندازه و جنس ماهی، در تحقیق حاضر به بررسی تاثیر جنسیت، طول و وزن بر تغییرات کیفیت لاشه (پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر) در این ماهی پرداخته شد.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر در قالب یک طرح تصادفی و در تابستان سال ۱۳۹۸ و در شهرستان گرگان، استان گلستان انجام پذیرفت. به منظور انجام این بررسی، تعداد ۱۰ عدد ماهی قزل آلا رنگین کمان از هر کدام از گروه های وزنی 50 ± 10 ، 250 ± 10 و 600 ± 10 گرم و گروه های طولی 12 ± 5 ، 22 ± 5 و 38 ± 5 سانتیمتر از یکی از مزارع پرورش ماهی قزل آلا رنگین کمان واقع در شهرستان علی آباد کتول تهیه گردید. به این صورت که ماهیان بصورت تصادفی توسط توری صیادی صید و در جعبه های یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافتند. پس از انتقال نمونه های ماهی به آزمایشگاه، تمام نمونه ها با آب کاملاً شستشو داده شد. طول کل و وزن کل ماهی توسط تخته بیومتری با دقت ۱ میلیمتری و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شدند. اندازه گیری ترکیبات تقریبی لاشه، عضله پشتی ماهیان به وسیله تیغه استیل استریلیزه جدا گردید. تعیین درصد رطوبت، بر اساس خشک نمودن ماده غذایی در اثر حرارت 103 ± 2 درجه سانتیگراد آن و به روش غیرمستقیم است. با استفاده از وزن نمونه خشک شده، درصد رطوبت نمونه، مطابق فرمول زیر محاسبه گردید (AOAC, 2005):

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(B - A) \times 100}{W}$$

A = وزن بوته و نمونه خشک، B = وزن بوته و نمونه تر، W = وزن نمونه تر

جهت تعیین درصد خاکستر، روش کار بر مبنای از بین بردن مواد آلی و باقیمانده مواد معدنی در دمای ۵۵۰-۵۰۰ درجه سانتیگراد انجام شد (AOAC, 2005):

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{(B - A) \times 100}{W}$$

W = وزن نمونه تر، B = وزن بوته و خاکستر، A = وزن بوته

اندازه گیری چربی از روش سوکسله و با استفاده از حلال صورت گرفت (AOAC, 2005). به این منظور از دستگاه سوکسله خودکار ساخت کشور سوئد استفاده گردید. اندازه گیری محتوی پروتئین موجود در نمونه های ماهی از روش کلدال و با استفاده از دستگاه کلدال ساخت کشور سوئد (Sweden Kjeltec Auto Analyser, 2300 Tecator) انجام گردید. در این روش در حضور اسید سولفوریک و کاتالیزور، نمونه ماهی هضم شد و سپس اتم نیتروژن به وسیله یک واسطه قلیایی ترکیبات آلی نیتروژن دار به سولفات آمونیم تبدیل و سپس در اسید کلریدریک یا اسید بوریک جذب شد و به وسیله تیتراسیون با یک اسید، درصد آن تعیین گردید. بنابراین تعیین درصد محتوی پروتئین در سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون انجام شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (AOAC, 2005).

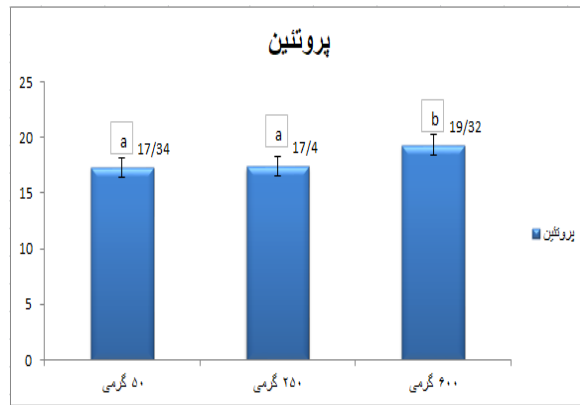
$$\text{درصد ازلت (نیتروژن)} = \frac{\text{نرمالیتة اسید} \times \text{میزان اسید مصرفی برای تیتراسیون} \times 1.4}{\text{وزن نمونه (گرم)}} = \frac{1.4 \times 100}{\text{وزن نمونه (گرم)}}$$

$$\text{درصد ازلت} \times 6.25 = \text{درصد پروتئین}$$

به منظور تعیین جنسیت، تعداد ۳ عدد ماهی ماده با میانگین وزن 172.0 ± 38 گرم و میانگین طول 48 ± 3 سانتیمتر و ماهیان نر با میانگین وزن 158.0 ± 40 گرم و میانگین طول 45 ± 2 سانتیمتر تهیه شدند. چنانچه جنسیت از روی ظاهر مشخص نبود، حفره شکمی ماهیان شکافته شد و نمونه گناد در زیر لوپ مشاهده و تعیین جنسیت گردید. در این تحقیق تجزیه و تحلیل داده ها به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و میانگین داده ها با آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan test) با یکدیگر مقایسه شدند که وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P=0.05$) تعیین گردید. در رسم شکل ها و جداول از نرم افزار Excel 2013 استفاده گردید.

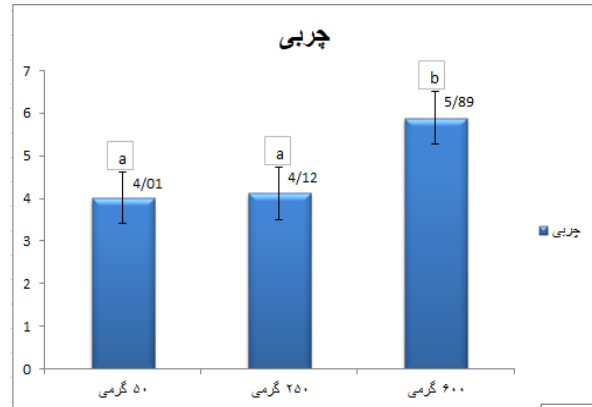
نتایج و بحث

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ترکیبات لاشه ماهی قزل آلا در گروه های وزنی مختلف، نشان داد که درصد محتوی پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه ماهیان در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری داشت ($P<0.05$) بطوریکه در گروه ۶۰۰ گرمی که بیشترین وزن را داشتند، بالاترین درصد محتوی پروتئین و چربی مشاهده گردید و بطور معنی داری بیشتر از مقادیر آنها در گروه های ۵۰ و ۲۵۰ گرمی بود ($P<0.05$) و رابطه عکس بین درصد خاکستر و رطوبت لاشه مشاهده گردید و بین گروه های ۵۰ و ۲۵۰ گرمی تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل های ۱ تا ۴).



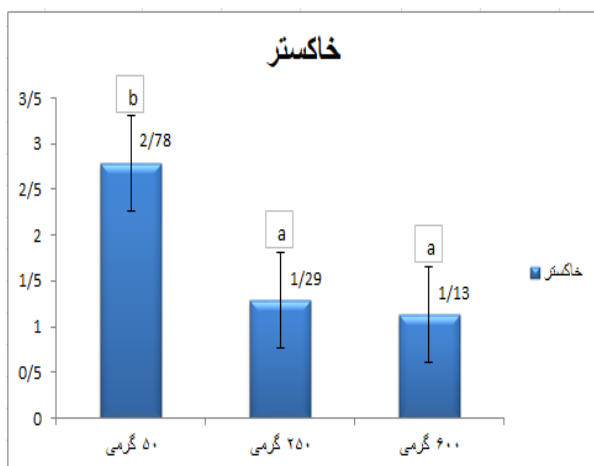
شکل ۲- تغییرات درصد پروتئین لاشه در گروههای وزنی مختلف

Figure 2. Changes in carcass protein percentage in different weight groups



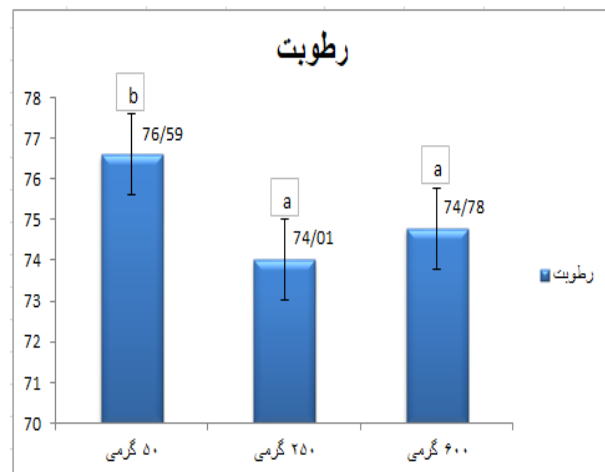
شکل ۱- تغییرات درصد چربی لاشه در گروههای وزنی مختلف

Figure 1. Changes in carcass fat percentage in different weight groups



شکل ۴- تغییرات درصد خاکستر لاشه در گروههای وزنی مختلف

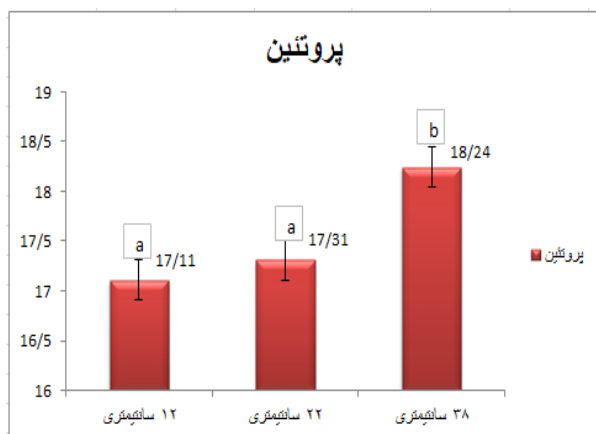
Figure 4. Changes in carcass ash percentage in different weight groups



شکل ۳- تغییرات درصد رطوبت لاشه در گروههای وزنی مختلف

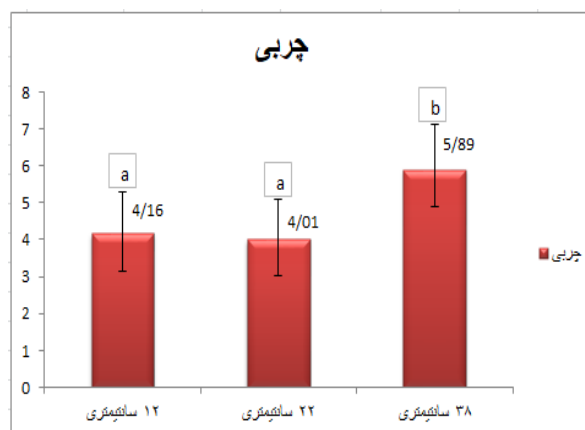
Figure 3. Changes in carcass moisture percentage in different weight groups

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ترکیبات لاشه ماهی قزل آلا در گروه های طولی مختلف نشان داد که درصد محتوی پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری داشت ($P<0.05$) بطوریکه در گروه ۳۸ سانتیمتری که بیشترین طول را داشتند، بالاترین درصد محتوی پروتئین و چربی مشاهده گردید و بطور معنی داری بیشتر از مقادیر آنها در گروه های ۱۲ و ۲۲ سانتیمتری بود ($P<0.05$) و رابطه عکس بین درصد چربی و رطوبت لاشه مشاهده گردید و بین گروه های ۲۲ و ۳۸ سانتیمتری تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل های ۵ تا ۸).



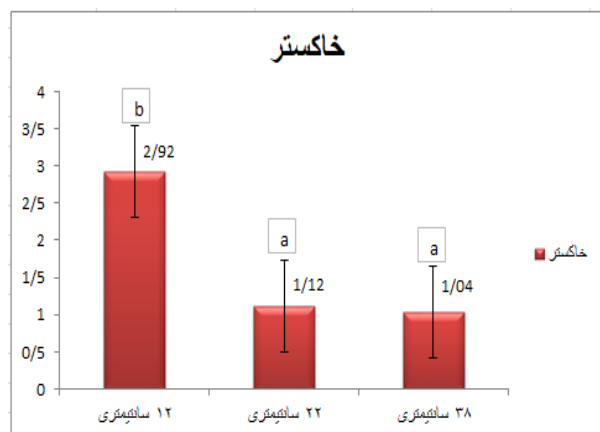
شکل ۶- تغییرات درصد پروتئین لاشه در گروه‌های طولی مختلف

Figure 6. Changes in carcass protein percentage in different length groups



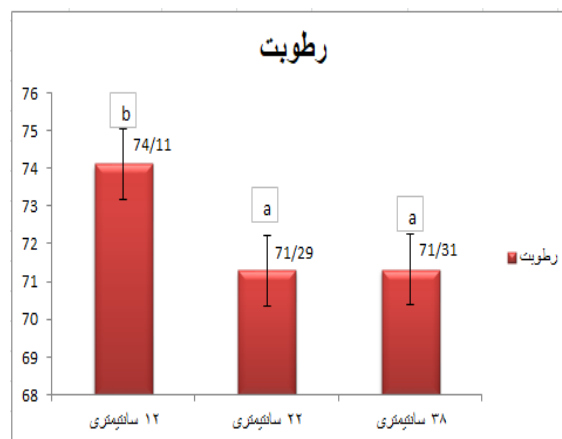
شکل ۵- تغییرات درصد چربی لاشه در گروه‌های طولی مختلف

Figure 5. Changes in carcass fat percentage in different length groups



شکل ۸- تغییرات درصد خاکستر لاشه در گروه‌های طولی مختلف

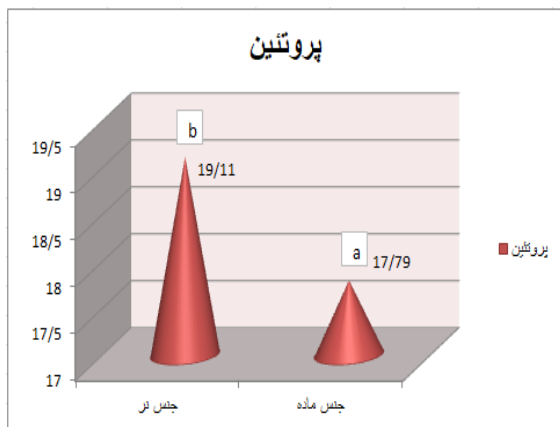
Figure 8. Changes in carcass ash percentage in different length groups



شکل ۷- تغییرات درصد رطوبت لاشه در گروه‌های طولی مختلف

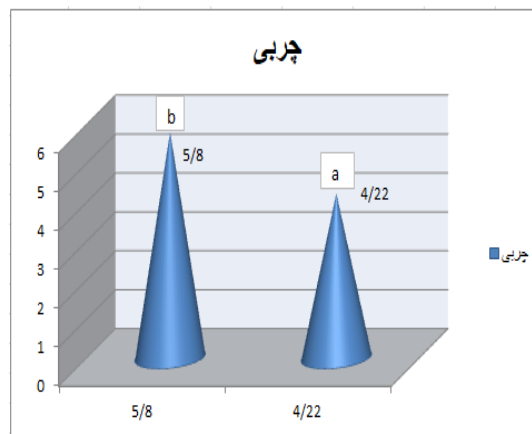
Figure 7. Changes in carcass moisture percentage in different length groups

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ترکیبات لاشه ماهی قزل آلا در جنس‌های نر و ماده نشان داد که درصد پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه ماهیان در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) بطوریکه در جنس نر بطور معنی‌داری بیشتر از جنس ماده بود (شکل‌های ۹ تا ۱۲).



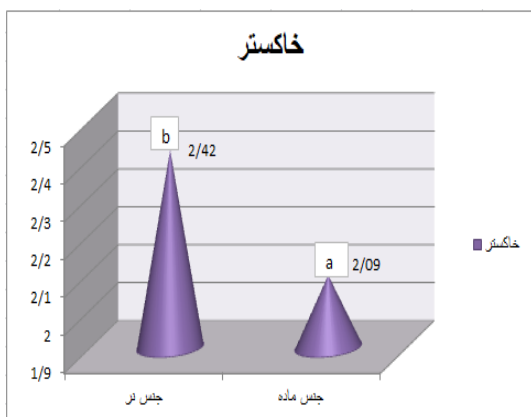
۱۰- تغییرات درصد پروتئین لاشه ماهیان در جنس نر و ماده

Figure 10. Changes in fish carcass protein percentage in males and females



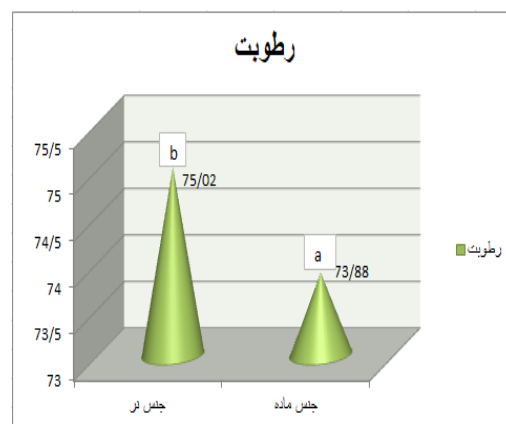
شکل ۹- تغییرات درصد چربی لاشه ماهیان در جنس نر و ماده

Figure 9. Changes in the percentage of fish carcass fat in males and females



شکل ۱۲- تغییرات درصد خاکستر لاشه ماهیان در جنس نر و ماده

Figure 12. Changes in the percentage of fish carcass ash in males and females



شکل ۱۱- تغییرات درصد رطوبت لاشه ماهیان در جنس نر و ماده

Figure 11. Changes in the percentage of fish carcass moisture in males and females

ترکیب شیمیایی بدن آبزیان و تغییرات آن با عوامل محیطی و روند بیولوژیکی در بسیاری از گونه ها مورد مطالعه قرار گرفته است. در خصوص مطالعات انجام شده در این زمینه، می توان به ماهی باربوس (*Barbus sp.*, Hernández-López et al., 2021)، ماهی خواجه (*Schizothorax zarodnyi*) و انجک (*Schizothorax altidorsalis*) در استان سیستان و بلوچستان (زکی پور رحیم آبادی و همکاران، ۱۳۸۸)، ماهی *Trachurus mediterraneus* در دریای مدیترانه (Tzikas et al., 2007) اشاره کرد؛ نتایج آنان نشان داد که اندازه ماهی، جنس، فصل و تأثیر متقابل آنها بر درصد آب، چربی، پروتئین و خاکستر عضله ماهی معنی دار بوده است. نتایج تحقیقات ذکر شده با نتایج تحقیق

حاضر همخوانی دارد به طوریکه نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد جنسیت، طول و وزن بر تغییرات ترکیبات شیمیایی ماهی قزل آلاي رنگين کمان تاثیر گذار بوده و باعث تغییرات آن می گردد. در خصوص تاثیر اندازه و طول ماهی بر ترکیب بیوشیمیایی، محققان مختلف نظرات متفاوتی را در مورد گونه های ماهیان بیان داشته اند. به عنوان مثال بررسی وزن های مختلف ماهی کپور پرورشی از وزن ۵۰۰ تا ۱۶۰۰ گرم نشان داد که افزایش اندازه و وزن بدن تغییری در ترکیبات شیمیایی بدن ماهی کپور ایجاد نمی کند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد (شیرمحمدلی و محمدنژاد، ۱۳۹۹). ضمن اینکه برخی دیگر عنوان کرده اند که با افزایش اندازه ماهی درصد محتوای چربی، پروتئین، خاکستر و انرژی ماهی افزایش می یابد که نتایج افزایش محتوای پروتئین و چربی با بررسی حاضر همخوانی دارد به طوریکه در ماهیان قزل آلاي رنگين کمان ۳۸ سانتیمتری که بیشترین طول را داشتند، بالاترین درصد محتوای پروتئین و چربی مشاهده گردید و بطور معنی داری بیشتر از مقادیر آنها در گروه های ۱۲ و ۲۲ سانتیمتری بود ($P < 0.05$) ولی درصد خاکستر بر عکس و کاهش بود. در ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) با افزایش طول ماهی، درصد محتوای پروتئین کاهش یافت اما درصد چربی افزایش پیدا کرد (شریفیان، ۱۳۹۳) که نتایج محتوای پروتئین با تحقیق جاری همخوانی نداشت. همچنین Shearer در سال ۲۰۱۲، طی بررسی و مطالعه روی ماهی قزل آلاي رنگين کمان، ذولفقاری و همکاران (۱۳۸۹) و Fajmonova و همکاران (۲۰۰۳) در ماهی کپور اعلام کردند که با افزایش اندازه، درصد چربی بدن افزایش و رطوبت آن کاهش می یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. بررسی Grigiraskis و همکاران (۲۰۰۲) بر روی ماهی شانک (*Sparus aurata*) و همچنین Rasmussen و همکاران (۲۰۰۶) در ماهی تن آلباکور (*Thunnus alalunga*) نیز نشان داد که بین اندازه ماهی و میزان چربی بدن آن رابطه معنی داری وجود ندارد که با نتایج تحقیق جاری همخوانی ندارد. درصد خاکستر لاشه نشان دهنده مواد غیر آلی لاشه است. ماهی ها بر خلاف پستانداران خشکی زی علاوه بر جذب مواد معدنی از طریق جیره غذایی قادر به جذب این مواد از طریق محیط های آبی نیز هستند. نیاز غذایی ماهی به مواد غیر آلی در انجام فرآیندهای طبیعی بدن اجتناب ناپذیر است. نقش اصلی این مواد عبارت اند از شکل گیری ساختار اسکلتی ماهی، انتقال الکترولیت، تنظیم اسیدیته مایعات بدن و تنظیم فشار اسمزی بدن ماهی (Lovell, 2013). از عوامل تاثیرگذار بر خاکستر می توان طول بدن (Ali et al., 2001)، جنسیت و سن ماهی (Alemu et al., 2013) و به طور کلی سیستم اسکلتی ماهی (Rohani et al., 2009) را نام برد. در تحقیق حاضر درصد خاکستر لاشه در ماهی قزل آلاي رنگين کمان با افزایش اندازه و طول ماهی کاهش پیدا کرد اما در ماهی بنی درصد خاکستر در طول های مختلف با افزایش طول تغییری پیدا نکرد (شریفیان، ۱۳۹۳) که نتایج محتوای پروتئین با تحقیق جاری همخوانی نداشت. همچنین درصد خاکستر در جنس نر بیشتر از جنس ماده بود.

بسیاری از مطالعات انجام شده روی گونه های مختلف ماهیان مانند اردک ماهی (Salam & Davies, 2009)، ماهی قزل آلاي رنگين کمان (Shearer, 2012) و ۶۰ گونه ماهی دیگر (Ramseyer, 2002) نشان دهنده وجود رابطه رگرسیونی خطی مثبت بین اندازه و محتوای پروتئین بدن بود که با تحقیق جاری مطابقت دارد و در برخی گونه ها مانند ماهی تیلاپیا (Fajmonova et al., 2003) رابطه رگرسیونی خطی منفی گزارش شده است؛ اما این رابطه برای همه ماهیان عمومیت ندارد و حتی در یک گونه ماهی ممکن است با توجه به شرایط محیطی تغییر کند. بنابراین باید توجه داشت که این روابط با توجه به منطقه مورد مطالعه و فصل متغیر خواهد بود (ذولفقاری و همکاران، ۱۳۸۹). در

بررسی ۱۸۷ گونه ماهی در دریای مدیترانه مشاهده شد که با افزایش محتوای چربی، پروتئین و انرژی فیله، درصد رطوبت کاهش می یابد (Yeannes & Almandos, 2003) که با نتایج تحقیق جاری همسو است. مطالعه Zaboukas و همکاران (۲۰۰۶) بر نوعی ماهی تون (*Sarda sarda*)، ذولفقاری و همکاران (۱۳۸۹) بر روی ماهی کپور و (Shearer, 2012) بر روی ماهی قزل الای رنگین کمان نتایج مشابهی بیان گردید. طبق تحقیقات انجام شده (Love, 2007) بر روی ماهیان مختلف مشخص نموده اند که ارتباط معکوسی بین درصد محتوای آب در عضله با درصد چربی در ماهیان چرب همانند ماهیان هرینگ و درصد پروتئین در ماهیان کم چربی همچون ماهی کاد وجود دارد که در مطالعه جاری نیز مشخص است. همچنین بیان کردند که اندازه گیری درصد محتوای آب عضله در ماهی کاد می تواند شاخص خوبی برای تغییرات محتوی پروتئینی در این ماهی باشد (Love, 2007).

یکی دیگر از عوامل تاثیر گذار بر ترکیبات لاشه، جنسیت ماهیان است. درصد ترکیبات گوشت ماهی بسته به نوع غذای مصرفی و در جریان مهاجرت های سالیانه و همچنین تغییرات جنسی مرتبط با تولیدمثل، دچار تغییراتی می گردد. در این تحقیق نیز بررسی ترکیبات لاشه در دو جنس نر و ماده قزل آلائی رنگین کمان نشان داد که این ترکیبات در دو جنس نر و ماده متفاوت است. محتوی پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت لاشه بطور معنی داری بیشتر از جنس ماده بود که با نتایج بررسی نوروزی و باقری توانا (۱۳۹۵) مطابقت دارد. بطوریکه نتایج بررسی آنها بر ترکیبات بیوشیمیایی در جنس نر و ماده ماهیان کفال طلایی نشان داد که ماهیان نر محتوی چربی، پروتئین، خاکستر و انرژی فیله بیشتری نسبت به ماهیان ماده دارند؛ اما درصد رطوبت فیله ماهیان ماده بیشتر از ماهیان نر بود که با تحقیق جاری مطابقت نداشت. همچنین مطالعات (Komova, 2001) نشان می دهد که ذخیره چربی عضله ماهیان نر کمی بالاتر از ماهیان ماده است که دلیل این امر را می توان به بالا بودن متابولیسم تولید مثلی ماده ها نسبت به نرها و متابولیسم انرژی بالای نرها نسبت به ماده ها به جهت فعالیت بالای آنها ارتباط داد. ماده ها در طول رسیدگی جنسی قسمتی از ذخیره غذایی (چربی و پروتئین) را برای تشکیل تولیدات جنسی و نیاز انرژی مصرف می کنند. که به نظر می رسد علت افزایش میزان چربی لاشه ماهی قزل الای رنگین کمان نر همین امر باشد. Eliassen و Vahl (۱۹۸۲) در بررسی تغییرات فصلی سایز گناد، پروتئین و آب عضله در ماهی کاد دریافتند که با افزایش میزان آب عضله، محتوی پروتئین کاهش می یابد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. Grigirakis و همکاران (۲۰۰۲) نیز در مطالعه روی تغییر محتوی پروتئین ماهیان پرورشی و وحشی سی بریم (*Sparus aurata*) اعلام کردند پروتئین ترکیب ثابتی در بدن ماهی دارد که محتوی آن وابستگی زیادی به وزن ماهی دارد و بعد از رسیدن ماهی به یک سایز معین این محتوی ثابت باقی می ماند که در تحقیق جاری نیز محتوی پروتئین در وزن های مختلف مقدار ثابتی بود. مطالعات صورت پذیرفته توسط Komova (۲۰۰۱) نیز اختلاف معنی داری را در محتوی پروتئین عضله طی مراحل رسیدگی جنسی نشان نداد ولی روند کاهشی مشاهده شده را به مصرف احتمالی قسمتی از پروتئین در سیکل رسیدگی جنسی نسبت داد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد. Sorvachev, در سال ۲۰۱۷، دینامیک عملکرد پروتئین در طی تخم ریزی را مطالعه و دریافت که محتوی پروتئین به جهت کاهش البومین (پروتئین محلول در آب) کاهش میابد و علت این امر را به مصرف احتمالی قسمتی از پروتئین عضله در تولید انرژی و کامل شدن رسیدگی تولیدات جنسی در جنس ماده نسبت داد که با تحقیق جاری همخوانی داشت.

نتيجه گيري کلي

در جمع بندي نهايي مي توان اينگونه بيان کرد که ترکيبات بيوشيميائي بدن ماهي قزل آلاي رنگين کمان تحت تأثير طول، وزن و جنسيت آنها قرار دارند. در ماهي قزل آلاي رنگين کمان در طي دوره رشد و با افزايش وزن و طول بدن درصد محتوي پروتئين و چربي آن افزايش و درصد خاکستر و رطوبت لاشه آن کاهش مي يابد. بر اساس نتايج اين تحقيق کيفيت لاشه ماهيان ۶۰۰ گرمي قزل آلاي رنگين کمان بهتر از اندازه هاي کوچکتر آن است. همچنين نتايج اين بررسي نشان داد که درصد محتوي پروتئين، چربي، خاکستر و رطوبت در جنس نر بطور معني داري بيشتر از جنس ماده است که دليل اين امر را مي توان به بالا بودن متابوليسم توليد مثلي ماده ها نسبت به نرها و متابوليسم انرژي بالاي نرها نسبت به ماده ها به جهت فعاليت بالاي آنها ارتباط داد.

منابع

- ذوالفقاري، م. شعبانپور، ب. شعباني، ع. و قرباني، ر. (۱۳۸۹). رابطه بيوشيميائي و بازدهي فيله با اندازه ماهي کپور دريائي خزر (*Cyprinus carpio*). نشر يه شيلات، مجله منابع طبيعي ايران، ۲: ۸۴-۷۱.
- رضوي شيرازي، ح. (۱۳۸۰). تکنولوژي فرآورده هاي دريائي. (علم فراوري جلد دوم)، انتشارات نقش مهر، چاپ اول، تهران، ۲۹۲ ص.
- زکي پور رحيم آبادي، ا. ارشدي، ع. زارع، پ. و حيدري، م. (۱۳۸۸). بررسي مقايسه اي ترکيبات شيميائي عضله ماهي خواجه (*Schizothorax zarodny*) و انجک (*Schizothorax altidorsalis*) در فصول و جنس هاي مختلف در استان سيستان و بلوچستان. مجله علمي شيلات ايران، ۳: ۷-۱.
- ستاري، م. (۱۳۸۶). ماهي شناسي ۲ (سيستماتيک). انتشارات حق شناس، ۱۷۸-۱۸۸.
- شريفيان، م. (۱۳۹۳). بررسي ترکيبات بدن ماهي بني (*Barbus sharpeyi*) در محدوده گروه هاي طولي مختلف در منابع آبي استان خوزستان. نشر يه توسعه آبي پروري، ۸(۳): ۷۶-۶۵.
- شيرمحمدي، ح.م. و محمدنژاد، م. (۱۳۹۹). تأثير وزن بر تغييرات پروتئين، چربي، خاکستر و ماده خشک گوشت ماهي کپور معمولي. مجله علوم و فنون شيلات، ۹(۱): ۱۲۰-۱۲۹.
- عسکري ساري، ا. و ولايت زاده، م. (۱۳۹۰). اندازه گيري و مقايسه ترکيب شيميائي ماهيچه دو گونه ميگوي پاسفيد غربي (*Litopenaeus vannamei*) و ميگوي سفيد هندي (*Penaeus indicus*) پرورشي ايران. مجله دامپزشکي و آزمايشگاه، ۳(۲): ۱۲۴-۱۱۷.

کوچکیان صبور، ا. و یاسمی، م. (۱۳۹۰). فناوری تولید فرآورده های شیلاتی. انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی. چاپ اول، ۵۹۵ ص.

میرزایی، ح. (۱۳۸۸). روشهای آزمون شیمیایی مواد غذایی. انتشارات علم کشاورزی. چاپ اول. تهران، ۸۴ ص.

نوروزی، م. و باقری توانا، م. (۱۳۹۵). تعیین ترکیبات بیوشیمیایی و ارتباط آن با برخی شاخصهای زیستی و فیزیولوژی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) در دریای خزر. مجله علمی-پژوهشی زیست شناسی دریا. ۸(۳۱): ۴۵-۶۰.

ولایت زاده، م. (۱۳۹۲). بررسی میزان پروتئین، چربی، کربوهیدرات، فیبر، خاکستر و رطوبت در عضله میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) استان هرمزگان. دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

۶۹

Alemu, L.A., Melese, A.Y. and Gulelat, D.H. (2013). Effect of endogenous factors on proximate composition of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) fillet from Lake Zeway. American Journal of Research Communication, 1(11): 405-410.

Hernández-López, C., Calderón-Robles, R., Villa-Godoy, A., Iván Román-Ponce, S., González-Padilla, E. (2021). Relationships between seasonality, body characteristics and leptin at the beginning of puberty in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* heifers in the Mexican tropics. 1025 <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5796>

Ali, M., Salam, A. and Iqbal, F. (2001). Effect of environmental variables on body composition parameters of *Channa punctata*. Journal of Research (science), 12:86-96.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists International), (2005). Official methods of analysis. 18th ed. Maryland: AOAC INTERNATIONAL.

Coban, O.E. (2012). Evaluation of essential oils as a glazing material for frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. Journal of Food Processing and Preservation, 37(5):759-765.

Cui, Y. and Wootton, R. J. (2015). Effects of ration, temperature and body size on the body composition, energy content and condition of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.), Journal of Fish Biology, 32 (5): 749-764.

Eliassen, J. E. and Vahl, O. (1982). Seasonal variations in the gonad size and the protein and water content of cod, *Gadus morhua* (L.), muscle from Northern Norway, Fish biology, 20(5): 509- 527.

Fajmonova, E., Zelenka, J., Komprda, T., Kladroba, D. and Sarmanova, I. (2003). Effect of sex, growth intensity and heat treatment on fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio*) fillets. Czech Journal of Animal Sciences, 2:85-92.

Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J. and Vallot, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. Aquaculture, 129(1):265-297.

Gioacchini, G., Dalla Valle, L., Benato, F., Fimia, G.M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Borini, A. and Carnevali, O. (2013). Interplay between autophagy and apoptosis in the development of *Danio rerio* follicles and the effects of a probiotic. Reproduction, Fertility and Development, 25: 1115-1125.

- Grigiraskis, K., Alexis, M.N., Talor, K.D.A. and Hole, M. (2002). Comparison of wild cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): composition, appearance seasonal variations. *Journal of Food Science and Technology*, 37: 77-484.
- Javaheri Baboli, M. and Velayatzadeh, M. (2013). Determination of heavy metals and trace elements in the muscles of marine shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* from Persian Gulf, Iran. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23 (3): 786-791.
- Komova, N.I. (2001). Dynamics of the biochemical composition of tissue in (*Abramis brama*) (Cyprinidae) at gonad maturation. *Journal of Ichthyology*, 41(4): 334-342.
- Love, R.M. (2007). *The chemical biology of fishes*, London, UK, pp. 299.
- Lovell, R.T. (2013). *Nutrition and feeding of fish*, Van Nostrand Reinhold, New York, 267.
- Oraei, M., Motallebi, A., Hoseini, E. and Javan, S. (2012). Effect of gamma irradiation and frozen storage on chemical and sensory characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Journal of Food Science and Technology*, 47:977-984.
- Ramseyer, L. (2002). Predicting whole-fish nitrogen content from fish wet weight using regression analysis. *North American journal of Aquaculture*, 64:190-204.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T. and Carroll, S. (2006). Effect of seasonality, location, size on lipid content in North Pacific Troll-Caught Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 15: 73-86.
- Rohani, A.C., Normah, O., Zahrah, T., Utama, C.C. and Saadiah, I. (2009). Quality of fish fillet from pond-raised red tilapia and its utilization in the development of value-added product. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 37(2):153-161.
- Salam, A. and Davies, P.M.C. (2009). Body composition of northern pike (*Esox Lucius* L) in relation to body size and condition factor. *Journal of Fisheries Research (Amsterdam)*, 19: 193-204.
- Shearer, K.D. (2012). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on Salmonids. *Aquaculture*, 119: 63-88.
- Sorvachev, K.F. (2017). Changes in Protein of Blood Serum of Car during Wintering. *Biochemistry*, 22: 872-877.
- Tzikas, Z., Amvrosiadis, I., Soultos, N. and Georgakis, S.P. (2007). Seasonal variation in chemical composition of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) muscle from North Aegean Sea (Greece). *Food Control*, 18: 251-257.
- Yeannes, M.I. and Almandos, M.E., (2003). Estimation of fish proximate composition starting from water content. *Journal Food Composition and Analysis*, 16: 81-92.
- Zaboukas, N., Miliou, H., Megalofonou, P. and Moraitou-Apostoloulou, M. (2006). Biochemical composition of the Atlantic bonito *Sarda sarda* from the Aegean Sea (Eastern Mediterranean Sea) in different stages of sexual maturity. *Journal of Fish Biology*, 69: 347-362.

Effect of sex, length, and weight on carcass quality changes in *Onchorhynchus mykiss*

M. Mohammad Nejad*, R. Fadaee Raieni[†]

Received:2020.2.23

Accepted:2020.10.31

Abstract

The contents of chemical composition (protein, fat, moisture, and ash) in the body of aquatic animals **depend** on the type of nutrition, living environment, age, and sex of the living organism. The aim of this study was to investigate the carcass composition percent (protein, fat, moisture and ash) in rainbow trout with different **weights** (50 ± 10 g, 250 ± 10 g, and 600 ± 10 g), length (12 ± 5 cm, 22 ± 5 and 38 ± 5 cm) and genders. The results of comparing the weight and length groups showed that the percent of protein, fat, moisture and ash of fish carcasses were significantly different between the groups ($P < 0.05$), the fish with the highest length and weight, showed the highest protein and fat contents ($P < 0.05$), the inverse relationship between the ash and moisture contents were observed, there **was** no significant difference between the 50 and 250 g groups ($P > 0.05$). The results of different genders showed that the content percent of protein, fat, ash and carcass moisture of fish were significantly different between the groups ($P < 0.05$), so in male fish, it was significantly higher than **infemales**. The results of the present study showed that in rainbow trout, the effect of length, weight and gender on carcass composition has a significant meaning, and fish with 600 g with an average length of 38 cm had better quality. Also, the contents of protein, fat, ash and moisture in males are significantly higher than **in** females in rainbow trout.

Keywords: *Ash, Fat, Moisture, Protein, Rainbow trout*

¹Department of Fishery, Bandar Gaz Branch, Islamic Azad University, Bandar Gaz, Iran. P. O. Box: 48715-119. (*Corresponding author: majid_m_sh@bandargaziau.ac.ir)

²Department of Fisheries Science and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

اثر چهار هفته ورزش و مکمل دهی اولئوروپین بر رفتارهای اضطراب و افسردگی در مدل حیوانی بیماری پارکینسون

معصومه مکوندی چشمه چنار^۱، عبدالحسن دولاح^{۲*}، مریم رفیعی راد^۳

چکیده

مقدمه: بیماری پارکینسون، تحلیل نورون های دوپامینی در ساختمان متراکم جسم سیاه و دیگر نواحی ساقه مغز است. اضطراب و افسردگی در پارکینسون شایع است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ماده اولئوروپین و ورزش بر اضطراب و افسردگی در مدل حیوانی بیماری پارکینسون انجام شد. در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی به پنج گروه کنترل، پارکینسونی (۶-هیدروکسی دوپامین به ناحیه جسم مخطط به صورت یک طرفه)، ورزش (پنج جلسه در هفته و هر جلسه ۳۰ دقیقه)، دریافت کننده اولئوروپین به مدت ۴ هفته (روزانه ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و توام تمرین شنا و اولئوروپین تقسیم شدند. برای ارزیابی اضطراب از تست ماز به علاوه‌ای شکل مرتفع و برای سنجش افسردگی از تست جعبه باز انجام گرفت. از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی جهت تعیین تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. نتایج نشان دادند که مصرف اولئوروپین همراه با ورزش، مدت زمان حضور حیوان مدل پارکینسونی را در بازوهای باز ماز بعلاوه‌ای، به طور معنی داری افزایش می دهد ($P < 0.05$). همچنین، مصرف اولئوروپین همراه با ورزش در تست جعبه باز، تعداد عبور حیوان از مربع مرکزی، به طور معنی داری افزایش و تعداد عبور از مربع‌های حاشیه و تعداد بالا بردن دست ها، به طور معنی داری کاهش می دهد ($P < 0.05$). نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ورزش توام با مصرف اولئوروپین می تواند با تاثیر آنتی اکسیدانی خود سبب بهبود رفتارهای اضطرابی و افسردگی در رت های پارکینسونی شود.

واژه های کلیدی: اضطراب، افسردگی، اولئوروپین، پارکینسون، ورزش.

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران (* نویسنده مسئول: h_doulah@yahoo.com)

مقدمه

بیماری پارکینسون، دومین بیماری تحلیل نوروئی پس از آلزایمر و شایع ترین علت زوال عقل پیری است (Nagatsu, 2002). اختلالات حرکتی ناشی از بیماری پارکینسون مربوط به آسیب های وارده به بخش متراکم هسته سیاه بوده که معمولاً به صورت ماکروسکوپی قابل مشاهده است (Mahmoudi et al., 2018). مطالعات نشان می دهند که تظاهرات ابتدایی بیماری پارکینسون خارج از سیستم عصبی مرکزی اتفاق می افتد و از جمله ی این تظاهرات غیر حرکتی می توان به اختلال رفتار خواب، اختلالات اضطرابی و افسردگی اشاره کرد (Savica et al., 2010). گزارشات متناقضی در رابطه با شیوع اختلالات خلقی در بیماران پارکینسونی وجود دارد. شیوع افسردگی در بیماران پارکینسونی ۲ تا ۷۶ درصد گزارش شده است (Farzin et al., 2005). تخریب نورون های دوپامینرژیک در ناحیه نیکرواستریاتال و کاهش سطح دوپامین با توسعه رفتارهای خلقی در ارتباط است (Happe et al., 2001). اضطراب پاتولوژیک نیز شایع ترین اختلالات روحی و روانی است که باعث اختلال در زندگی بیمار و رنج او می شود (Sonei et al., 2018). اضطراب عبارتست از یک احساس ناراحت کننده و مبهم، ترس، وحشت یا خطر با منشأ ناشناخته که بر فرد مستولی می گردد و با علائمی نظیر فشردگی قفسه سینه، تنگی نفس، تپش قلب، تعریق، سرگیجه، آشفتگی روانی، اشکال در تمرکز حواس و در سطوح کمتر، مشکل در حافظه همراه است (Degroot et al., 2001). مطالعات، نقش انتقال دهنده های عصبی مختلفی را در پدیده اضطراب نشان، داده است؛ اما سیستم گابارژیک و گیرنده گابا A از مهمترین سیستم های مسؤول در اضطراب به شمار می روند (Bueno et al., 2005). همچنین استرس اکسیداتیو یکی از دلایل اصلی تحلیل نورون های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون است که این بیماری با بروز رفتارهای شبه اضطرابی همراه است (Dissanayaka et al., 2010; Dexter & Jenner, 2013). یکی دیگر از مشکلات جوامع بشری افسردگی است. افسردگی یکی از مهم ترین اختلالات روانپزشکی است که بطور کلی ۲۵-۱۰ درصد زنان و ۱۰-۵ درصد مردان در برهه ای از زندگی به آن مبتلا می شوند (Bourin et al., 2009). مطالعات متعددی گزارش نمودند که مصرف مواد غذایی گیاهی و یا مکمل های غنی از پلی فنل احتمالاً موجب تأخیر در شروع و پیشرفت بیماری هایی از قبیل آلزایمر، پارکینسون و اختلالات عصبی مرتبط با آن ها می شود (Vauzour et al., 2010). در میان آنتی اکسیدان های طبیعی، اولئوروپین یکی از انواع پلی فنل ها است که به مقدار فراوان در برگ زیتون وجود دارد. این ترکیب با پیشگیری از اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، از بیماری های قلبی و عروقی جلوگیری می کند و با گشاد نمودن رگ ها در بهبود بیماری تصلب شرائین مؤثر است. دارای خواص ضد آریتمی قلبی است، متابولیسم لیپیدی را بهبود بخشیده، از تخریب آنزیمی جلوگیری نموده و دارای خواص ضد التهابی است (Lockyer et al., 2015). اولئوروپین ترکیب بیواکتیو اصلی در برگ و میوه فراوری نشده ی زیتون است که دارای اثرات فارماکولوژیکی سودمندی از جمله خصوصیات آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و نوروپروتکتیو می باشد (Omar, 2010). تمرین ورزشی، زنده ماندن سلول های عصبی را افزایش می دهد و برقراری عملکردهای مغز را بعد از آسیب تسهیل می کند (Ji, 1993). شواهد نشان می دهد که ورزش سیستم دوپامینرژیک مغز را فعال کرده، دوپامین

موجود در جسم مخطط را افزایش می‌دهد. این یافته‌ها وجود این احتمال را افزایش می‌دهد که ورزش باعث کاهش آسیب پذیری نورون‌های دوپامینرژیک نسبت به ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود (Yoon et al., 2007). با توجه به شیوع نسبتاً زیاد اختلال اضطراب و افسردگی در ایران و عوارض داروهای مورد استفاده در این بیماران، دستیابی به روش‌های درمانی کم‌عارضه‌تر و موثرتر بسیاری ضروری است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر چهار هفته ورزش و مکمل دهی اولئوروپین بر رفتارهای اضطراب و افسردگی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در موش‌های صحرایی نر بالغ بود.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوانات: در این مطالعه تجربی، از ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم)، تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز استفاده گردید. مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، با رعایت اصول اخلاق پژوهشی کار با حیوانات با مجوز شماره ۱۰۶۲۱۴۲۳۹۶۲۰۲۶ در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز ثبت گردیده است.

موش‌ها در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه و با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی، درون قفس‌های انفرادی نگهداری شدند و به صورت تصادفی به پنج گروه (هر گروه ۸ سر موش) به شرح زیر تقسیم شدند: شامل: ۱- گروه کنترل (گروه دست نخورده)؛ ۲- گروه پارکینسونی؛ ۳- گروه پارکینسونی با مصرف اولئوروپین؛ ۴- گروه پارکینسونی تیمار شده با ورزش؛ ۵- گروه پارکینسونی تیمار شده با ورزش و مصرف اولئوروپین.

گروه‌های ورزش و ورزش همراه با مصرف اولئوروپین به مدت ۴ هفته (پنج جلسه در هفته و هر جلسه ۳۰ دقیقه) در داخل وان شنا (ویژه شنای اجباری موش‌های صحرایی) شنا کردند (Jafari et al., 2020). و گروه‌های مصرف اولئوروپین و ورزش همراه با مصرف اولئوروپین، اولئوروپین را به مدت ۴ هفته (روزانه ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی دریافت کردند (Pourkhodad et al., 2016).

ایجاد مدل حیوانی پارکینسون:

ابتدا حیوانات وزن شدند، سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید (دوز ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند (Jafari et al., 2020). در ادامه، موش‌ها در دستگاه استریوتکس قرار گرفتند و به وسیله قطعه دهانی و میله‌های داخل گوشی بر روی دستگاه ثابت مانده

و موهای ناحیه پشتی جمجمه آنها تراشیده شد، سپس به وسیله پنبه الکلی، پوست سر حیوان ضد عفونی و یک برش طولی از میان سطح پشتی سر بین دو چشم تا فاصله نقطه سطح پشتی میانی گوش ها ایجاد گردید. بافت های پیوندی روی سطح جمجمه زدوده شدند و نقطه برگما نمایان گردید. نقطه برگما و لامبدا در یک سطح برابر قرار گرفتند و نشانگر دستگاه بر روی آنها تنظیم گردید، سپس با توجه به مختصات استخراج شده از اطلس جراحی مغز، مختصات MFB (قدامی خلفی= $4/6$ ، میانی جانبی= $1/6$ و پشتی شکمی= $8/2$ - میلی متر) مشخص گردید (Jafari et al., 2020). در این مطالعه برای ایجاد مدل حیوانی بیماری پارکینسون، از تزریق یک طرفه ۶- هیدروکسی دوپامین در دسته قدامی- میانی^۱ مغز استفاده شد و ۶- هیدروکسی دوپامین (شرکت سیگما امریکا) نیز با غلظت ۸ میکروگرم در ۲ میکرولیتر نرمال سالین (دارای ۰/۰۱ درصد اسید اسکوربیک) تهیه گردید (Jafari et al., 2020). آپومورفین (شرکت سیگما، ساخت امریکا) در نرمال سالین ۰/۰۱ درصد اسید اسکوربیک حل شد. این دارو با توجه به وزن حیوان با دوز ۰/۰۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی تزریق شد (آپومورفین برای تأیید پارکینسونی شدن حیوانات مورد استفاده قرار می گیرد)، ۱۰-۵ دقیقه پس از تزریق آپومورفین، به مدت ۱۵ دقیقه تعداد چرخش های حیوان در سمت آسیب ندیده شمارش و ثبت گردید (Jafari et al., 2020).

تست ماز به علاوه ای شکل مرتفع^۲

در این مطالعه از تست ماز به علاوه ای شکل مرتفع برای بررسی رفتارهای اضطرابی استفاده می شود. دستگاه مورد استفاده یک ماز چوبی به شکل بعلاوه است. این ماز دارای دو بازوی باز بدون دیواره و دو بازوی بسته با دیواره ای به ارتفاع ۳۰ سانتی متر است. طول و عرض بازوی باز به ترتیب ۵۰ و ۱۰ سانتی متر است که به صورت عمود به بازوهای بسته به ابعاد ۱۰ سانتی متر مربع در ناحیه مرکز، متصل می باشند. این مجموعه بر روی پایه ای به ارتفاع ۵۰ سانتی متر از سطح زمین قرار دارد. لامپ کم نوری در اتاق تست به عنوان منبع روشنایی در طول آزمایش وجود دارد. قبل از شروع آزمایش، موش ها به مدت ۵ دقیقه در اتاقی که دستگاه در آن است، قرار گرفتند تا با محیط آشنا شوند. حیوانات در قسمت مرکز دستگاه و رو به بازوی باز قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه اجازه داشتند تا در بازوهای باز و بسته حرکت کنند درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز^۳ (OAT درصد) و درصد ورود به بازوی باز^۴ (OAE درصد) به عنوان فاکتورهای استاندارد ارزیابی اضطراب به این شکل محاسبه شدند:

-
1. Metropolitan Fire Brigade (MFB)
 1. Elevated plus-maze (EPM)
 2. Open Arm Times=OAT%
 3. Open Arm Entries=%OAE

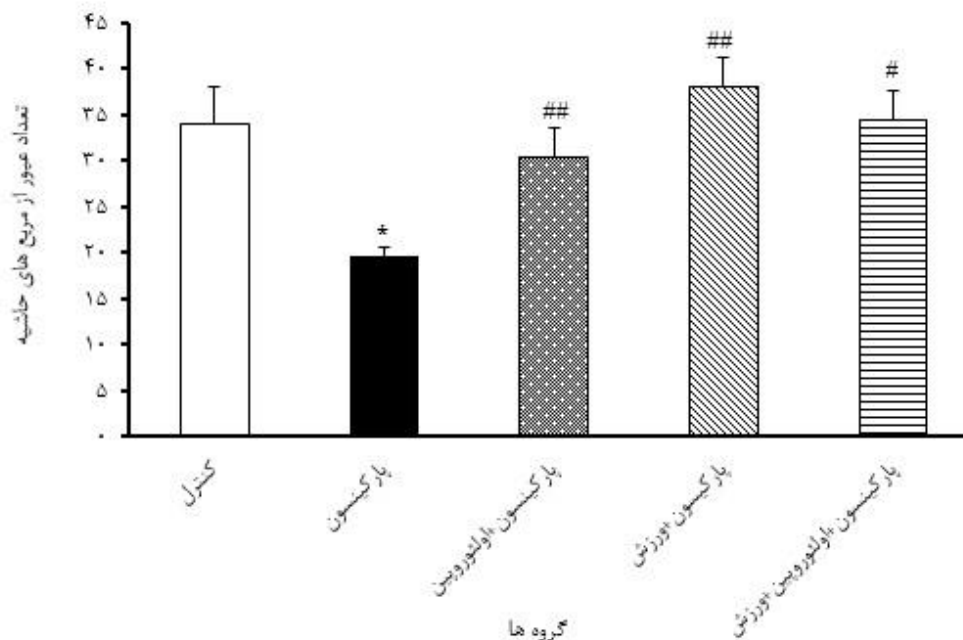
(OAT درصد) زمان ورود به بازوی باز تقسیم بر زمان ورود به کل بازوها ۱۰۰، (OAE درصد) دفعات ورود به بازوها به عنوان فاکتور فعالیت حرکتی در نظر گرفته شد (Rafieirad & Abbaszadeh, 2017). هرچه مدت زمان صرف شده در بازوی باز و تعداد دفعات ورود به آن کمتر باشد، رفتار شبه اضطرابی در آن بیشتر است.

تست جعبه باز^۱

تستی برای ارزیابی افسردگی است. تجهیزات این آزمایش شامل یک صفحه چهارگوش ساخته شده (به ابعاد ۷۲*۷۲ سانتی متر و ارتفاع ۳۶ سانتی متر) و کف آن با خطوطی به ۱۶ مربع (۱۸*۱۸ سانتی متر) تقسیم شده است. در ابتدا هر موش در مرکز صفحه قرار داده شد و فعالیت آن برای ۵ دقیقه ثبت شد و پارامترهای رفتاری شامل: تعداد عبور از مربع مرکزی، تعداد عبور از مربع‌های حاشیه، تست تعداد بالا بردن دست‌ها ثبت و مورد استفاده قرار گرفت (Rafieirad & Abbaszadeh, 2017).
محاسبات آماری: داده‌های این تحقیق به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند. همچنین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS، Excel، آزمون واریانس یک‌طرفه و تست پشتیبان توکی (در هر گروه $n=8$) آنالیز شدند. سطح معنی‌داری، $p<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه، تعداد عبور از مربع حاشیه‌ای، عبور از مربع مرکزی، تعداد دفع (اضطراب) و تعداد بالا بردن دست در تست جعبه باز و همچنین درصد مدت سپری شده در بازوی باز ماز به علاوه ای مرتفع موش‌های صحرایی در گروه‌های پنجگانه تحقیق در نمودار شماره ۱ الی ۵ ارائه شده است.



شکل ۱- تاثیر چهار هفته تجویز خوراکی اولئوروپین و ورزش بر تعداد عبور از مربع حاشیه‌ای در تست جعبه باز در مدل حیوانی بیماری پارکینسون. نمودار بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک طرفه^۱ و تست تکمیلی توکی (در هر گروه $n=8$).

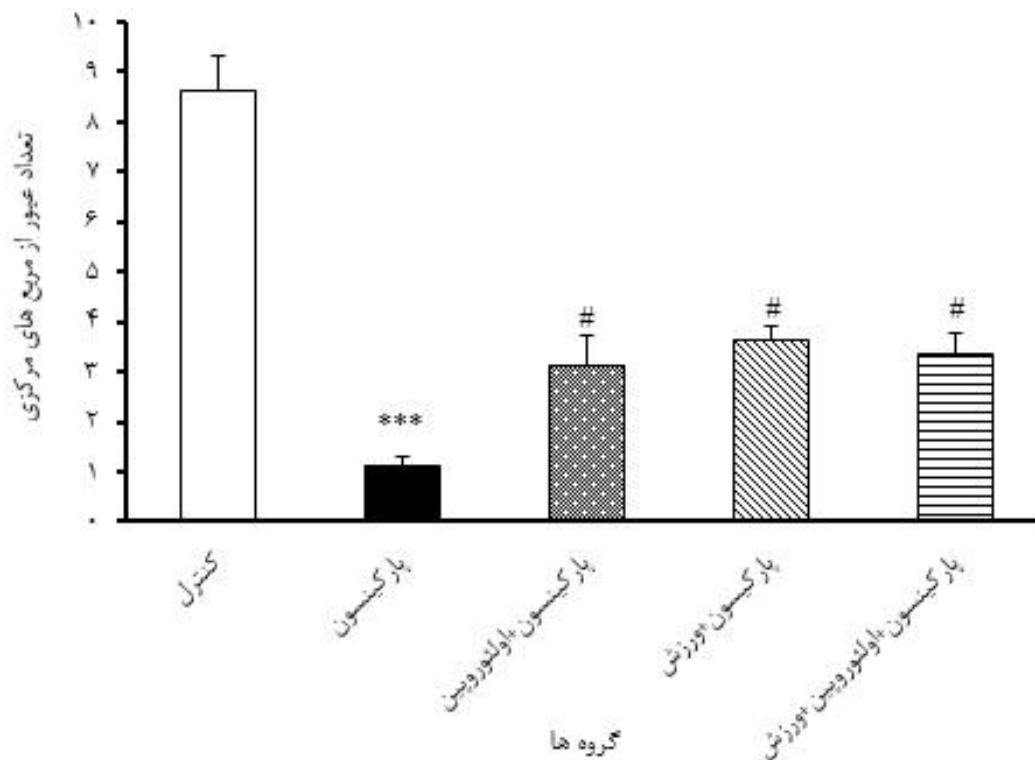
علامت *: تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم ($P<0.05$)

علامت #: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.05$)

علامت ##: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.01$)

Figure 1. The effect of four-week oral supplementation of oleuropein and exercise on the number of border crossings in the open field test in the animal model of Parkinson's disease. The graph is plotted in terms of mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ($n = 8$ in each group). Sign *: Significant difference with healthy control group ($P < 0.05$) Sign #: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.05$) Sign ##: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.01$)

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که در تعداد عبور از مربع حاشیه‌ای در تست جعبه باز، در گروه حیوانات پارکینسونی شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($P<0.05$). هم چنین این نمودار نشان می دهد تعداد عبور از مربع حاشیه‌ای در تست جعبه باز در گروه پارکینسون-مصرف اولئوروپین ($P<0.01$)، پارکینسون-تمرین شنا ($P<0.01$)، پارکینسون-تمرین شنا همراه با مصرف اولئوروپین ($P<0.05$) به طور معنی داری بالاتر از گروه پارکینسونی بود (شکل شماره ۱).



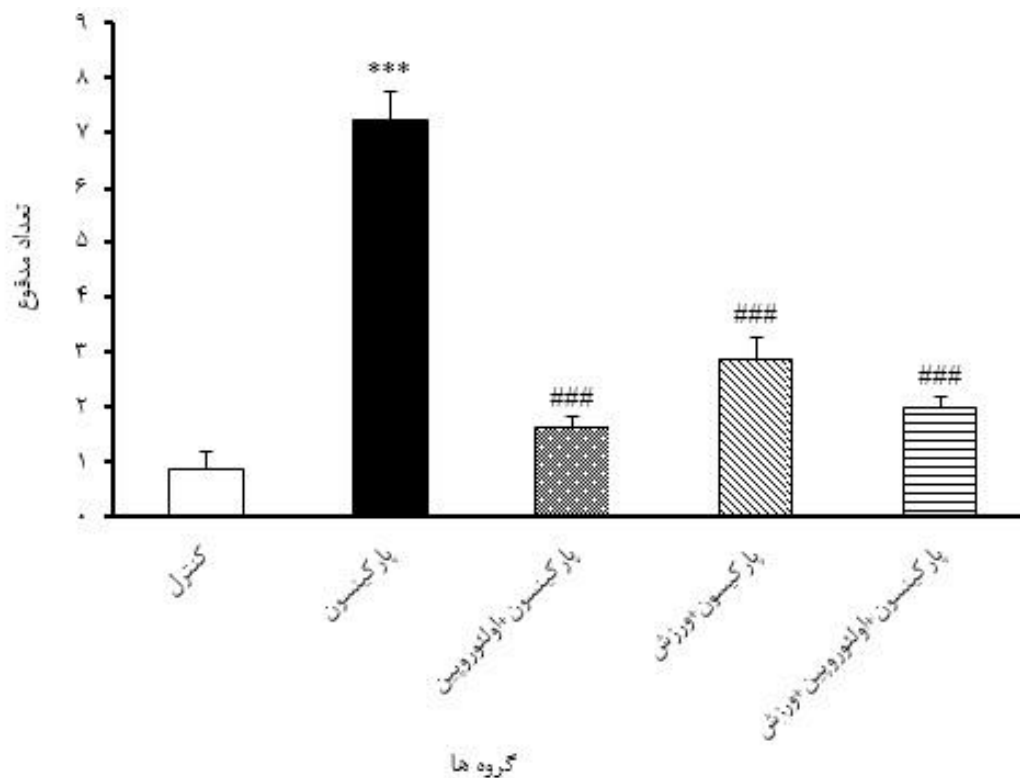
شکل ۲- تاثیر چهار هفته تجویز خوراکی اولئوروپین و ورزش بر تعداد عبور از مربع مرکزی در تست جعبه باز در مدل حیوانی بیماری پارکینسون. نمودار بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه $n=8$).

علامت ***: تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم ($P<0.001$)

علامت #: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.05$)

Figure 2. The effect of four-week oral supplementation of oleuropein and exercise on the number of crossings of the central square in the open field test in the animal model of Parkinson's disease. The graph is plotted in terms of mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ($n = 8$ in each group). Sign *: significant difference with healthy control group ($P < 0.001$) Sign #: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.05$)**

همان طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می شود در تست عبور از مربع مرکزی در تست جعبه باز ، در گروه حیوانات پارکینسونی شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($P<0.001$). از سوی دیگر تعداد عبور از مربع مرکزی در تست جعبه باز در گروه پارکینسون-مصرف اولئوروپین ($P<0.05$)، پارکینسون-تمرین شنا ($P<0.05$)، پارکینسون-تمرین شنا همراه با مصرف اولئوروپین ($P<0.05$) به طور معنی داری نسبت به گروه پارکینسونی افزایش یافت.



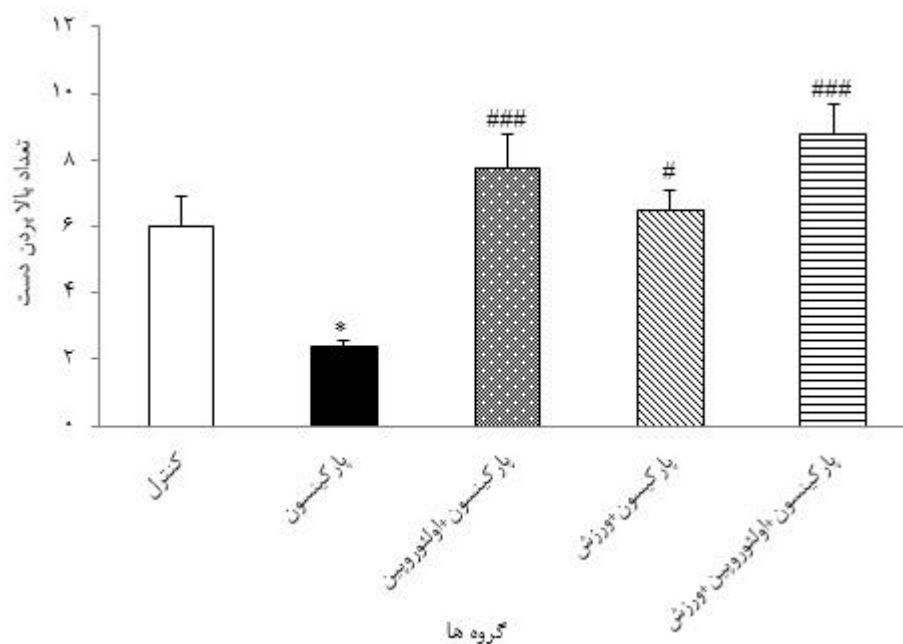
شکل ۳- تاثیر چهار هفته تجویز خوراکی اولئوروپین و ورزش بر تعداد دفع در تست جعبه باز در مدل حیوانی بیماری پارکینسون. نمودار بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه $n=8$).

علامت ***: تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم ($P<0.001$)

علامت ###: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.001$)

Figure 3. The effect of four-week oral supplementation of oleuropein and exercise on the number of excretions in the open field test in the animal model of Parkinson's disease. The graph is plotted in terms of mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ($n = 8$ in each group). Sign *: significant difference with healthy control group ($P < 0.001$) Sign ###: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.001$)**

همانطور که شکل شماره ۳ نشان می دهد، در تست تعداد دفع مربوط به موش بالغ، با توجه به اینکه با افزایش تعداد دفع، افزایش افسردگی را به دنبال دارد، گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار و افزایش پیدا کرده است ($P<0.001$). نتایج نشان داد که تعداد دفع در گروه های عصاره اولئوروپین-پارکینسون، تمرین شنا-پارکینسون و ورزش همراه با مصرف اولئوروپین - پارکینسون نسبت به گروه پارکینسونی کاهش معنی داری داشته است ($P<0.001$).



شکل ۴- تاثیر چهار هفته تجویز خوراکی اولئوروپین و ورزش بر تعداد بالا بردن دست در تست جعبه باز در مدل حیوانی

بیماری پارکینسون. نمودار برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر

گروه $n=8$).

علامت *: تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم ($P<0.05$)

علامت #: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.05$)

علامت ###: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.001$)

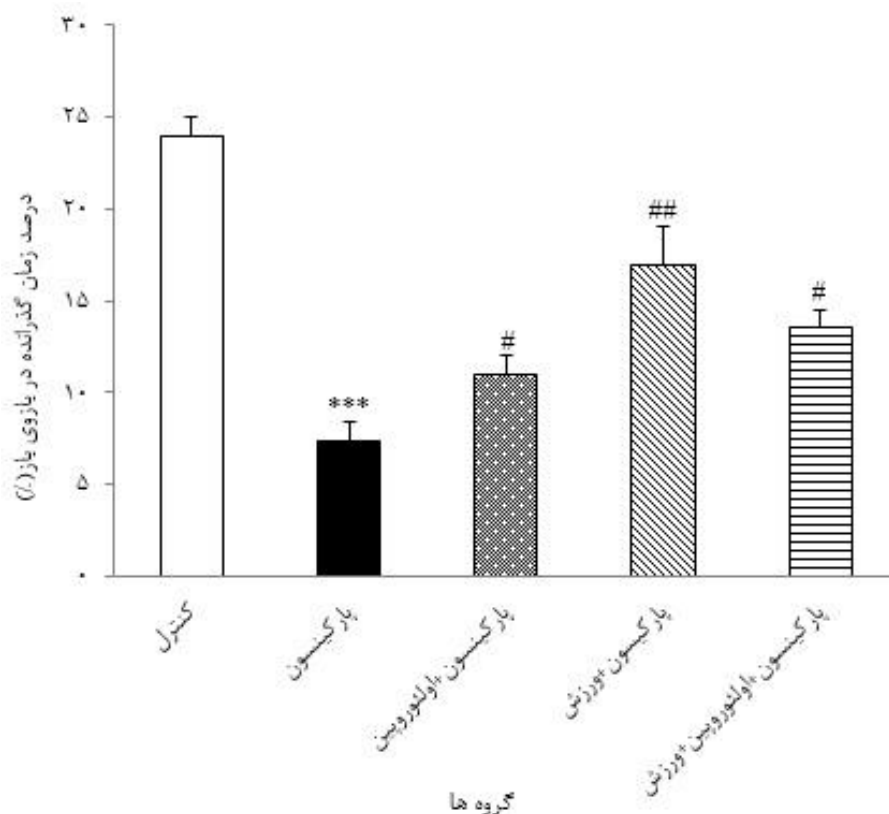
Figure 4. The effect of four weeks of oral supplementation of oleuropein and exercise on the number of hands raised in the open field test in an animal model of Parkinson's disease. The graph is plotted in terms of mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ($n = 8$ in each group). Sign *: significant difference with healthy control group ($P < 0.05$) Sign #: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.05$) Sign ###: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.001$)

نتایج حاصل از شکل ۴ نشان می دهد که در تست بالا بردن دست جعبه باز در گروه حیوانات پارکینسونی شده نسبت

به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($P<0.05$). همچنین تعداد بالا بردن دست در گروه های عصاره اولئوروپین-

پارکینسون ($P<0.001$) و ورزش همراه با مصرف اولئوروپین - پارکینسون ($P<0.001$) و گروه تمرین شنا-پارکینسون ($P<0.05$)

نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار آماری داشته و کاهش اضطراب نشان می دهد.



شکل ۵- تاثیر چهار هفته تجویز خوراکی اولئوروپین و ورزش بر درصد مدت زمان گذرانده در بازوی باز ماز به علاوه ای مرتفع در مدل حیوانی بیماری پارکینسون. نمودار برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه $n=8$).

علامت ***: تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم ($P<0.001$)

علامت #: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.05$)

علامت ##: تفاوت معنی دار با گروه پارکینسونی شده ($P<0.01$)

Figure 5. The effect of four weeks of oral supplementation of oleuropein and exercise on the percentage of time spent in the open arms of elevated plus-maze in the animal model of Parkinson's disease. The graph is plotted in terms of mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ($n = 8$ in each group). Sign *: significant difference with healthy control group ($P < 0.001$) Sign #: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.05$) Sign ##: Significant difference with Parkinson's group ($P < 0.01$)**

نتایج حاصل از شکل ۵ نشان می‌دهد که در تست ماز به علاوه ای مربوط به موش بالغ، در گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل کاهش درصد دفعات ورود موش به بازوی باز و افزایش اضطراب ($P<0.001$)، و همچنین در گروه های عصاره اولئوروپین-پارکینسون، ورزش همراه با مصرف اولئوروپین- پارکینسون ($P<0.05$) و گروه تمرین شنا- پارکینسون ($P<0.001$) نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار آماری داشته و افزایش درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز وجود دارد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل از لحاظ میانگین اضطراب اختلاف معنادار و افزایش پیدا کرده است. همچنین در گروهی که اولئوروپین مصرف کرده اند نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار و کاهش اضطراب وجود دارد. گروهی که تمرین ورزش دریافت کرده اند نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار و کاهش اضطراب را نشان می دهند و گروهی که توام اولئوروپین و ورزش دریافت کردند نیز نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار و اضطراب کاهش می یابد. در همین راستا تادایسکی و همکاران گزارش نمودند که ضایعه ایجاد شده با ۶-هیدروکسی دوپامین در جسم مخطط موش، موجب افزایش پاسخ های اضطرابی در تست رفتاری ماز به علاوه ای شکل مرتفع می گردد (Tadaiesky *et al.*, 2008). پلی فنل های موجود در عصاره های گیاهی دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد استرس اکسیداتیو فراوانی هستند (Vauzour *et al.*, 2010). Shrivastava و همکارانش پیشنهاد کردند که پیپرین به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، از طریق مکانیسم ضدآپوپتوزی، دارای اثر حفاظتی در بیماری پارکینسون ناشی از 6-OHDA است (Shrivastava *et al.*, 2013). همچنین برخی از مطالعات نیز تاثیر عصاره های گیاهی را بر اختلالات اضطرابی گزارش نمودند. Shahga و همکارانش اثرات ضد اضطرابی عصاره متانولی برگ گیاه لیمو *Cymbopogon citratus* را بررسی و وجود ترکیبات فلاونوئیدی را دلیل افزایش فاکتورهای OAT درصد و OAE درصد در تست ماز به علاوه های شکل مرتفع پیشنهاد نمودند (Shah *et al.*, 2010). در مطالعه ای دیگر خاصیت آرام بخشی عصاره برگ گیاه زیتون گزارش شده است (Obied *et al.*, 2012). بر اساس مطالعات قبلی، عصاره برگ گیاه زیتون نیز غنی از ترکیبات پلی فنلی می باشند (Aytul, 2010) و دارای فعالیت حفاظت نورونی قوی است که سبب بهبود استرس اکسیداتیو و آسیب عصبی در حیوانات می شود (Dekanski *et al.*, 2011). از طرف دیگر، ورزش طولانی مدت باعث افزایش سطح آنتی اکسیدان ها درون زامی شود که می تواند مغز را از آسیب های اکسیداتیو حفظ کند. از سوی دیگر مشخص شده که فعالیت ورزشی در انسان می تواند سبب بهبود رفتارهای اضطرابی و افسردگی گردد (Anderson & Shivakumar, 2013). فعالیت ورزشی در موش های صحرایی و سوری نیز سبب کاهش اضطراب در تست محیط باز، ماز به علاوه مرتفع و جعبه تاریک-روشن می گردد (Pietrelli *et al.*, 2012). هم چنین فعالیت های ورزشی کوتاه مدت از جمله ورزش های مقاومتی می توانند سبب بهبود علائم و نشانه های اضطراب گردند (Herring *et al.*, 2011). مطالعات پیشین نشان داده اند که فعالیت ورزشی می تواند سبب کاهش اضطراب در ورزشکاران گردد (Heidarya *et al.*, 2011). از نظر مکانیسم عمل، نشان داده شده که ورزش سبب رهاسازی اندورفین ها از مغز می گردد و اندورفین ها نقش مؤثری در کاهش اضطراب دارند (Torabi *et al.*, 2014). ورزش همچنین می تواند باعث تغییر در چندین سیستم هورمونی و نوروترانسمیتری در بدن از جمله: تغییر در سطح گابا، سروتونین و عامل ناتریورتیک دهلیزی گردد که هر کدام می تواند سبب تغییر سطح اضطراب به دنبال فعالیت ورزشی شوند (Strohle, 2009). تجزیه و تحلیل داده ها

همچنین نشان داد که مصرف اولئوروپین پس از ۴ هفته می تواند سبب کاهش معنی دار اضطراب گردد. از سوی دیگر مصرف اولئوروپین در کنار فعالیت ورزشی توانست اثر ضد اضطرابی بارزتر خود را نشان دهد. بررسی حاضر نشان می دهد که در تست عبور از مربع حاشیه ای مربوط به موش بالغ، با توجه به اینکه با افزایش تعداد عبور از مربع حاشیه ای افزایش اضطراب را به دنبال دارد گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار و افزایش افسردگی پیدا کرده است. اولئوروپین در غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری افسردگی را در آزمون شنای اجباری بهبود بخشید. همچنین گروهی که تمرین ورزش دریافت کرده اند نسبت به گروه پارکینسونی اختلاف معنادار و کاهش اضطراب را نشان می دهند و در گروهی که توام اولئوروپین و ورزش دریافت کردند نیز نسبت به گروه پارکینسونی، اختلاف معنادار آماری و کاهش افسردگی در تست عبور از مربع حاشیه ای موش بالغ مشاهده می شود. به نظر روانشناسان، بهترین راه پیشنهادی مناسب، کم هزینه و با اثرات جانبی حداقل، ورزش است و به عنوان یکی از روش های پیشگیری و حتی درمان افسردگی خفیف مطرح است. علاوه بر اثرات اقتصادی و صرف هزینه برای درمان، افسردگی اثرات دیگری نیز در بر دارد. هنگام افسردگی و استرس، احتمال مراقبت مناسب از خود، داشتن تغذیه مناسب و فعالیت های بدنی، کمتر شده و با افزایش سطح هورمون های مربوطه، فرد بیشتر در معرض مشکلات بهداشتی قرار می گیرد. با توجه به آمار روز افزون اختلالات روانی، پژوهش های بی شماری در خصوص تأثیر ورزش در درمان و حتی پیشگیری مشکلات روانی بخصوص افسردگی انجام گرفته است. ورزش کمک مهمی در به وجود آوردن احساس تندرستی و هم چنین افزایش تحمل روانی زندگی دارد. تمرینات بدنی با تخلیه انرژی به افراد آرامش می دهد و باعث کاهش فشارهای روانی می شود (Soltaniyan & Aminbeidokhti, 2009). با ورزش علایم اضطراب و افسردگی کاهش یافته و با بهبودی خلق، احساس خوب بودن را ارتقاء می بخشد. (Asci, 2003). تمرینات ورزشی هوازی به مدت ۹ هفته و هر هفته سه جلسه ۲۰ دقیقه ای، باعث کاهش افسردگی و افزایش مکانیسم های سازگاری زنان افسرده می شود (Hasty, 2000). به نظر روانشناسان ورزش به عنوان یکی از روش های پیشگیری و حتی درمان افسردگی خفیف مطرح است (Sadok, 2004). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز گویای این مطلب است که ورزش در کاهش افسردگی مؤثر بوده است. یافته های پژوهش حاضر با نتایج پژوهش های پیشین مبنی بر اثر فعالیت های ورزشی بر کاهش مشکلات روانی و افسردگی، همسو است. ورزش باعث کاهش فشارهای عصبی و افسردگی در محیط کار می شود توجه برای توضیح این پدیده، افزایش سطح سروتونین و نوراپی نفرین در هنگام فعالیت های ورزشی است که موجب کاهش افسردگی می شود (Smith & Elliott, 2003). به عبارت دیگر تمرینات بدنی از دو راه بر روح و روان انسان اثرگذار است: یکی رها شدن اندورفین و دوم کاهش سطوح کورتیزول (هورمونی که با فشار عصبی در خون ترشح می شود). بر اساس نظر متخصصان فیزیولوژی، آندرفین ها داروهای طبیعی کاهش درد هستند که سبب بوجود آمدن احساسات خوشایند می شوند، تمرینات بدنی موجب افزایش سطوح ترشح آندرفین می شوند (Grohol, 2006). شهرجردی و همکاران مطالعه ای در سال ۱۳۸۸ انجام دادند که نشان دهنده تأثیر مثبت ورزش بر بهداشت روان و کیفیت زندگی بود که تأییدی بر یافته های مطالعه

حاضر است (Sharjerdi *et al.*, 2010). سلطانی و همکاران در مطالعه ای بر روی دانشجویان دانشگاه فردوسی نشان دادند که ورزش بر سلامت عمومی، کیفیت خواب و کیفیت زندگی تأثیر مثبتی داشته است (Soltani-Shall *et al.*, 2013). همچنین در یک کارآزمایی بالینی تصادفی کنترل شده، از تجزیه و تحلیل اثرات ورزش هوازی به عنوان یک استراتژی برای درمان بیماران مبتلا به افسردگی استفاده نمودند و موثر بودن تمرینات ورزشی در درمان بیماران مبتلا به افسردگی شدید را تأیید نمود (Schuch *et al.*, 2011).

نتیجه گیری: ورزش توام با مصرف اولئوروپین احتمالاً به دلیل اثر آنتی اکسیدانی قوی و یا تداخل در فعالیت گیرنده های مسیر پاداشی می توانند علاوه بر دارودرمانی، سبب بهبود رفتارهای اضطرابی و افسردگی در مدل حیوانی پارکینسونی شوند که نیازمند تحقیقات مولکولی تکمیلی است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر، برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز ثبت می باشد. بدین وسیله، نویسندگان از مسئولان دانشگاه تمام کسانی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته اند تشکر و قدردانی به عمل می آورند.

منابع

- Anderson, E. and Shivakumar, G. (2013) Effects of exercise and physical activity on anxiety. *Front Psychiatry*. 4 (27).
- Asci, F.H. (2003) The Effects of physical fitness training on trait anxiety and physical self-concept of female university student. *J Psychol Sport Exercise*, 4(2): 255-64.
- Aytul, K.K. (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Izmir institute of technology. Available at: <http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/biyoteknoloji/T000831.pdf>.
- Bourin, M., Chenu F., Prica C. and Hascoet M. (2009) Augmentation effect of combination therapy of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice . *Psychopharmacol.*, 206: 97–107.
- Bueno, C.H., Zangrossi, Jr H. and Viana, M.B. (2005) The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res*, 38(11):1697-1701.
- Degroot, A., Kashluba, S. and Treit, D. (2001) Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Pharmacol. Bioch. Behave.*, 69:391-9.

- Dekanski, D., Selakovic, V., Piperski, V., Radulovic, Z., Korenic, A., and Radenovic, L. (2011) Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomedicine*, 18(13), 1137-1143.
- Dexter David, T. and Jenner, P. (2013) Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144.
- Dissanayaka, N.N., Sellbach, A., Matheson, S., O'Sullivan, J.D., Silburn, P.A., Byrne, G.J., Marsh, R. and Mellik, G.D. (2010) Anxiety disorders in Parkinson's disease: prevalence and risk factors. *Mov Disord*, 25(7): 838-45.
- Farzin, D., Zarghami, M. and Khalaj, L. (2005) Evaluation of antidepressant activities of Rose oil and Geranium oil in the mouse forced swim test. *J Babol Univ Med Sci.*, 7(1): 7-13.
- Grohol, J.M. (2006) Depression in women, seniors and children. [ebook]. Available from: <http://psychcentral.com/lib/2006/the-causes-of-depression>.
- Happe, S., Schrod, B., Faltl, M., Muller, C., Auff, E. and Zeitlhofer, J. (2001) Sleep disorders and depression in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.*, 104(5): 275-80.
- Hasty, S. (2000) Gender studies: obesity Increases risks of depression & suicide in women, decreases risks in womans health weekly. Available from, <http://www.newsrx.com/newsletters/Women>.
- Heidarya, A. Emami, A. Eskandaripour, S. Saiah, A., Hamidi, S. and Shahbazi, M. (2011) Effects of aerobic exercise on anxiety. *Procedia Social Behavioral Science*, 30: 2497-2498.
- Herring, M.P. Jacob, M.L. Suveg, C. and O'Connor, P.J. (2011) Effects of short-term exercise training on signs and symptoms of generalized anxiety disorder. *Mental Health and Physical Activity*, 4: 71-77.
- Jafari, F., Doulah, A. and Rafieirad, M. (2020) Effect of oleuropein and swimming practice on motor disorder induced by 6-hydroxydopamine toxin in mature male rats. *JBRMS*. 7 (1) :50-60
- Ji, L.L. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and training in the skeletal muscle. *Oxidative Stress in skeletal muscle*. 25(2): 225-31.
- Lockyer, S., Corona, G., Yaqoob, P., Spencer, J.P. and Rowland, I. (2015) Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr*. 8:1-9.
- Mahmoudi, R., Rafieirad, M. and Goudarzi, S. (2018). Effect of Hydroalcoholic Extract of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss on Motor and Memory Disorders in Animal Model of Parkinson Disease. *Qom Univ Med Sci J*. 12(8): 36-47.
- Nagatsu, T. (2002) Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease: past, present, and future. *Neurotoxicology and Teratology*. 24(5); 565-9.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Omar, S.H., Ismael, R., Servili, M. and Esposto, S. (2012) Pharmacology of olive biophenols, Chapter 6. In book: *Advances in Molecular Toxicology*. Elsevier. p.195.
- Omar, S.H. (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 78(2): 133-54.
- Pietrelli, A., Lopez-Costa, J., Goni, R., Brusco, A. and Basso, N. (2012) Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*. 202: 252-266.
- Pourkhodad, S., Alirezaei, M., moghadasi, m., Delfan, B., Ahmadvand, H., Karami, M., et al. (2016). The effect of oleuropein on passive avoidance memory in colchicine-induced rat model of Alzheimer's disease. *Daneshvar Medicine*, 23(124); 1-8.

- Rafieirad, M. and Abbaszadeh, H. (2017) Pomegranate seed extract reduces ischemia induced anxiety in male rats. *J Herbmmed Pharmacol.* 6(2):85-89.
- Sadok, B.J. (2004) Abstract of psychiatry. Trans Rafiei H, Sobhanian Kh. Tehran: Arjmand; [Persian]
- Strohle, A. (2009) Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J. Neural Transm.* 116: 777-784.
- Smith, L.L. and Elliott, C.H. (2003) Demystifying and defeating depression. [ebook]. Wiley. p. 9-20.
- Sonei, A., Hajrasouliha, S.h., Hadipour Jahromy, M., Movaseghi, S.h. and Sharifi, N.Z. (2018) Effect of Aqueous Extra Ctfuito frhus Coriaria on Reducing Anxiety and Pain in Mice. *Qjaphd.* 44: 35-45.
- Soltani Shall, R., Aghamohammadian Sharbaf, H. and Ghanaei chamanabad, A. (2013) Effect of exercise on general health, quality of sleep and quality of life in Ferdowsi University of Mashhad students. *JQUMS.* 17(4): 39- 46. [in Persian]
- Soltaniyan, M.A. and Aminbeidokhti, A.A. (2009) The role of sport on job burnout of employees. *J Semnan Unive Med Sci.* 10(4): 281-6. [in Persian]
- Savica, R., Rocca, W.A. and Ahlskog, J.E. (2010) When does Parkinson disease start? *Archneurosci.* 67(7): 798-801.
- Schuch, F.B., Vasconcelos-Moreno, M.P., Borowsky, C. and Fleck, M.P. (2011) Exercise and severe depression: preliminary results of an add-on study. *J Affect Disord.* 133(3): 615-8.
- Shah, G., Shiri, R., Dhabilitya, F., Nagpal, N. and Mann, A.S. (2010) Anti-anxiety activity of cymbopogon citratus (dc.) stapf leaves extracts on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Pharmaco J.* 2(15): 45-50.
- Sharjerdi, S.H., Shondi, N. and Sheikh Hoseini, R. (2010) The effect of strength and endurance training on blood glucose control, quality of life and mental health in women with type 2 diabetes. *IJDLD.* 9(1): 35- 44. [in Persian]
- Shrivastava, P., Vaibhav, K., Tabassum, R., Khan, A., Ishrat, T., Khan, M.M., Ahmad, A., Islam, F. Safhi, M.M. and Islam, F. (2013) Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model. *J Nutr Biochem.* 24(4): 680-7.
- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. and Takahashi, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 156(4): 830-40.
- Torabi, M., Kesmati, M., Eshagh Harooni, H. and Najafzadeh Varzi, H. (2014) The effect of local and intraperitoneal administration of opioid receptors modulating agents on anxiolytic properties of nano and conventional ZnO in male rats. *Cell J.* 16: 1, 37-61.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J. and Spencer, J.P. (2010) Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2(11): 1106-31.
- Yoon, M.C., Shin, M.S., Kim, T.S., Kim, B.K., Ko, I.G., Sung, Y.H., Kim, S.E., Lee, H.H., Kim, Y.P. and Kim, C.J. (2007) Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Neurosci Lett.* 423(1): 12-7.9.

The effect of four weeks of exercise and oleuropein supplementation on anxiety and depression behaviors in an animal model of Parkinson's disease

M. Makvandi Cheshmeh Chenar¹, A. Doulah^{2*}, M. Rafieirad³

Received: 2021.07.06

Accepted: 2021.10.26

Abstract

Parkinson's disease is a destroyer of dopamine neurons in the dense structure of the substantia nigra and other areas of the brainstem. Anxiety and depression are common in Parkinson's. The aim of this study was to investigate the effect of oleuropein and exercise on anxiety and depression in animal models of Parkinson's disease. In this experimental study, 40 rats were divided into five groups: control, Parkinson's (6-hydroxy dopamine to the striatum area unilaterally), swimming practice (five sessions per week and 30 minutes each session), oleuropein recipient for 4 weeks (20 mg per kilogram of body weight per day) and combined with swimming practice and oleuropein. To assess anxiety, the elevated plus-maze test was performed and to assess depression, the open box test was performed. One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used to determine the differences between the groups. The results showed that the use of oleuropein with exercise significantly increased the duration of Parkinson's model animal in the Plus open maze arms ($P < 0.05$). Also, the use of oleuropein with exercise in open field box testing significantly increases the number of animals crossing the central square and significantly reduces the number of crossings of marginal squares and the number of hands raised ($P < 0.05$). The results of this study showed that exercise combined with oleuropein consumption can improve anxiety and depression behaviors in Parkinson's rats with its antioxidant effect.

Keywords: *Anxiety, Depression, Exercise, Oleuropein, Parkinson's.*

1MSc Graduate, Physical Education and Sport Sciences Department, Faculty of Human, Sciences, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2 Assistance Professor, Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

3 Associate Professor, Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran (*Corresponding author h_doulah@yahoo.com)

Content

page

1. In vitro evaluation of the effect of the organic adsorbent on the reduction of mycotoxin Zearalenone F. Adami Ghamsari, M. Tajabadi Ebrahimi *, M. Bagheri Varzaneh, A. Iranbakhsh, A. Akhavan Sepahi .27	27
2. The effects of hydrolyzed canola meal protein on growth, body composition and expression of growth genes, and appetite of beluga fish (<i>Huso huso</i>) M. Ebrahimnezhadarabi, S.M. Hoseinifard*, R. Changizi, S. Vatandoust, Sh. Ghobadi.....43	43
3. Hyperglobulinemia and increased erythrocyte membrane osmotic instability of intermediate hosts infected with the zoonotic parasite, <i>Linguatula serrata</i> A. R. Alborzi*, M. Hosseini, S. Bahrami, M. Ghorbanpoor, M. R. Tabandeh59	59
4. Suitability modeling of white-fronted goose (<i>Anser albifrons</i> Scopoli 1769) in Iran F. Bigleri Quchan Atiq, A. Farashi*, M. Shariati Najafabadi 77	77
5. Assay and comparison the impact of primer in evaluation of bacterial community structure in semiarid area by Illumina Miseq M. Teimouri, P. Mohammadi*, A. Jalili, R. Zarei 96	96
6. Geobotany of <i>Onosma</i> L. (Boraginaceae) genus in the middle part of the Central Zagros: A conservation approach F. Khajoei Nasab, A. Mehrabian*, M. J. Nikjouyan.....130	130
7. The effect of the aquatic and alcoholic extracts of bipod nettle weed on the growth and some biochemical features of tomato plant under the greenhouse condition E. Ryazi, F. Rakhshandehroo*, V. Abdossi.....153	153
8. The effect of hydro alcoholic extract of Bistort (<i>Polygonum bistorta</i> L) root on blood glucose concentration of streptozotocin induced diabetic mice E.Salehi*, M. Moravati Sharifabad, M. Karimi, M. Sazi zavareh.....164	164
9. Effect of sex, length, and weight on carcass quality changes in <i>Onchorhynchus mykiss</i> Majid Mohammad Nejad*, Fadaee Raieni, R177	177
10. The effect of four weeks of exercise and oleuropein supplementation on anxiety and depression behaviors in an animal model of Parkinson's disease M. Makvandi Cheshmeh Chenar, A. Doulah*, M. Rafieirad..... 193	193

Journal of Applied Biology

Spring 2022

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

H. Ejtehad, Professor of Ferdowsi University of Mashhad

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

F. Darvishi, Professor of Alzahra University

M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University

M. Ranjbar, Professor of Bu Ali Sina University

A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University

A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

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

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

International Editorial Board

H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn

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

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research

English& Persian Editor: Masoumeh Aslanzadeh

Printing and Binding: 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