

۱. بررسی تاثیر عصاره الکلی دو گیاه دارویی سیاهدانه و گلپر بر روی تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین کیمیا احدی عمدی، سید ابوالقاسم قدمی*
۲. بررسی میزان تجمع و تحمل نیکل توسط گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) در شرایط کشت هیدروپونیک ثریا امیر احمدی، طهماسب آسمانه*، اطهر السادات جوانمرد
۳. آرایه شناسی مولکولی و تبارشناسی (*Rutilus s. str.* (Teleostei: Leuciscidae) در حوضه جنوبی دریای خزر آرش جولاده رودبار، علی نزل آبادی، مجید نوائیان
۴. بررسی تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات فیزیکی بذر درختان بنه (مطالعه موردی: ذخیره گاه سوستان در استان آذر بایجان غربی) قدرت رحیم زاده*، رحیم میرزایی ملاحمد
۵. بررسی مقایسه‌ای و تلفیقی کشندگی چند آفت کش میکروبی، شیمیایی و گیاهی روی تریپس گندم *Haplothrips tritici* K. (Thysanoptera: Phlaeothripidae) در شرایط آزمایشگاهی فرشید شکوهی نیا، علی میرشکار*، عباس خانی ۶. اثرات پرتوتابی گاما بر ترکیبات آلرژن و میزان کشندگی زهر زنبور عسل در مدل حیوانی همستر
- پروین شورنگ*، فاطمه عباسی، فاطمه طه‌پوری، حامد عسکری ۷. تاثیر سرمازدگی بر سه رقم تجاری کیوی (هایوارد، طلایی و توسرخ)
- شهرام صداقت حور*، سیده خدیجه عباس نیا زارع، سیده آمنه سجادی
۸. تثبیت کووالانسی آنزیم پراکسیداز نو ترکیب لپیدیوم درابا (LDP) بر روی ساختار آلی-فلزی روی با استفاده از گلو تار آلدئید سودابه فرهادی، علی ریاحی مدوار*، مجتبی مرتضوی، قاسم سرگزی
۹. جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده اگزالی پلاتین از پساب صنایع دارویی و به کارگیری آنان به منظور حذف دارو با استفاده از جمعیت‌های یک و چند گونه‌ای سید رضا گراکویی*، خسرو عیسی زاد، حجت اله زمانی، روحان رخشایی، مهدی شهریاری نور
۱۰. کاربرد روش ISSR در شناسایی سیستماتیک و تفکیک جمعیت های گونه *Aspergillus flavus* امیرعباس مینایی فر

بسم الله الرحمن الرحيم
فصلنامه علمی مجله زیست شناسی کاربردی

تابستان 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.isc.gov.ir

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

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

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

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

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

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله ها

-مقاله‌ای در یک کتاب: نام خانوادگی، حرف اول نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفات مقاله، عنوان کتاب. ناشر (کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ). Baver, L.D. and Gardner, W.H. (1972). Flow in stratified soil systems. Pages 343–345 in Baver LD, ed. Soil Physics New York: Academic Press. - خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور. Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005). Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – peroxidase activity of field bindweed(<i>Convolvulus arvensis</i> L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World Congresson 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 <i>Cynanchum acutum</i> in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institue of Plant Protection Pp25. -منابع بی نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود: بی نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال). Anonymous, (2001). Project Summary Comparative Genomics of Domestication Traits in Lettuce and Sunflower. http://veghome.ucdavis.edu/faculty/micheltmore/Project summary.htm. Accessed August 23, 2001. -استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه htm ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه روز، سال). Agriculture and Agri-Food Canada. (1999). Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division. http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean_e.html. Accessed: January 29, 2001. -وقتی مقاله ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.		
---	--	--

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

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

۱. بررسی تاثیر عصاره الکلی دو گیاه دارویی سیاهدانه و گلپر بر روی تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین
 کیمیا احدی عمدی، سید ابوالقاسم قدمی* ۷
۲. بررسی میزان تجمع و تحمل نیکل توسط گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) در شرایط کشت هیدروپونیک
 ثریا امیر احمدی، طهماسب آسمانه*، اطهر السادات جوانمرد ۱۹
۳. آرایه شناسی مولکولی و تبارشناسی (*Rutilus s. str.* (Teleostei: Leuciscidae) در حوضه جنوبی دریای خزر
 آرش جولاده رودبار، علی نزل آبادی، مجید نوائیان ۳۷
۴. بررسی تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات فیزیکی بذر درختان بنه (مطالعه موردی: ذخیره گاه سوسان در استان آذربایجان غربی)
 قدرت رحیم زاده*، رحیم میرزایی ملا احمد ۴۹
۵. بررسی مقایسه‌ای و تلفیقی کشندگی چند آفت کش میکروبی، شیمیایی و گیاهی روی تریپس گندم *Haplothrips tritici* K.
 (Thysanoptera: Phlaeothripidae) در شرایط آزمایشگاهی ۶۲
۶. اثرات پرتوتایی گاما بر ترکیبات آلرژن و میزان کشندگی زهر زنبور عسل در مدل حیوانی همستر
 پروین شورنگ*، فاطمه عباسی، فاطمه طه‌وری، حامد عسکری ۸۰
۷. تاثیر سرمازدگی بر سه رقم تجاری کیوی (هایوارد، طلایی و توسرخ)
 شهرام صداقت حور*، سیده خدیجه عباس نیا زارع، سیده آمنه سجادی ۹۲
۸. تثبیت کووالانسی آنزیم پراکسیداز نو ترکیب لپیدیوم در ابا (LDP) بر روی ساختار آلی-فلزی روی با استفاده از گلو تار آلدئید
 سودابه فرهادی، علی ریاحی مدوار*، مجتبی مرتضوی، قاسم سرگزی ۱۰۸
۹. جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده اگزالی پلاتین از پساب صنایع دارویی و به کارگیری آنان به منظور حذف دارو با استفاده از جمعیت‌های
 یک و چند گونه‌ای ۱۲۶
- سید رضا گراکویی*، خسرو عیسی زاد، حجت اله زمانی، روحان رخشایی، مهدی شهریاری نور ۱۲۶
۱۰. کاربرد روش ISSR در شناسایی سیستماتیک و تفکیک جمعیت های گونه *Aspergillus flavus*
 امیر عباس مینایی فر ۱۳۹

بررسی تاثیر عصاره الکلی دو گیاه دارویی سیاهدانه و گلپر بر روی تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین

کیمیا احدی عمندی^۱، سید ابوالقاسم قدمی^{۲*}

چکیده

مقدمه: بررسی نقش متنوع و حیاتی پروتئین‌ها در بدن، در مقابل نقص و بیماری ناشی از عدم فعالیت صحیح آن‌ها موضوع مورد علاقه‌ای برای تحقیقات علمی می‌باشد. تجمعات آمیلوئیدی و به دنبال آن بیماری‌های مربوط به تخریب سیستم عصبی جنبه‌ی دیگری از نقش پروتئین‌ها در بیماری‌زایی را به نمایش گذاشته‌اند. با در نظر گرفتن این موضوع که در حال حاضر درمان مشخصی برای این بیماری‌ها وجود ندارد، پیشگیری از ایجاد تجمعات آمیلوئیدی کاربردی‌ترین روش برخورد با آن‌ها است.

روش‌ها: در این پژوهش اثرات عصاره الکلی دو گیاه دارویی بر روی ایجاد تجمعات فیبریلی انسولین بررسی شد. تشکیل ساختار آمیلوئیدی در پروتئین انسولین تحت شرایط دما و pH خاص و تحت تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه سیاهدانه و گلپر در غلظت‌های مختلف به کمک تکنیک فلورسانس تیوفلاوین تی (ThT) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد.

نتایج و بحث: بررسی‌ها نشان دادند که عصاره‌های به دست آمده تاثیر پیشگیرانه‌ی به سزایی در تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین ایفا می‌کنند. با توجه به سابقه‌ی طولانی استفاده از گیاهان دارویی مانند سیاهدانه و گلپر در فرهنگ ایرانی و اسلامی و همچنین حضور ترکیبات با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدتشنجی در آن‌ها و برطبق داده‌های به دست آمده از این پژوهش، دو گیاه معرفی شده کاندیدهای مناسبی برای بررسی ترکیبات ضدتجمع پروتئینی هستند.

واژه های کلیدی: آلزایمر، بیماری‌های تخریب عصبی، بیماری‌های وابسته به سن، فیبریل‌های آمیلوئیدی، گیاه گلپر، گیاه سیاهدانه

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

مقدمه

در جامعه‌ی جهانی امروز با افزایش امید به زندگی، بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی (Neurodegenerative diseases) به عنوان بیماری‌های وابسته به سن نگرانی‌های زیادی را به همراه آورده‌اند. این بیماری‌ها مانند آلزایمر (Alzheimer's disease)، پارکینسون (Parkinson's disease)، اسکروزیس آمیوتروفیک جانبی (ALS)، هانتینگتون (Huntington's disease)، آتاکسی مخچه‌ای نخاعی (Spinocerebellar Ataxia)، زوال عقل لب گیجگاهی (frontotemporal dementia)، به طور معمول با نشانه‌های بیماری‌زایی مشابه مانند زوال عقلی، فراموشی، ناتوانی در صحبت و حرکت که به طور پیشرونده‌ای با افزایش سن افزایش می‌یابند، شناسایی می‌شوند که عوامل مشابه درونی مانند تخریب نورون‌ها در قسمت‌های مشخصی از مغز، تخریب شبکه‌ی ارتباط سیناپسی و از دست رفتن توده‌ی مغزی به عنوان منشاء اصلی این نشانه‌های بیماری‌زایی به شمار می‌روند (Soto & Pritzkow, 2018). بیماری آلزایمر از اولین انواع بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی شناخته شده و بررسی شده است که عامل ایجاد بیش از ۸۰ درصد زوال عقل در سنین بالا به شمار می‌رود (Durães et al., 2018)، گرچه هنوز هم مکانیسم دقیق ایجاد کننده‌ی این بیماری مشخص نیست اما حضور پلاک‌های آمیلوئیدی متشکل از آمیلوئید بتا (β -amyloid) و ریسمان‌های نوروفیبری ایجاد شده از پروتئین تاو (Tau) با تاخوردگی نامناسب، در داخل مغز افراد مبتلا به این بیماری گزارش شده‌است (Fu et al., 2018). کم و بیش تمام بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی به گونه‌ای با ساختار نامناسب پروتئین‌ها مرتبط هستند، این مشکل ساختاری می‌تواند با تاخوردگی نامناسب پروتئین، برش‌های نامناسب ایجاد شده در یک پروتئین، تغییرات پس از ترجمه‌ی اشتباه ایجاد شده بر روی پروتئین، مشکلات مربوط به بیان پروتئین و حتی جهش‌های ژنی در ارتباط باشد (Prusiner, 2001).

پروتئین‌ها مسئولیت انجام بسیاری از فعالیت‌های سلولی را برعهده دارند، این مواد برای انجام فعالیت‌های خود نیازمند فرم ساختاری ویژه‌ای هستند. در فرآیند تاخوردگی، ساختار خطی اولیه پروتئین‌ها به ساختار پویای سه بعدی نهایی و عملکردی خود تبدیل می‌شوند. در این فرآیند حدواسط‌های نیمه فولد شده‌ی (partially folded) ایجاد شده از ساختار خطی اولیه مسئول ایجاد ساختار نهایی هستند (Thompson & Barrow, 2002). طی این مسیر چپرون‌های سلولی نقش به سزایی دارند و در صورت ایجاد هرگونه نقص در عملکرد این مولکول‌ها، ساختارهای حدواسط به سمت ایجاد تجمعات اولیگومری پروتئینی و به دنبال آن آمیلوئیدها حرکت می‌کنند، درواقع در فیبریلایسیون پروتئینی، پروتئین‌های کروی و محلول طی تغییر ساختمانی ساختارهای بتا فراوان و آبگریز ایجاد می‌کنند. ساختارهای نامناسب پروتئینی توسط پروتئازها و با مصرف انرژی قابل حذف شدن هستند (Merlini et al., 2001)، اما گاهی سنتز بیش از حد پروتئین، جهش‌های وراثتی و یا ساختارهای مستعد تجمع در پروتئین (Picken, 2020) در کنار عدم کارایی مناسب سیستم چپرونی و سیستم پروتئازی، ساختارهای آمیلوئیدی برگشت ناپذیر و سمی ایجاد خواهد کرد (Merlini et al., 2001). ساختارهای آمیلوئیدی ایجاد شده به فیبرهای آمیلوئیدی نامحلول پلیمریزه شده و در ادامه پلاک‌ها را ایجاد می‌کنند، این ساختارهای پلاک مانند، مسیر کینازی‌ای را فعال می‌کنند که باعث ایجاد پاسخ‌های التهابی می‌شود، این پاسخ‌ها برای مثال در مغز به سمیت عصبی منجر خواهند شد (Tiwari et al., 2019). ایجاد ساختارهای تجمعی و آمیلوئیدی پروتئین‌ها در شرایط *in vitro* به عوامل متفاوتی وابسته است، از میان این عوامل می‌توان به pH، دمای بالا که باعث از بین رفتن برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی می‌شود، غلظت بالای پروتئین و عوامل دیگر اشاره کرد (Lee et al., 2020). انسولین پروتئینی کوچک، متشکل از دو

زنجیره‌ی A و B که توسط دو پیوند دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند و هورمون اصلی تنظیم کننده‌ی قند خون است. این پروتئین همواره به عنوان مدلی برای تجمعات آمیلوئیدی به شمار می‌رفته است، که این انتخاب برگرفته از تمایل زیاد پروتئین انسولین به تشکیل آمیلوئید در شرایط در شیشه و همچنین مشاهده‌ی تشکیل آمیلوئید در محل تزریق انسولین در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد ((Iannuzzi et al., 2017)).

پزشکی سنتی از زمان‌های گذشته همواره در زندگی مردم نقش پررنگی داشته است، با این که با مکانیزه شدن و سنتز شیمیایی داروها، توجه به طب سنتی مانند گذشته نیست اما گیاهان دارویی همواره گزینه‌ی مورد توجهی بوده‌اند. ترکیبات متفاوتی در پزشکی سنتی برای تقویت حافظه و جلوگیری از فراموشی پیشنهاد شده‌اند که از معروف‌ترین آن‌ها می‌توان به کندر، صمغ درختچه *Boswellia carteri* Birdw. اشاره کرد. به طور کلی در گذشته (کتب قدیمی) فراموشی را تحت عنوان «نسیان» می‌شناختند و ناشی از سردی مغز می‌دانستند و برای درمان آن از ترکیبات تغییر دهنده‌ی مزاج استفاده می‌کردند. در علم جدید ارتباطی میان بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی و استرس اکسیداتیو مطرح شده‌است و به کارگیری گیاهان واجد ترکیبات آنتی اکسیدان به عنوان منبعی برای یافت ترکیبات درمانی، اهمیت پیدا کرده است (Jamshidi et al., 2020). در دهه‌های گذشته بررسی‌های فراوانی برای یافتن عوامل پیشگیری کننده از ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی صورت گرفته‌است که در این میان می‌توان به اثرگذاری میوه‌ها و سبزیجات حاوی ترکیبات طبیعی اشاره کرد. مشخص شده‌است که ترکیبات موثر در پیش‌گیری عارضه‌های تخریب‌کننده عصبی به طور معمول آنتی‌اکسیدان هستند و اثرگذاری ضدتجمعی در رابطه با خودپیرایشی برخی پپتیدها و پروتئین‌ها در مورد گیاهان سرشار از ترکیبات فنلی گزارش شده است (Ciccone et al., 2020).

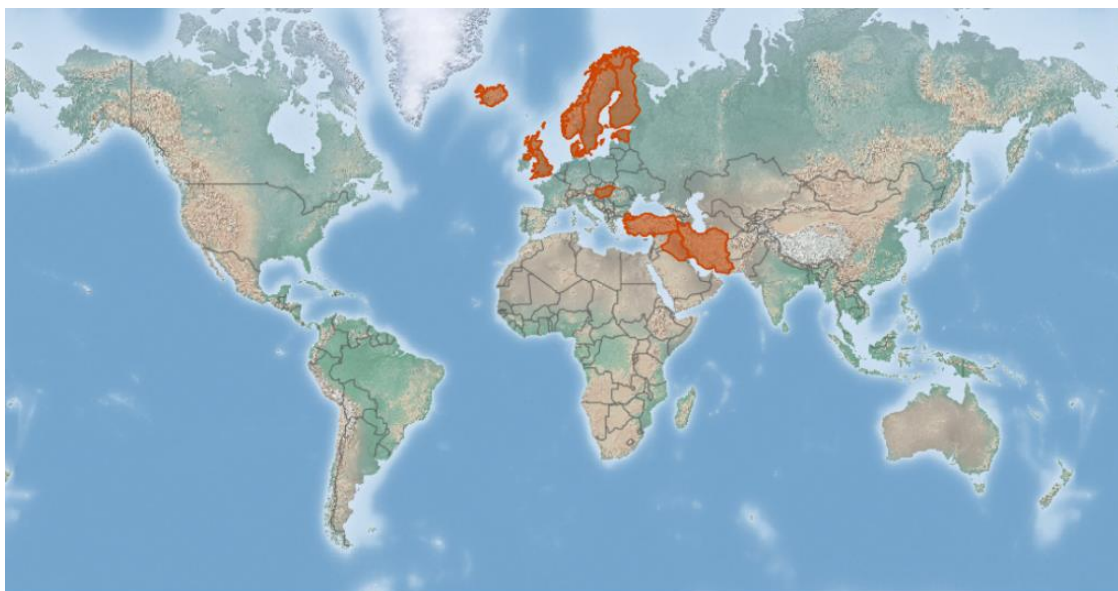
گیاه گلپر *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch., C.A.Mey. & Avé-Lall. (شکل ۱) گیاه گلدار بومی کشورهای آسیایی شامل ایران، عراق و ترکیه، عضو خانواده‌ی Apiaceae و متعلق به تیره مرکبان است (شکل ۲). این گیاه که از گذشته به عنوان ادویه و طعم دهنده‌ی غذا استفاده می‌شده است، دارای ترکیبات مختلفی مانند فورانوکومارین‌ها، هیدروکسی بوتیرات، هگزیل ایزوبوتیرات و غیره می‌باشد که خواص متعددی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی به آن بخشیده‌اند (Atefeh et al., 2010). این گیاه به طور سنتی و بومی از زمان‌های گذشته در ایران برای درمان بسیاری از عارضه‌ها مانند مشکلات تنفسی، گوارشی و تقویت حافظه به کار می‌رفته است. افراد دارای فراموشی، مشکلات حافظه و کندذهن نیز از زمان‌های گذشته به خوردن آب این میوه تشویق می‌شده‌اند (Majidi & Sadati Lamardi, 2018). بررسی‌ها مشخص کرده‌است که عصاره استونی (acetone extract) دانه‌ی گلپر تاثیر مثبتی برروی کاهش اثرات ناشی از تشنج القا شده با پنتیلن ترازول و یا شوک الکتریکی حاداکثری، داشته است (Sayyah et al., 2005).

گیاه سیاهدانه *Nigella sativa* L. (شکل ۳) از تیره Ranunculaceae گیاهی سرشار از ترکیبات کینون و پلی‌فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که فعالیت اثرگذاری در رابطه با جلوگیری از تجمعات پروتئینی از خود نشان داده است (Khan et al., 2015). این گیاه به عنوان گیاه دارویی جادویی از زمان‌های گذشته کاربردهای زیادی داشته‌است. این گیاه به طور خودرو در جنوب اروپا، شمال آفریقا و جنوب غرب آسیا رشد می‌کند و در برخی کشورهای دیگر مانند کشورهای خاورمیانه‌ای کشت داده شده‌است (Ahmad et al., 2013)، (شکل ۴). در این مقاله تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه گلپر و گیاه سیاهدانه به منظور مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین مورد مطالعه قرار گرفته است.



شکل ۱- گیاه گلپر (گیاه کامل، میوه) (UK: CAB International. www.cabi.org/isc)

Figure 1. *Heracleum persicum* (whole plant, fruit)



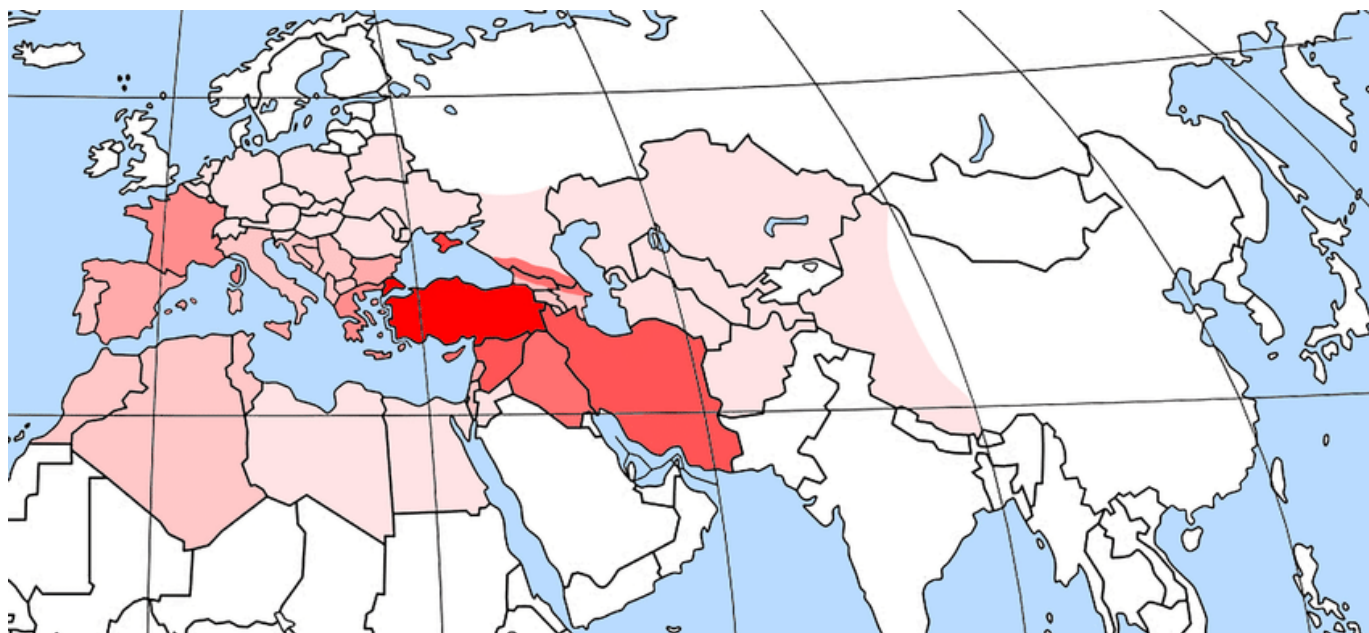
شکل ۲- پراکنش گیاه گلپر (UK: CAB International. www.cabi.org/isc)

Figure 2. *H. persicum* distribution



شکل ۳- سیاه دانه (گیاه کامل، گل، دانه) (<http://bioweb.uwlax.edu>)

Figure 3. *N. sativa* (Whole plant, flower, seed)



شکل ۴- پراکنش گیاه سیاهدانه (Heiss et al., 2013).

Figure 4. *Nigella sativa* L. distribution

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی محلول‌ها، بافر و پروتئین

پروتئین انسولین نو ترکیب انسانی از شرکت سیگما خریداری شد. تمام مواد لازم این تحقیق مانند نمک‌های سدیم دی‌هیدروکسی فسفات، دی‌سدیم هیدروکسی فسفات، هیدروکلریدریک اسید و هیدروکسید سدیم از شرکت سیگما خریداری شدند. تمام نمونه‌ها در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار ساخته شدند. تمام داده‌های ارائه شده حاصل سه بار تکرار بوده و نمودارها و تصاویر به دست آمده مجموع این سه تکرار می‌باشند. برای تهیه بافر فسفات از نمک‌های سدیم دی‌هیدروکسی فسفات و دی‌سدیم هیدروکسی فسفات استفاده شد، به این صورت که غلظت مورد نظر جهت تهیه بافر مشخص شده و طی محاسبات استوکیومتری میزان گرم مورد نیاز از نمک اسیدی و بازی در حجم مورد نظر با یکدیگر مخلوط شدند

تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی

پودر میوه گیاه گلپر و دانه‌ی گیاه سیاهدانه (تبدیل به پودر توسط دستگاه آسیاب خانگی) به صورت محلی از عطاری بزرگ تجریش، شهر تهران خریداری شد. میزان ۱۰۰ گرم از هر گیاه در ۴۹۰ میلی‌لیتر الکل اتانول خیسانده شده و برای ۷۲ ساعت در دستگاه شیکر تحت دمای ۳۷ درجه شیک شد. سپس نمونه‌های شیک شده به منظور جداسازی محلول الکلی از پودرهای باقی‌مانده، از کاغذ صافی عبور داده شدند. محلول‌های الکلی به دست آمده برای خارج‌سازی الکل و تهیه‌ی عصاره از آن‌ها وارد دستگاه تقطیر دوار (روتاری) شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و تحت تاثیر پمپ خلاء تغلیظ شدند. عصاره‌های به دست آمده در نهایت توسط بافر رقیق شده و در غلظت‌های مختلف (غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شدند (Atefeh et al., 2010).

آماده‌سازی نمونه‌ی فیبریل پروتئینی

نمونه‌ی انسولین نو ترکیب انسانی طبق قانون بیر-لامبرت تعیین غلظت شد (طول موج = ۲۸۰ نانومتر و ضریب جذب مولی انسولین = ۱/۰۶۷۵). غلظت مورد نظر از نمونه‌ی انسولین (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از بافر فسفات تهیه شد. به منظور ایجاد فیبریل انسولین، pH نمونه‌ی انسولین تهیه شده در غلظت مورد نظر، توسط HCl به ۵/۴ رسید و نمونه‌ی تنظیم pH شده، برای مدت ۵ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گرمادهی (انکوبه) شد (Gancar et al., 2020).

فلورسانس اسپکتوفتومتری تیوفلاوین تی

برای سنجش تشکیل و یا عدم تشکیل ساختار آمیلوئیدی در پروتئین انسولین روش فلورسانس- تیوفلاوین تی مورد استفاده قرار گرفت. محلول ۵ میلی‌مولار تیوفلاوین تی تهیه شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌مولار تیوفلاوین تی به ۲ میلی‌لیتر از محلول انسولین اضافه شد و سپس میزان نشر توسط دستگاه فلورسانس اسپکترومتری (Shimadzu RFg000) مورد سنجش قرار گرفت. افزایش میزان نشر فلورسانس ترکیب تیوفلاوین تی به معنی تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی و قرار گرفتن این ترکیب در این ساختارها

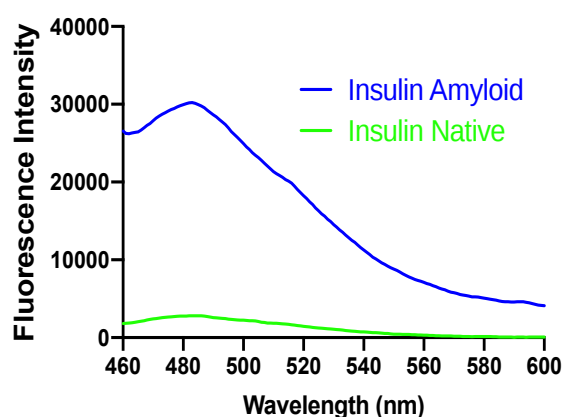
در نظر گرفته شد (تنظیمات دستگاه شامل، طول موج تهیج ثابت = ۴۴۰ نانومتر، شکاف نشر = ۵ نانومتر، شکاف تهیج = ۲/۵ نانومتر بود) (Merlini et al., 2001).

بررسی تشکیل فیبریل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نمونه‌های فیبریل شده‌ی انسولین به تنهایی، و انسولین همراه با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی الکلی گلپر و سیاهدانه، بر روی ورق آلومینیومی قطره گذاری شده و سپس با پودر طلا پوشش داده شدند. این نمونه‌ها سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با مشخصات (TESCAN VEGA3) تصویر برداری شدند (Ghadami et al., 2021).

نتایج و بحث

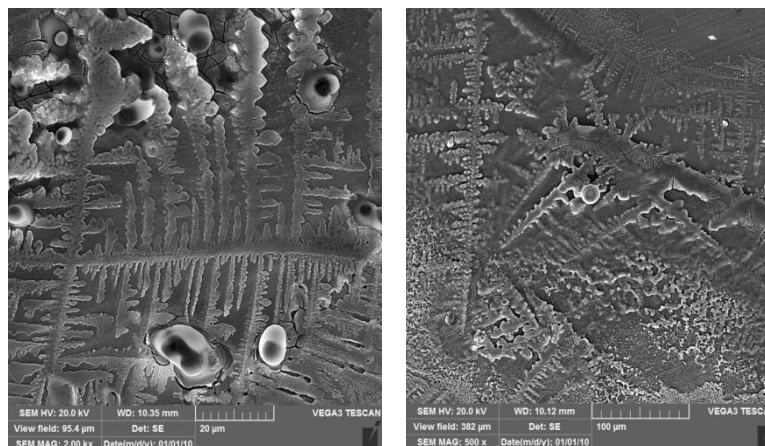
گیاهان از زمان‌های گذشته منابع اصلی ترکیبات دارویی به شمار می‌رفته‌اند، از آنجا که بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی، بیماری‌های وابسته به سن بوده و افراد مبتلا به این بیماری‌ها افراد مسن با مصرف تعداد زیاد و متنوعی از داروهای شیمیایی هستند امید است که به کمک پزشکی سنتی و جایگزینی برخی از داروهای شیمیایی با مواد گیاهی و طبیعی از اثرات سوء مصرف همزمان چندین دارو در سنین بالا جلوگیری کرد. در این پژوهش فرم آمیلوئیدی پروتئین نو ترکیب انسانی انسولین تحت شرایط در شیشه (دما = ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان = ۵ ساعت، pH = ۵/۴) در آزمایشگاه تهیه شد. نمونه‌ی آمیلوئیدی ایجاد شده توسط نشانگر تیوفلاوین تی (ThT) و به کمک دستگاه اسپکتوفتومتری فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، زمانی که ترکیب ThT به عنوان شناساگر داخل ساختار آمیلوئیدی قرار می‌گیرد نسبت به حالت پروتئین در ساختار طبیعی و ThT به حالت تنها، افزایش نشر مشاهده می‌شود که این افزایش در واقع نشان دهنده‌ی تشکیل فرم آمیلوئیدی انسولین است.



شکل ۵- بررسی نشر تیوفلاوین تی پروتئین انسولین در حالت طبیعی و حالت آمیلوئیدی

Figure 5. Thioflavin T emission of native and amyloid forms of Insulin

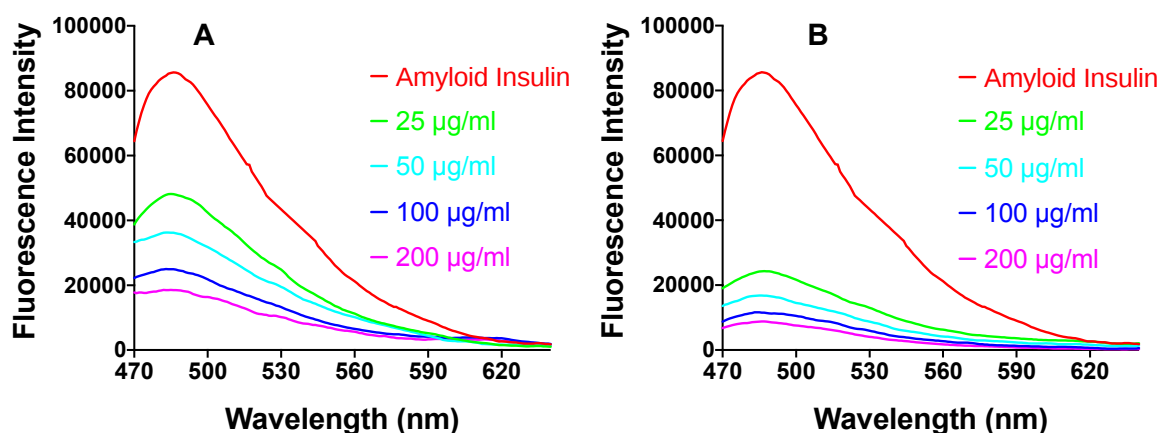
در ادامه برای مشاهده فیبریل آمیلوئیدی تشکیل شده از پروتئین انسولین در شرایط مشخص شده، نمونه‌ی انسولینی با $\text{pH}=5/4$ پس از ۵ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتیگراد بر روی ورقه‌ی آلومینیومی قطره گذاری شده و پس از پوشش با پودر طلا توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره برای بررسی تشکیل فیبریل مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶).



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره فیبریل انسولین در شرایط در شیشه ($\text{pH}=5.4$, $\text{Temp}=60^\circ\text{C}$, $\text{Time}=5\text{ h}$)

Figure 6. SEM images of insulin fibrils (in vitro)

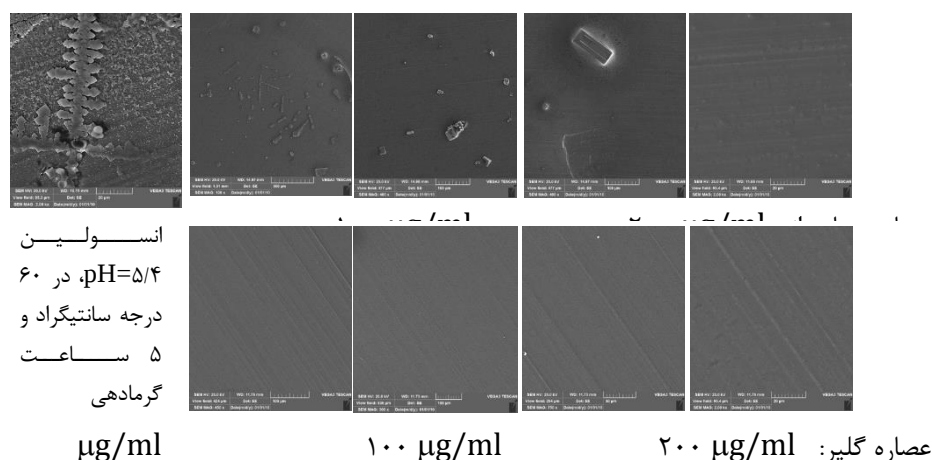
برای بررسی اثر ضد آمیلوئیدی عصاره گیاهان سیاهدانه و گلپر، نمونه‌ی انسولینی تهیه شده (در شرایط pH و دمای مطرح شده) در معرض غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ی این دو گیاه (غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفت و برای بررسی تشکیل و یا عدم تشکیل فیبریل انسولین تحت غلظت‌های مختلف عصاره، نمونه‌ها توسط اسپکتوفتومتری فلورسانس-تیوفلاوین تی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که در مورد عصاره‌ی گیاه سیاهدانه اثر ضد آمیلوئیدی وابسته به غلظت در مورد پروتئین انسولین مشاهده می‌شود. به این صورت که با افزایش میزان غلظت عصاره الکلی سیاهدانه میزان شدت فلورسانس کاهش پیدا می‌کند که نشان دهنده کاهش تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین انسولین است که این مشاهدات از لحاظ تاثیر مثبت عصاره سیاهدانه بر تجمعات آمیلوئیدی انسولین نتایج کار (Khan et al., 2015) را تایید می‌کند، ولی در رابطه با تاثیر میزان موثر غلظت، اندکی تفاوت وجود دارد به این صورت که در مطالعات khan و همکاران از میزان غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به میزان‌های بالاتر، تاثیر ضدتجمعی ثابت بوده و تفاوت چشمگیری مشاهده نشده‌است و این نتایج با نتایج شرح داده شده در این پژوهش متفاوت است (شکل ۷). در مورد عصاره‌ی گلپر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر نسبتاً یکسانی را نشان داده و باعث عدم تشکیل آمیلوئید شد (شکل ۷). به نظر می‌رسد که این نتایج نشان می‌دهند، در غلظت‌های یکسان از عصاره‌های الکلی گیاهان مورد نظر، گیاه گلپر اثرات مهاری قوی‌تری را نشان می‌دهد. البته برای نتیجه‌گیری قطعی نیاز به مطالعات آماری دقیق‌تری است.



شکل ۷- بررسی نشر تیوفلاوین تی پروتئین انسولین در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیاهدانه (A)، بررسی نشر تیوفلاوین تی پروتئین انسولین در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گلپر (B)

Figure 7. Thioflavin T emission of insulin protein in different concentration of *N. sativa* alcoholic extract (A), Thioflavin T emission of insulin protein in different concentration of *H. persicum* alcoholic extract (B)

برای بررسی دقیق‌تر تاثیر عصاره گلپر و سیاهدانه بر تشکیل آمیلوئید، غلظت‌های تاثیر گذار این عصاره‌ها به همراه انسولین pH=۵/۴ و پس از طی ۵ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی ورق آلومینیومی قطره گذاری، با پودر طلا پوشش داده شد و سپس توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت‌های مشخصی از عصاره گیاهان سیاهدانه و گلپر از تشکیل آمیلوئید جلوگیری کردند (شکل ۸). نتایج میکروسکوپ الکترونی با نتایج مربوط به تیوفلاوین تی هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد که گیاه گلپر اثرات مهاری قوی‌تری برای جلوگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی نسبت به گیاه سیاهدانه دارد. همان‌طور که در شکل ۸ دیده می‌شود در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر گیاه سیاهدانه فیبریل‌های انسولین دیده می‌شود ولی در همان غلظت در عصاره الکلی گیاه گلپر فیبریلی مشاهده نگردید. در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هر دو گیاه در نمونه‌های پروتئینی فیبریلی دیده نشد.



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره پروتئین انسولین در غلظت های مختلف از عصاره های گلپر و سیاهدانه
Figure 8. SEM images of insulin protein in different concentration of *H. persicum* and *N. sativa*

تجمع آمیلوئیدی عارضه ای گسترده و به همان میزان ناشناخته است، وابستگی بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های تخریب کننده سیستم عصبی شامل آلزایمر، پارکینسون و غیره به تجمعات آمیلوئیدی مشخص شده است. پروتئین های فراوانی در صنعت به عنوان مکمل و یا دارو تحت شرایط گوناگون ساخته می شوند، از این میان می توان به پروتئین انسولین اشاره کرد که در درمان بیماری دیابت کاربرد دارد. گزارش های مختلفی از حضور تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین در محل تزریق این دارو گزارش شده است که اهمیت پرداختن به موضوع آمیلوئیدی شدن در صنعت تولید دارو و مواد مکمل پروتئینی را نشان می دهد (Gancar et al., 2020). تا به حال ترکیبات و مواد زیادی از نظر خاصیت موثر در جلوگیری از تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفته اند، امید است با بررسی ترکیبات مختلف تاثیرگذار، بهترین ترکیبات با بالاترین سطح اثرگذاری و کمترین عوارض جانبی شناخته شوند. در این پژوهش، گیاه گلپر گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا در کنار گیاه سیاهدانه به عنوان گیاه دارویی شناخته شده، به منظور بررسی اثرات ضد آمیلوئیدی آن ها مورد بررسی قرار گرفتند. عصاره ای الکلی گیاه گلپر و سیاهدانه در غلظت های مناسب اثرات مهاری بر تجمع انسولین نشان داده و ارزش مطالعات و پژوهش های بیشتر را دارد.

منابع

- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., . . . Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337-352. doi:https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1

- Atefeh, H., Azamia, M., & Abdolhamid-Angaj, S. (2010). Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5(3), 174-176 .
- Ciccone, L., Tonali, N., Nencetti, S., & Orlandini, E. (۲۰۲۰). Natural compounds as inhibitors of transthyretin amyloidosis and neuroprotective agents: analysis of structural data for future drug design. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1145-1162. doi:10.1080/14756366.2020.1760262
- Durães ,F., Pinto, M., & Sousa, E. (2018). Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 44 .
- Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1350 . ۱۳۵۸-doi:10.1038/s41593-018-0221-2
- Gancar, M., Kurin, E., Bednarikova, Z., Marek, J., Mucaji, P., Nagy, M., & Gazova, Z. (2020). Amyloid Aggregation of Insulin: An Interaction Study of Green Tea Constituents. *Scientific Reports*, 10(1), 9115. doi:10.1038/s41598-020-66033-6
- Ghadami, S. A., Ahmadi, Z., & Moosavi-Nejad, Z. (2021). The albumin-based nanoparticle formation in relation to protein aggregation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 252, 119489. doi:10.1016/j.saa.2021.119489
- Heiss, A., Stika ,H.-P., Zorzi, N., & Jursa, M. (2013). *Nigella* in the Mirror of Time: A Brief Attempt to Draw a Genus' Ethnohistorical Portrait (pp. 147–169).
- Iannuzzi, C., Borriello, M., Portaccio, M., Irace, G., & Sirangelo, I. (2017). Insights into Insulin Fibril Assembly at Physiological and Acidic pH and Related Amyloid Intrinsic Fluorescence. *Int J Mol Sci*, 18(12), 2551 .
- Jamshidi, A. H., Eghbalian, F., Mahroozade, S., Mohammadi Kenari, H., Ghobadi, A., & Yousefsani, B. S. (2020). Recommended natural products in Alzheimer's disease based on traditional Persian medicine. *Journal of Medicinal Plants*, 19(75), 17-29. doi:10.29252/jmp.19.75.17
- Khan, M. S., Tabrez, S., Rabbani, N., Oves, M., Shah, A., Alsenaidy, M. A., & Al-Senaidy, A. M. (2015). Physico-chemical stress induced amyloid formation in insulin: Amyloid characterization, cytotoxicity analysis against human neuroblastoma cell lines and its prevention using black seeds (*Nigella sativa*). *Chin J Integr Med*. doi:10.1007/s11655-015-2153-y
- Lee, S., Choi, M. C., Al Adem, K., Lukman, S., & Kim, T.-Y. (2020). Aggregation and Cellular Toxicity of Pathogenic or Non-pathogenic Proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 5120. doi:10.1038/s41598-020-62062-3
- Majidi, Z., & Sadati Lamardi, S. N. (2018). Phytochemistry and biological activities of *Heracleum persicum*: a review. *J Integr Med*, 16(4), 223-235. doi:10.1016/j.joim.2018.05.004
- Merlini, G., Bellotti, V., Andreola, A., Palladini, G., Obici, L., Casarini, S., & Perfetti, V. (2001). Protein aggregation. *Clin Chem Lab Med*, 39 . ۱۰۶۵-۱۰۷۵ ,(۱۱)doi:10.1515/cclm.2001.172
- Picken, M. M. (2020). The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematologica*, 143(4), 322-334. doi:10.1159/000506696
- Prusiner, S. B. (2001). Neurodegenerative Diseases and Prions. *New England Journal of Medicine*, 344(20), 1516-1526. doi:10.1056/nejm200105173442006
- Sayyah, M., Moaied, S., & Kamalinejad, M. (2005). Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. *J Ethnopharmacol*, 98(1-2), 209-211. doi:10.1016/j.jep.2004.12.026
- Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1332-1340. doi:10.1038/s41593-018-0235-9
- Thompson, A. J., & Barrow, C. J. (2002). Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and Prion diseases. *Curr Med Chem*, 9(19), 1751-1762. doi:10.2174/0929867023369123
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, 14, 5541-5554. doi:10.2147/IJN.S200490

Effects of *Heracleum persicum* and *Nigella sativa* L. alcoholic extracts on insulin amyloid formation

K.Ahadi Amandi,¹ S. A. Ghadami^{2*}

Received:2020.7.5

Accepted:2020.8.17

Abstract

Introduction: Discovering and describing the critical role of proteins in contrast to disease and defects causing by their inactivity is a major interest for scientific studies. Amyloid aggregation and the diseases caused by them, known as neurodegenerative diseases, reveal new aspect of proteins roles in pathogenicity. Due to lack of clear treatment to these age-related diseases, prevention of amyloid formation would be the most practical way to deal with them.

Methods: In this research, we analyzed the effects of *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch., C.A.Mey. & Avé-Lall. and *Nigella sativa* L. alcoholic extracts on insulin amyloid formation. Human insulin (HI) amyloid formation was analyzed under specific pH and temperature conditions by Thioflavin T (ThT) assay and scanning electron microscopy (SEM) while treating with different concentrations of *H. persicum* and *N. sativa* alcoholic extracts.

Result and discussions: Our results reveal that the alcoholic extracts of *H. persicum* and *N. sativa* have significant preventing effects on HI amyloid formation. Considering the long history of these medicinal plant usage in Iranian and Islamic cultures and the presence of antioxidant and anticonvulsant compounds in them, and according to the data obtained from this study, we strongly suggest that these two herbs are suitable candidates as sources of amyloid aggregation prevention compounds.

Key words: Age-related diseases, Alzheimer's disease, Amyloid fibrils, Neurodegenerative diseases, *Heracleum persicum*, *Nigella sativa* L.

¹MSc student of biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran;

*Corresponding Author's: a.ghadami@alzahra.ac.ir

بررسی میزان تجمع و تحمل نیکل توسط گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) در شرایط کشت هیدروپونیک

ثریا امیر احمدی،^۱طهماسب آسمانه*،^۲آطهر السادات جوانمرد^۳

چکیده

نیکل یک عنصر ضروری برای گیاهان است ولی در غلظت‌های بالا، دارای اثرات سمی است. شبدر سفید، یک گیاه علوفه‌ای زراعی و دارای زیست‌توده‌ی بالایی است. از طرفی دیگر، آلاینده‌ی نیکل در مزارع افزایش یافته است. بر این اساس، در این پژوهش، در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی، اثر تیمار سطوح مختلف نیکل بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید در اتاقک رشد و سپس بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک این گیاه در محیط کشت هیدروپونیک، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه، در حضور سطوح پایین و بالای تیمار نیکل، به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کرد. در شرایط کشت هیدروپونیک نیز، سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل، منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، اثر منفی بر شاخص‌های بیوشیمیایی از جمله مقدار کلروفیل، کربوهیدرات، پروتئین محلول کل و آنزیم پراکسیداز و اثر مثبت بر مقدار محتوای کاروتنوئیدها داشت. با افزایش غلظت تیمار نیکل، غلظت آن در ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. غلظت ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش و کاهش وزن خشک ساقه و طول اندام هوایی، وزن خشک و سطح برگ نسبت به شاهد گردید. با توجه به نتایج حاصل، به نظر می‌رسد غلظت ۱۰ میکرومولار نیکل برای رشد گیاه مناسب باشد، درحالی‌که سطح ۵۰ میکرومولار آن، برای گیاه سمی بود. همچنین به نظر می‌رسد که شبدر سفید، گیاهی حساس به نیکل بوده و توانایی تحمل و تجمع نیکل را ندارد و گزینه مناسبی برای اهداف گیاه‌پالایی نیست.

واژه‌های کلیدی: انباشت نیکل، تنش فلزات سنگین، شبدر سفید، گیاه‌پالایی.

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

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران *نویسنده مسئول: asemaneh@yu.ac.ir

مقدمه

فلزات سنگین گروهی از عناصر شیمیایی فلزی هستند که دارای چگالی، وزن اتمی و عدد اتمی نسبتاً بالا می‌باشند. فلزات سنگین، از منابع طبیعی منشا می‌گیرند و همچنین حاصل فعالیت‌های انسانی مانند صنایع نفت و گاز، استفاده از کودهای فسفات در کشاورزی، لجن فاضلاب، استخراج معادن فلزی، استفاده از آفت‌کش‌ها و سوزاندن سوخت‌های فسیلی است (Yan et al., 2020). فلزات سنگین توسط فرایندهای زیستی یا فیزیکی قابل تجزیه نیستند و به مدت طولانی در خاک باقی می‌مانند که منجر به تهدید طولانی مدت محیط زیست می‌گردند (Suman et al., 2018). روش‌های پالایش متنوعی در مورد خاک‌های آلوده به فلزات سنگین ایجاد شده است که عمدتاً مبتنی بر روش‌های مکانیکی یا فیزیکوشیمیایی هستند، مانند خاکبرداری و دفن، شستن خاک. این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند هزینه بالا، عدم کارایی برای آلودگی‌های با غلظت پایین، تغییرات برگشت‌ناپذیر ویژگی‌های زیستی و فیزیکوشیمیایی خاک و ایجاد آلودگی‌های ثانویه هستند. گیاه‌پالایی روشی است که از گیاهان برای استخراج و حذف آلودگی‌های عناصر شیمیایی یا کاهش دسترسی زیستی به آنها در خاک استفاده می‌کند. گیاهان توسط سیستم ریشه خود توانایی جذب ترکیبات یونی موجود در خاک حتی در غلظت‌های پایین را دارند. بنابراین خاک آلوده را اصلاح کرده و منجر به پایداری حاصلخیزی خاک می‌شوند (DalCorso et al., 2019).

نیکل در غلظت‌های پایین (0.05-10 mg/kg dry weight) یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاه است (Nieminen et al., 2007)، ولی در غلظت‌های بالا برای گیاهان سمی است. نیکل به عنوان کوفاکتور آنزیم اوره‌آز عمل می‌کند. این آنزیم به نوبه‌ی خود در سوخت و ساز ترکیبات نیتروژن‌دار مؤثر است، بنابراین در فرآیندهای حیاتی مهم از جمله جوانه‌زنی و تشکیل میوه نقش دارد (Gheibi et al., 2009). با این حال، مقدار بیش از حد نیکل در گیاه نسبت به کمبود آن معمول‌تر است (Alloway, 1995). مقدار بیش از حد نیکل اثرات زیانباری برای گیاه دارد، شاخص‌های جوانه زنی (Rao & Sresty 2000)، رشد گیاه (Molas, 2002)، جذب مواد غذایی (Aggarwal et al, 1990)، فتوسنتز و تنفس (Rahman et al, 2005) را کاهش می‌دهد و منجر به کلروز و نکروز برگ می‌شود (Gajewska et al., 2006). مقدار مازاد بر نیاز نیکل منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. گیاهانی که بتوانند پاسخ آنتی‌اکسیدانی مؤثر به تنش نیکل ارائه دهند، می‌توانند نیکل را تحمل کنند. البته این میزان تحمل بسته به نوع گونه، رقم و واریته‌ی گیاهی متفاوت است (Aschmann & Zasoski, 1987). برخی از گیاهان مانند جنس *Allysum* (خانواده Brassicaceae) و جنس *Phyllanthus* (خانواده Euphorbiaceae) به عنوان انباشت‌گر این عنصر معرفی شده‌اند (Brooks et al., 1979; Bouman et al., 2018).

شبدر سفید یکی از گیاهان علوفه‌ای چندساله متعلق به تیره باقلا و دارای زیست‌توده بالا است (عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴). جنس شبدر (*Trifolium*)، از مهم‌ترین گیاهانی است که در کشور ایران مصرف علوفه‌ای دارد. از آنجایی که احتمال آلاینده‌ی نیکل در مزارع وجود داشته و همچنین یونجه، از دیگر گیاهان این تیره، توانایی تجمع نیکل و مقاومت به آن را نشان داده است (امیرجانی، ۱۳۹۱)، به نظر می‌رسد شبدر سفید پتانسیل گیاه‌پالایی و تجمع نیکل را داشته باشد. بر این اساس و به منظور بررسی پتانسیل گیاه‌پالایی نیکل توسط این گونه، در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر شاخص‌های رشد این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جوانه زنی

بذرهای سالم تهیه شده از مرکز رسمی فروش بذر سبزینه آذر، پس از ضدعفونی شدن توسط هیپوکلریت سدیم و شستشو با آب مقطر در پتری دیش های ۹ سانتی متری (هر پتری دیش، ۵۰ بذر) قرار داده شده و تحت تیمار سولفات نیکل (NiSO_4) با غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. پتری دیش ها در اتاقک کشت، در شرایط محیطی رطوبت نزدیک به ۹۰ درصد، تناوب نوری (۸ ساعت نور و ۱۶ ساعت تاریکی) و دمای ۱۸ درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. تعداد بذرهای جوانه زده به صورت روزانه مورد شمارش قرار گرفت و درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی و شاخص بنیه ی بذر طبق روابط زیر محاسبه شد.

$$G=(n/N)\times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

G: درصد جوانه زنی، n: تعداد نهایی بذرهای جوانه زده، N: تعداد بذرهای کشت شده (شهبازی و محقق دوست، ۱۳۷۵).

$$G.R=\sum Ni/Ti \quad \text{رابطه ۲}$$

G.R: سرعت جوانه زنی، Ni: تعداد بذور جوانه زده در روزهای شمارش، Ti: تعداد روزهای پس از انجام آزمایش (سوهانی، ۱۳۸۹).

$$\text{رابطه ۳} \quad 100/(\text{درصد جوانه زنی} \times \text{میانگین طول گیاهچه (mm)}) = \text{شاخص بنیه ی بذر}$$

(Abdul-baki & Anderson, 1973)

در پایان آزمایش، طول ساقه چه، ریشه چه و وزن تر اندازه گیری شد. تمام مراحل آزمایشگاهی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت.

تهیه گیاهچه و اعمال تیمار نیکل

جهت تهیه گیاهچه های شبدر سفید، بذرهای گیاه در گلدان های حاوی شن ضدعفونی شده و عاری از مواد آلی کشت شده و تا زمان سبز شدن با آب مقطر و پس از آن به مدت دو هفته با محلول هوگلند (Parker & Norvell, 1999)، آبیاری شدند. سپس گیاهچه ها به محیط کشت هیدروپونیک منتقل شده و پس از دو هفته تحت تیمار سولفات نیکل با غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل چهار گیاه بود و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی اجرا شد. گلدان ها، در اتاق کشت در دمای متناوب ۱۸ درجه سانتی گراد برای شب و ۲۲ درجه سانتی گراد برای روز نگهداری و اسیدیته محلول غذایی هوگلند در حدود 6 ± 0.2 ثابت نگه داشته شد. محلول غذایی در طول هفته، دو مرتبه تعویض گردید. گیاهان چهار هفته پس از اعمال تیمار برداشت شده و شاخص های رشد و فیزیولوژیک مورد سنجش قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص های رشد

چهار هفته بعد از اعمال تیمار، ساقه ها و ریشه ها از محل یقه جدا شدند، طول و وزن تر و خشک آن ها با استفاده از ترازوی دیجیتال مدل Te313s با دقت ۰/۰۰۱ گرم، اندازه گیری شد. برای محاسبه ی سطح برگ، سه برگ تصادفی از هر گلدان استفاده شد، مطابق روش مهدویان و همکاران (۱۳۸۵).

رنگیزه های فتوسنتزی

برای سنجش رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) از روش لیچن تالر استفاده شد (Lichtenthaler, 1987). برای انجام این سنجش ۰/۱ گرم از برگ های تازه، با ۷ میلی لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی سائیده شده و پس از عبور از کاغذ صافی، جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت رنگیزه ها از روابط زیر استفاده گردید.

$$\text{Chl a} = (12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}) \quad \text{رابطه ۴}$$

$$\text{Chl b} = (21.21 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}) \quad \text{رابطه ۵}$$

$$\text{Total Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad \text{رابطه ۶}$$

$$\text{Car} = (1000A_{470} - 1.8 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b}) / 198 \quad \text{رابطه ۷}$$

در این رابطه ها؛ Chl a، Chl b، Chl T، Car، به ترتیب غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، غلظت کلروفیل کل و غلظت کاروتنوئید است. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار رنگیزه های فتوسنتزی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

سنجش آنتوسیانین های برگ

جهت سنجش مقدار آنتوسیانین از روش واگنر استفاده شد (Wagner, 1979). برای این منظور ۰/۰۵ گرم از برگ های گیاه شبدر سفید با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی سائیده شد. عصاره به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) گردید و میزان جذب محلول روشنر در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت از ضریب خاموشی $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ استفاده گردید و نتایج بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه شد.

$$A = \epsilon bc \quad \text{رابطه ۸}$$

A: جذب نوری، ϵ : ضریب خاموشی، b: عرض کووت (cm)، C: غلظت نمونه (M)

سنجش مقدار پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز

مقدار پروتئین محلول کل با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) مورد سنجش قرار گرفت. برای تهیه ی عصاره، مقدار ۰/۰۵ گرم از برگ های تازه ساییده شده در ازت مایع با ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس فسفات مونیو بازی سرد (۰/۱ مولار، pH برابر با

۶/۸) مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه ورتکس در دمای اتاق، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد و نیروی g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. از این روشناور برای سنجش مقدار پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور حاصل با ۴۹۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط و پس از مدت ۲۰ دقیقه نگهداری بر روی دستگاه شیکر در دمای اتاق، جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مخلوط آنزیمی حاوی ۲۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات منو بازی (۰/۱ مولار، pH برابر با ۶/۸)، ۵۰ میکرولیتر پیروگالول (۲۰ میلی مولار)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) تهیه شده و جذب آن دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ نانومتر و بعد از گذشت یک، دو و پنج دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ۲/۴۷ محاسبه شد (قادری فر و همکاران، ۱۳۹۳). هر واحد فعالیت آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول سوبسترای واکنش را در مدت زمان یک دقیقه مصرف می کند.

سنجش کربوهیدرات های محلول اندام هوایی

جهت سنجش غلظت کربوهیدرات های محلول نمونه ها، ۰/۱ گرم از هر نمونه خشک با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شده و به مدت هفت روز در تاریکی نگهداری شد. یک میلی لیتر از محلول روشناور با یک میلی لیتر آب مقطر، یک میلی لیتر فنول پنج درصد (w/v) و پنج میلی لیتر اسیدسولفوریک مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری گردید. سپس میزان جذب نوری محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه گیری شد. جهت محاسبه غلظت کربوهیدرات کل، از نمودار استاندارد گلوکز استفاده گردید (Kennedy & Chapin, 1994).

اندازه گیری غلظت عناصر

پس از آماده سازی نمونه های ریشه و اندام هوایی گیاهان، غلظت عناصر نیکل، آهن، روی و مس با استفاده از دستگاه طیف-سنج جذب اتمی مدل (HITACHI-7JO-8324) تعیین گردید. برای آماده سازی نمونه ها، ۰/۱ گرم نمونه خشک با دو میلی لیتر نیتریک اسید ۶۰ درصد (v/v) مخلوط شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت، در حمام بخار آب با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد (به مدت دو ساعت) نگهداری شد. نمونه ها سرد شده و یک میلی لیتر پراکسید هیدروژن به آنها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بخار آب با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. حجم نمونه ها پس از سرد شدن با استفاده از آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد (Zhong et al., 2016).

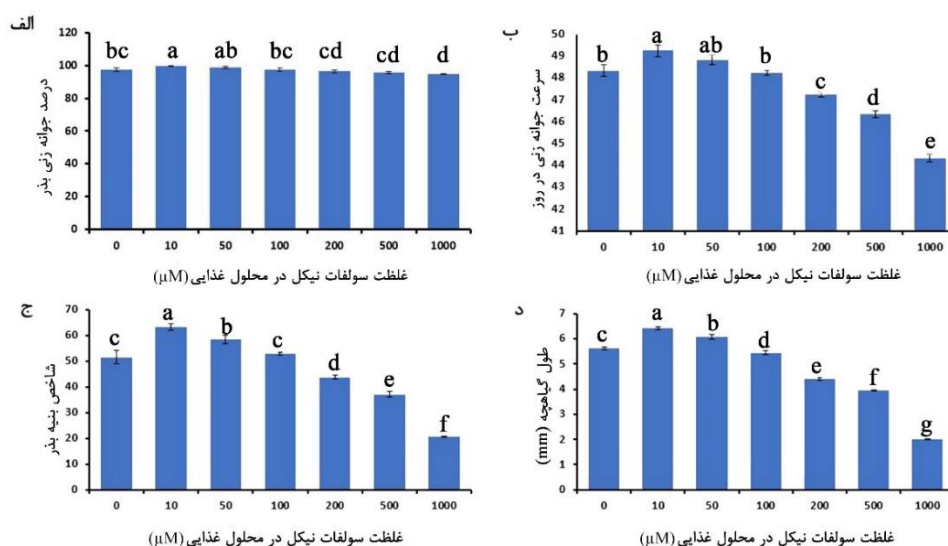
تجزیه و تحلیل داده‌ها

در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها (آنالیز واریانس one-way ANOVA) با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. p -value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بررسی شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید تحت تیمار نیکل

تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نیکل بر شاخص‌های جوانه‌زنی شبدر سفید، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه و طول گیاهچه در سطح احتمال یک درصد است. بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر درصد و سرعت جوانه‌زنی نشان داد که تاثیر غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار نیکل نسبت به سطح شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. در حالی‌که، اثر غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل بر درصد و سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد، به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌دار را نشان داد. بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر (به ترتیب ۹۹/۷ درصد و ۶۶/۵) و کمترین آن (به ترتیب ۹۴/۷ درصد و ۶۲/۹)، برای سطوح ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل به دست آمد که به ترتیب نسبت به شاهد ۲/۴ و ۲/۷۴ درصد افزایش و کاهش داشتند (شکل ۱، الف و ب).



شکل ۱- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید (*Trifolium*

repens)، (الف) درصد جوانه‌زنی بذر، (ب) سرعت جوانه‌زنی بذرها در روز، (ج) شاخص بنیه بذر و (د) طول گیاهچه (میلی‌متر). حروف

غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

اثر غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل بر شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه نسبت به شاهد، منجر به افزایش معنی‌دار گردید، در حالی‌که اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیکل بر این دو شاخص، نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و اثر غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بر این شاخص‌ها، نسبت به شاهد، به صورت معنی‌دار کاهشی بود. بیشترین شاخص بنیه بذر و طول گیاهچه (به ترتیب ۶۳/۴ و ۶/۴ میلی‌متر) و کمترین آنها (به ترتیب ۲۰/۷ و ۲ میلی‌متر) برای سطوح ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل، به دست آمد (شکل ۱، ج و د). تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش ۲۳/۳ و کاهش ۵۹/۷۵ درصدی شاخص بنیه بذر نسبت به شاهد (غلظت صفر نیکل) گردیدند، در حالی‌که بذره‌های تیمار شده با این دو غلظت عنصر نیکل به ترتیب افزایش ۱۴/۱ و کاهش ۶۴/۳۵ درصدی طول گیاهچه را نسبت به شاهد نشان دادند. به‌طور کلی، سطوح پایین و بالای نیکل به ترتیب، اثر افزایشی و کاهشی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید داشت. در مطالعه‌ای بر روی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)، با بالا رفتن غلظت فلز نیکل در محیط کشت، جوانه‌زنی بذر، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاه کاهش پیدا کرد (Peralta et al., 2001). فلزات سنگین در محیط جوانه‌زنی به علت نفوذ سریع به داخل بذر همراه با آب از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و ممانعت از تقسیم سلول‌ها، در رشد گیاهچه اختلال ایجاد می‌کنند (Márquez-García et al., 2013). علت کاهش درصد جوانه‌زنی بذر شبدر سفید می‌تواند ناشی از افزایش پتانسیل اسمزی محلول و کاهش قدرت جذب آب توسط بذر و ایجاد سمیت برای بذرها باشد (Taiz & Zeiger, 2002). سطوح بالای فلزات سنگین منجر به کاهش رشد گیاهچه می‌شود که علت این کاهش را می‌توان، کاهش مقدار و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در آندوسپرم و لپه‌ها دانست. زمانی‌که فلز سنگین مقدار و فعالیت این آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد به مقدار کافی مواد آلی مورد نیاز به گیاهچه‌ی در حال رشد نمی‌رسد و در نتیجه طول گیاهچه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kabir et al., 2008).

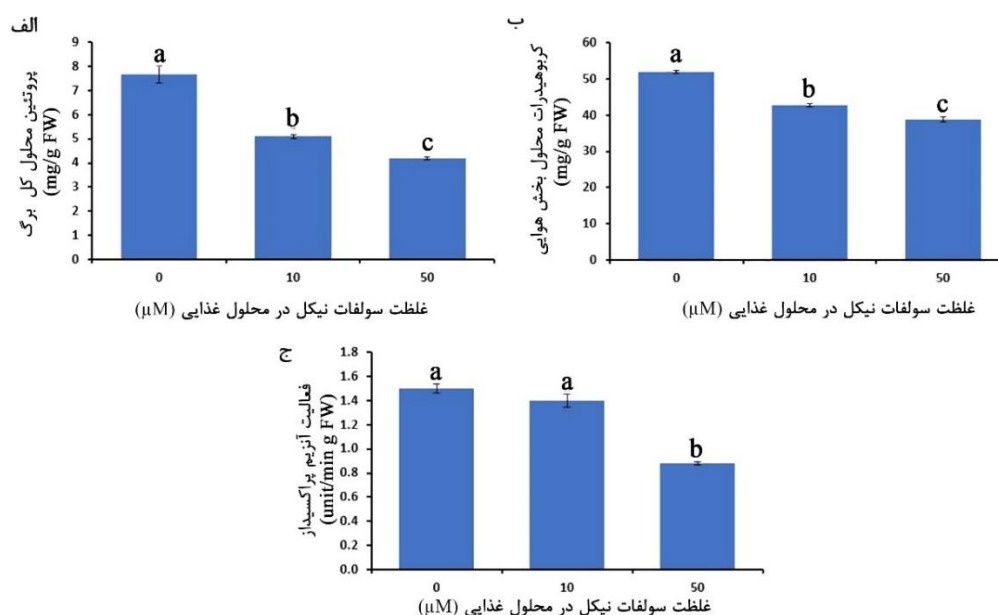
بررسی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل در محلول غذایی، منجر به کلروز، کاهش شدید رشد و در نهایت مرگ گیاهچه‌های شبدر سفید، حدود دو هفته پس از اعمال تیمار گردید. بنابراین در ادامه‌ی این پژوهش، اثرات سطوح صفر (شاهد)، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، بر شاخص‌های مورد نظر سنجش و ارزیابی شد.

همان‌طور که شکل ۲ (الف و ب) نشان می‌دهد غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، منجر به کاهش تدریجی معنی‌دار پروتئین محلول کل (به ترتیب کاهش ۱۷/۸ و ۲۵/۲۵ درصدی) و کربوهیدرات‌های بخش هوایی گیاهان (به ترتیب کاهش ۳۳/۴ و ۴۵/۲۵ درصدی) نسبت به شاهد گردید. عناصر سنگین منجر به کاهش زیست‌توده گیاه می‌شوند و این کاهش می‌تواند ناشی از کاهش و اختلال در سنتز پروتئین باشد (Manivasagaperumal et al., 2011). تحت تنش فلز سنگین رادیکال‌های اکسیژن تولید و منجر به آسیب‌های اکسیداتیو بر نوکلئیک اسیدها، چربی‌ها، پروتئین‌ها، اختلال در فرایندهای متابولیسم سلولی، فتوسنتز، تنفس و کاهش رشد می‌شوند (Mishra et al., 2006). نتایج مربوط به تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که میزان کربوهیدرات محلول و نامحلول در گیاهان رشد یافته تحت تنش فلزات سنگین، با توجه به غلظت به کار رفته از فلزات در آزمایش، می‌تواند افزایش یا کاهش یابد (John et al., 2008). چنانچه مطالعه بر روی گیاهان ذرت و سویا نشان داد که با افزایش غلظت عنصر نیکل در محیط رشد گیاه،

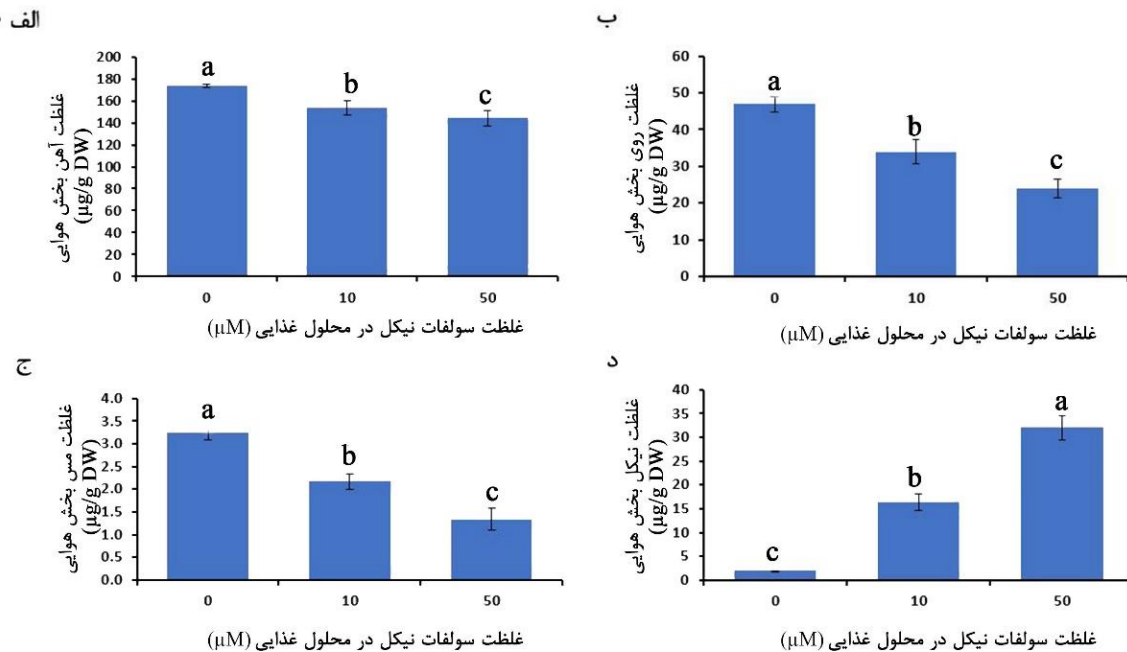
محتوای کربوهیدرات برگ دچار کاهش معنی‌دار می‌گردد که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Nie et al., 2015; Duan et al., 2020). افزایش محتوای کربوهیدرات اندام هوایی گیاه در مواردی مشاهده شده است که غلظت نیکل در حد سمیت برای گیاه بالا بوده است (Hassan et al., 2019). اگر غلظت فلزات سنگین زیاد باشد در سوخت و ساز قندها در گیاهان اختلال ایجاد می‌شود، به طور کلی مقدار قندهای کل در گیاهان حاکی از اثر سمی فلزات سنگین روی سوخت و ساز کربن است (Hattab et al., 2009). یکی از عوامل افزایش قندهای محلول (در حضور مقدار بالای نیکل) را می‌توان افزایش آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی قندهای غیرمحلول مانند انورتاز و سوکروز سنتتاز و همچنین کاهش مصرف این قندها دانست (Verma & Dubey, 2001).

تیمار سطح ۱۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی هوگلند، منجر به اختلاف معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گیاه شبدر سفید (کاهش ۶ درصدی)، نسبت به تیمار شاهد نگردید، ولی سطح ۵۰ میکرومولار نیکل بر این شاخص، اثر کاهشی (۴۰/۹ درصد نسبت به شاهد) داشت. آسیب‌های وارد شده به گیاه در پی تنش فلز سنگین به دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که در این موقعیت آنزیم‌های مختلفی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پلی‌فنول اکسیداز، پراکسیداز و اسکورات پراکسیداز وارد عمل شده و با مکانیسم‌های مختلف، این رادیکال‌ها را از بین می‌برند (Schutzendubel & Polle, 2002). برخلاف نتایج این تحقیق، در پژوهشی دیگر، مشاهده گردید که اعمال تیمار فلز سنگین بر گیاه لوبیا چیتی، موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود (امینی و بلوچی، ۱۳۹۶). بنابراین، به نظر می‌رسد این گیاه، توانایی استفاده از این پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، جهت مقاومت به نیکل را ندارد.



شکل ۲- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) پروتئین کل محلول برگ (mg/g FW)، (ب) کربوهیدرات محلول بخش هوایی (mg/g FW) و (ج) فعالیت آنزیم پراکسیداز (unit/min g FW). حروف غیرمشتک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد ($p \leq 0.05$).

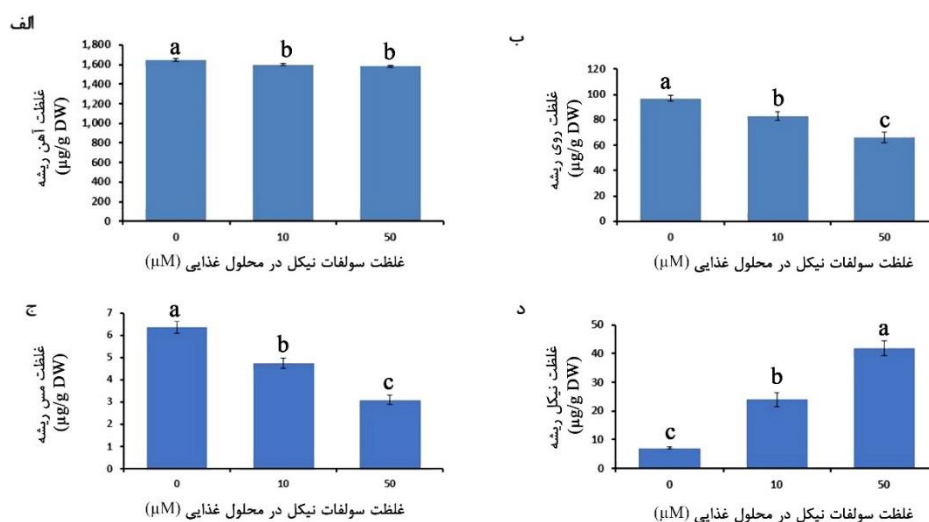
سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، بدون داشتن اختلاف معنی دار نسبت به هم دیگر، منجر به کاهش معنی دار مقدار آهن، روی و مس بخش هوایی (شکل ۳، الف، ب و ج) و ریشه‌ی (شکل ۴، الف، ب و ج) گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد گردید. درصد کاهش غلظت این عناصر در بخش هوایی گیاهان تیمار شده با سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل نسبت به شاهد، به ترتیب ۱۱/۵ و ۱۶/۷ درصد برای آهن، ۲۷/۶۶ و ۴۸/۹۴ درصد برای روی و ۳۱/۲۵ و ۶۵/۲۵ درصد برای مس و در ریشه به ترتیب، ۲/۰۳ و ۴/۴۸ درصد برای آهن، ۱۴/۴۴ و ۳۲ درصد برای روی و ۲۶/۵۷ و ۵۱/۵۷ درصد برای مس مشاهده گردید. اثر سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، با روندی مشابه، منجر به افزایش معنی دار مقدار نیکل بخش هوایی (تا حدود ۱۶ برابر) و ریشه (تا حدود ۷ برابر) در گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد گردید (شکل ۳ و ۴، د).



شکل ۳- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت آهن (μg/g DW)، (ب) غلظت روی (μg/g DW)، (ج) غلظت مس (μg/g DW) و (د) غلظت نیکل اندام هوایی (μg/g DW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

نیکل برای جذب و انتقال با دیگر مواد غذایی رقابت می‌کند و این می‌تواند غلظت بسیاری از دیگر مواد مغذی گیاه را تا سطح کمبود تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، در شرایطی که گیاه تحت تنش نیکل قرار دارد، معمولاً غلظت‌های بسیاری از مواد مغذی مانند آهن، مس، روی، منیزیم و منگنز کاهش می‌یابد (Krupa & Basznski, 1995). آهن یکی از عناصر ضروری برای گیاه است که در ساختار هموپروتئین‌ها و پروتئین‌های حاوی خوشه‌های Fe-S و سنتز کلروفیل نقش مهمی داشته و نیکل نیز عنصر ضروری بوده که در فعال‌سازی آنزیم‌های دئیدروژناز نقش دارد ولی بیش‌بود آن در هم‌ایستایی آهن دخالت می‌کند (عزیزی و قاسمی، ۱۳۸۹). گیاهان به راحتی نیکل در دسترس را جذب و به صورت عمده آن را در ریشه انباشت می‌کنند، گرچه در برخی گونه‌ها، نیکل جذب

شده به اندام هوایی گیاه نیز منتقل می‌شود (Alloway, 1995). در مطالعه حاضر، فلز نیکل به میزان بیشتری در ریشه نسبت به بخش هوایی انباشته گردید که با نتایج مطالعه‌ای که به بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر *Trigonella corniculata* L. پرداخته است، مطابقت دارد (Parida et al., 2003). مطالعات نشان داده است که نیکل با آهن در تشکیل کمپلکس با لیگاند‌هایی چون سیترات و نیکوتین‌آمین که مسئول انتقال آهن هستند، رقابت می‌کند و پویایی کمپلکس را کاهش می‌دهد (Saito et al., 2010). مشابه با نتایج این تحقیق، مطالعات نشان دادند که در حضور افزایش غلظت نیکل، جذب روی در ریشه کاهش می‌یابد (Mishra & Kar, 1974). نیکل، با عنصر روی در فرایند جذب توسط سلول‌های ریشه رقابت می‌کند (Nishida et al., 2011). علاوه بر این، نیکل دارای تحرک بالایی است و می‌تواند از برگ‌های پیرتر به برگ‌های جوان‌تر گیاه جا به جا شود (Gray & McLaren, 2006). دلیل نگهداری بیشتر نیکل در ریشه، توقف نیکل در جایگاه‌های مبادله کاتیون دیواره‌های آوند و پارانشیم آوند چوبی است (Seregin & Kozhevinkova, 2006).

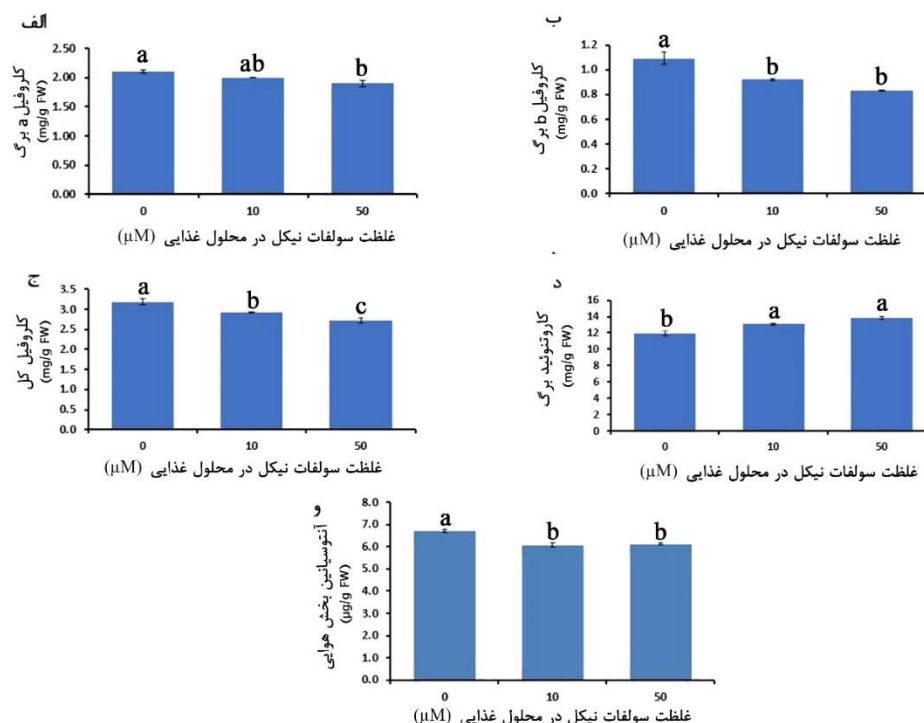


شکل ۴- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت عناصر غذایی در ریشه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت آهن (µg/g DW)، (ب) غلظت روی (µg/g DW)، (ج) غلظت منس (µg/g DW) و (د) غلظت نیکل ریشه (µg/g DW). حروف غیرمشتک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد ($p \leq 0.05$).

بررسی رنگیزه‌های گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

اثر سطح ۱۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی بر کلروفیل a نسبت به شاهد و سطح ۵۰ میکرومولار نیکل معنی‌دار نبود، ولی سطح ۵۰ میکرومولار نیکل میزان کلروفیل a را نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری (۹/۵۳ درصد) کاهش داد (شکل ۵، الف). سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، منجر به کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل b گیاه شبدر سفید (به ترتیب ۱۵/۶ و ۲۳/۸۶ درصد) و آنتوسیانین آن (به ترتیب ۷/۷۹ و ۵/۴ درصد) نسبت به شاهد شدند (شکل ۵، ب و د). دو تیمار نیکل با روند تدریجی، مقدار کلروفیل

کل گیاه شبدر سفید را نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری (به ترتیب ۸/۴۷ و ۱۴/۴۳ درصد) کاهش دادند (شکل ۵، ج). افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئید گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد (به ترتیب ۹/۱ و ۱۵ درصد)، در اثر اعمال تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل مشاهده گردید (شکل ۵، و). به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که، تیمار نیکل، اثر کاهشی بر کلروفیل و آنتوسیانین و اثر افزایشی بر کاروتنوئیدهای گیاه شبدر سفید داشته است.



شکل ۵- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت کلروفیل a (mg/g FW)، (ب) کلروفیل b (mg/g FW)، (ج) کلروفیل کل (mg/g FW)، (د) غلظت کاروتنوئید برگ (mg/g FW) و (و) غلظت آنتوسیانین بخش هوایی (mg/g FW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

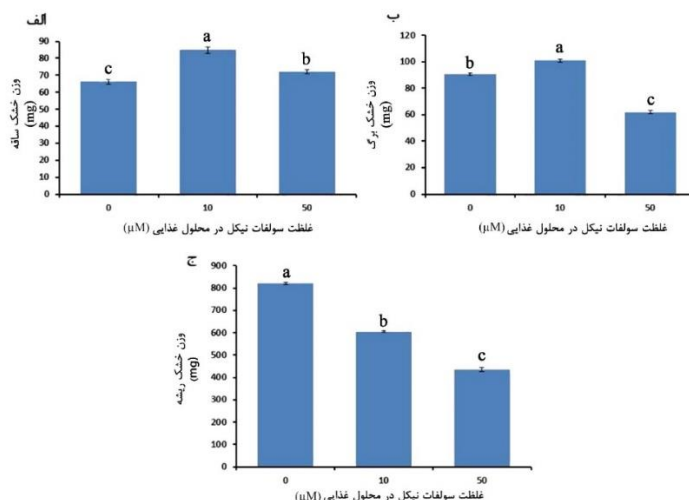
سمیت نیکل در گیاهان، رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها) را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Seregin & Kozhevnikova, 2006) که منجر به کلروز و نکروز برگ‌های گیاه می‌گردد (Gajewska et al., 2006). تنش نیکل، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی را به میزان قابل توجهی در آفتابگردان کاهش داد (Ahmad et al., 2011). مهار آنزیم‌های پروتوکلروفیل ردوکتاز و آلفا-آمینو لوآلونییک اسید دهیدروژناز توسط فلزات سنگین، منجر به مهار بیوسنتز کلروفیل می‌شود. برهم‌کنش متقابلی که بین گروه سولفیدریل آنزیم‌ها و فلزات سنگین وجود دارد، اساسی‌ترین مکانیسم برای مهار فتوسنتز محسوب می‌شود (Soltani et al., 2006). تنش فلزات سنگین وابسته به نوع فلز و گونه گیاه می‌تواند منجر به کاهش یا افزایش تولید کاروتنوئیدها گردد (Fargašová, 1998; Sinha et al., 2003). قرار گرفتن گیاه *Vicia faba* در معرض فلزات سنگین و تیمار گیاه *Arabidopsis*

thaliana توسط فلز سرب منجر به افزایش تولید کاروتنوئیدها گردید (Baek et al., 2012; Azooz et al., 2011). ترکیب‌های فنلی، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها عمدتاً گزینه‌های اصلی جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در تنش‌های مرتبط با فلزات سنگین هستند (Posmyk et al., 2009). آنتوسیانین‌ها نیز، از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آن‌ها در گیاه جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه جمع‌آوری آن‌ها از سایر بخش‌ها می‌شوند (Tripathi et al., 2006). به نظر می‌رسد گیاه شبدر سفید با افزایش تولید کاروتنوئیدها سعی بر مقابله با اثرات اکسیداتیو فلز نیکل داشته است.

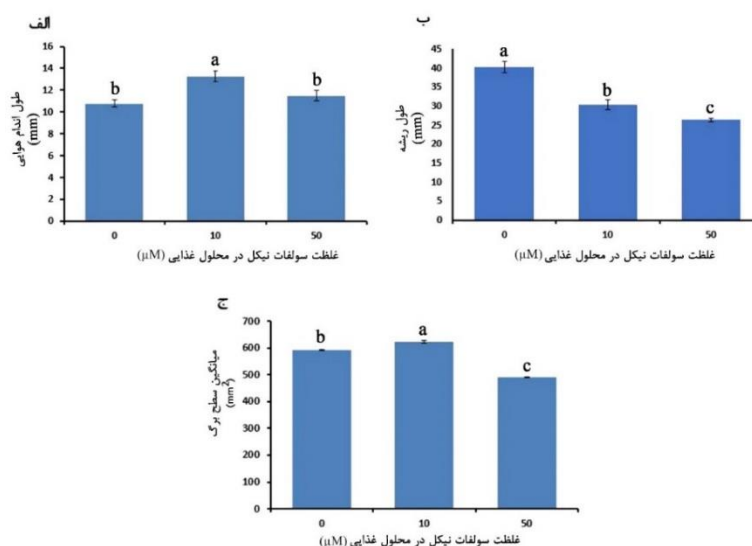
بررسی شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، ضمن داشتن اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر، منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک ساقه گیاه شبدر سفید (تا حدود ۲۸ درصد) نسبت به شاهد گردید (شکل ۶، الف). تیمار ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، به ترتیب منجر به افزایش ۱۲/۳ درصدی و کاهش ۳۱/۱ درصدی وزن خشک برگ (شکل ۶، ب) و افزایش ۵ درصدی و کاهش ۱۷/۳ درصدی سطح برگ گیاه (شکل ۷، ج) نسبت به شاهد گردید. غلظت ۱۰ میکرومولار نیکل، طول اندام هوایی را به صورت معنی‌داری افزایش داد (۲۳/۲۵ درصد)، ولی غلظت ۵۰ میکرومولار آن منجر به تغییر معنی‌دار طول اندام هوایی نگردید (شکل ۷، الف). وزن خشک ریشه گیاه شبدر سفید تا حدود ۵۹ درصد و طول ریشه تا حدود ۵۰ درصد نسبت به شاهد، تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به صورت معنی‌داری کاهش یافت (به ترتیب شکل ۶، ج و شکل ۷، ب).

کاهش شاخص‌های رشد گیاه شبدر سفید تحت تنش غلظت‌های بالای نیکل، می‌تواند ناشی از کاهش محتوی کلروفیل و به تبع آن کاهش فتوسنتز، کاهش محتوی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، تجمع مقادیر سمی نیکل در گیاه و کاهش غلظت روی و آهن گیاه باشد. عنصر نیکل باعث کاهش در وزن تر ریشه، برگ، ساقه و وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ی گیاهان و در مجموع منجر به کاهش زیست‌توده گیاهی می‌شود (Fuentes et al., 2007). با بالا رفتن سطوح آلودگی نیکل کاهش در رشد گیاه دیده می‌شود که این کاهش با کاهش در تقسیم سلولی و طولیل شدن مرتبط است (Molas, 2002). در ساختار رشد در اثر بالا رفتن غلظت نیکل منجر به کاهش در جذب مواد غذایی شده که این فرایند منجر به کاهش در رشد و وزن خشک گیاه می‌شود (Fuentes et al., 2007). در گزارشی، اعمال تیمار نیکل، مانع رشد ریشه‌ی گیاه گندم شد و این کاهش رشد، توسط کاهش در وزن تر و طول ریشه نمایان گردید (Gajewska et al., 2006). ریشه و اندام هوایی در مقابل غلظت‌های گوناگون نیکل از خود پاسخ رشدی متمایزی نشان می‌دهند که این عملکرد می‌تواند ناشی از این باشد که ریشه‌چه نسبت به اندام هوایی زودتر پوسته‌ی دانه را می‌شکند و نمایان می‌شود پس زودتر تحت تأثیر غلظت‌های بالای نیکل قرار می‌گیرد و دیگر اینکه، انتقال نیکل از ریشه‌چه به اندام هوایی کمتر صورت می‌گیرد که با یافته‌ی محققین مطابقت دارد (Li et al., 2009). از عوامل اصلی کاهش رشد اندام هوایی، می‌توان آسیب‌های ریشه‌ای ناشی از فلزات سنگین و کاهش محتوی کلروفیل و اختلال در فتوسیستم I را نام برد (Ewais, 1997). در پژوهشی دیگر که گیاه (*Silene italic*) تحت تأثیر نیکل قرار گرفت، سطح برگ گیاه کاهش یافت که ناشی از ممانعت غلظت‌های سمی نیکل از تقسیم سلولی بود (Gabbrielli et al., 1990).



شکل ۶- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) وزن خشک ساقه (mg)، (ب) وزن خشک برگ (mg) و (ج) وزن خشک ریشه (mg). حروف غیرمشتک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).



شکل ۷- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) طول اندام هوایی (mm)، (ب) طول ریشه (mm) و (ج) میانگین سطح برگ (mm²). حروف غیرمشتک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش که اثر تیمار سطوح مختلف نیکل (غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید مورد بررسی قرار گرفت، درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه، در حضور سطوح پایین و بالای تیمار نیکل، به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کرد. در شرایط کشت هیدروپونیک، سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل، منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. با افزایش غلظت تیمار نیکل، غلظت آن در ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. غلظت ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش و کاهش وزن خشک ساقه و طول اندام هوایی، وزن خشک و سطح برگ نسبت به شاهد گردید. با توجه به مقادیر به دست آمده از همه‌ی شاخص‌های رشد گیاه شبدر سفید تحت تیمارهای مختلف نیکل، به نظر می‌رسد سطح مناسب نیکل برای رشد این گیاه، ۱۰ میکرومولار باشد و سطح ۵۰ میکرومولار، در اکثر شاخص‌ها به عنوان غلظت سمی عمل کرده است. همچنین به نظر می‌رسد که شبدر سفید، گیاهی حساس به نیکل بوده و توانایی تحمل و تجمع نیکل را ندارد. از این رو، رشد و عملکرد آن در مزارعی با آلاینده‌گی نیکل، کاهش می‌یابد و گزینه مناسبی برای اهداف گیاه‌پالایی نیست.

منابع

- امینی، ف. و امیرجانی، م. (۱۳۹۱). اثر تیمار نیکل و سرب بر محتوای کلروفیل و تجمع این فلزات در گیاه یونجه. *تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی*، ۲(۶): ۱۱-۲۰.
- امینی، ف. و بلوچی، ح. ر. (۱۳۹۶). تأثیر فلزات سنگین و ترکیبات مختلف بستر کاشت بر آنزیم‌های پاداکساینده و عملکرد لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.cv. Sadri). *پژوهش‌های گیاهی*، ۳۰(۳): ۴۹۸-۵۱۱.
- سوهانی، م. ه. (۱۳۸۹). کنترل و گواهی بذر. چاپ سوم، انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۰۶ صفحه.
- شهبازی، م. و محقق‌دوست، ز. ت. (۱۳۷۵). بررسی اثرات سدیم کلراید بر رشد و انباشت ترکیبات آلی و معدنی در گندم. *علوم کشاورزی ایران*، ۲۷(۴): ۶۹-۷۸.
- عباسی، م. ر. و زمانیان، م. ه. (۱۳۸۴). بررسی پتانسیل تولید، صفات مهم در عملکرد و گروه‌بندی ژرم پلاسما شبدرهای ایرانی چند چین. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای، کرج، ایران.
- عزیزی، م. و قاسمی، ز. (۱۳۸۹). تحریک انباشت نیکل در شرایط کمبود آهن در گیاه *Alyssum inflatum* پایان نامه کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.
- قادری فر، ف. سلطانی، ا. و صادقی پور، ح. ر. (۱۳۹۳). تغییرات بیوشیمیایی طی زوال بذرهای کدویی تخم کاغذی پراکسیداسیون لیپید و صدمات غشا. *زیست‌شناسی گیاهی ایران*، ۶(۱): ۹۶-۱۱۲.
- مهدویان، ک. قربانلی، م. منوچهری کلانتری، خ. و محمدی، غ. (۱۳۸۵). تأثیر باندهای مختلف اشعه‌ی ماوراء بنفش بر عوامل فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی فلفل (*Capsicum annuum* L.). *زیست‌شناسی ایران*، ۳۳(۳): ۵۰-۶۰.

- Abdul-baki, A. A. & Anderson, J. D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Journal of Crop Science*, 13(6): 630-633.
- Aggarwal, N. I. D. H. I., Laura, J. S. & Sheoran, I. S. (1990). Effect of cadmium and nickel on germination, early seedling growth and photosynthesis of wheat and pigeonpea. *International Journal of Tropical Agriculture*, 8(2): 141-147.
- Ahmad, M. S. A., Ashraf, M. & Hussain, M. (2011). Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro- and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3): 1295-1303.
- Alloway, B. J. (1995). Heavy metal in soils. Springer.
- Aschmann, S. G., & Zasoski, R. J. (1987). Nickel and rubidium uptake by whole oat plants in solution culture. *Physiologia Plantarum*, 71(2): 191-196.
- Azooz, M. M., Youssef, M. M. & Al-Omair, M. A. (2011). Comparative evaluation of zinc and lead and their synergistic effects on growth and some physiological responses of *Hassawi okra* (*Hibiscus esculentus*) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*, 6(6): 269-282.
- Baek, S. A., Han, T., Ahn, S. K., Kang, H., Cho, M. R., Lee, S. C. & Im, K. H., 2012. Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, 28(4): 446-452.
- Bouman, R., van Welzen, P., Sumail, S., Echevarria, G., Erskine, P. D. & van der Ent, A. (2018). *Phyllanthus rufuschaneyi*: a new nickel hyperaccumulator from Sabah (Borneo Island) with potential for tropical agromining. *Botanical Studies*, 59(1): 1-12.
- 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(1-2): 248-254.
- Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R. D., Dudley, T. R. & Akman, Y. (1979). Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linnaeus* (Cruciferae). *Biological Sciences*, 203(1153): 387-403.
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G. & Furini, A. (2019). Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 3412.
- Duan, Y., Sangani, C. B., Muddassir, M. & Soni, K. V. (2020). Copper, chromium and nickel heavy metal effects on total sugar and protein content in *Glycine max*. DOI: [10.21203/rs.3.rs-107829/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-107829/v1)
- Ewais, E. A. (1997). Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum*, 39(3): 403-410.
- Fargašová, A. (1998). Root growth inhibition, photosynthetic pigments production, and metal accumulation in *Sinapis alba* as the parameters for trace metals effect determination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(6): 762-769.
- Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J. & Vallejo, V. R. (2007). Response of *Pinus halepensis* Mill. seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. *Environmental Pollution*, 145(1): 316-323.
- Gabbrielli, P., Pandolfini, T., Vergnano, O. & Palandri, M. R. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil*, 122(2): 271-277.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M. & Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4): 653-659.
- Gheibi, M. N., Malakouti, M. J., Kholdebarin, B., Ghanati, F., Teimouri, S. & Sayadi, R. (2009). Significance of nickel supply for growth and chlorophyll content of wheat supplied with urea or ammonium nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, 32(9): 1440-1450.
- Gray, C. W. & McLaren, R. G. (2006). Soil factors affecting heavy metal solubility in some New Zealand soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 175(1): 3-14.

- Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Aamer, M., Nawaz, M. & Khan, T. A. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13): 12673-12688.
- Hattab, S., Chouba, L., Ben Kheder, M., Mahouachi, T. & Boussetta, H. (2009). Cadmium-and copper-induced DNA damage in *Pisum sativum* roots and leaves as determined by the Comet assay. *Plant Biosystems*, 143(1): 6-11.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. & Sharma, S. (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil and Environment*, 54(6): 262.
- Kabir, M., Iqbal, M. Z., Shafiq, M. & Farooqi, Z. R. (2008). Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments. *Pakistan Journal of Botany*, 40(6): 2419-2426.
- Kennedy, J. F. & Chaplin, M. F. (1994). Carbohydrate analysis: a practical approach. Oxford University Press.
- Krupa, Z. & Baszynski, T. (1995). Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2(17).
- Li, B., Zhang, X., Wang, X. & Ma, Y. (2009). Refining a biotic ligand model for nickel toxicity to barley root elongation in solution culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6): 1760-1766.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S. & Thiagarajan, G. (2011). Effect of copper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Journal of Phytology*, 3(3): 53-62.
- Márquez-García, B., Márquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F. J. J., Rodríguez-Rubio, P. & Muñoz-Rodríguez, A. F. (2013). The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2): 119-124.
- Mishra, D. & Kar, M. (1974). Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review*, 40(4): 395-452.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., and Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1): 25-37.
- Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, 47(2): 115-126.
- Nie, J., Pan, Y., Shi, J., Guo, Y., Yan, Z., Duan, X. & Xu, M. (2015). A comparative study on the uptake and toxicity of nickel added in the form of different salts to maize seedlings. *International journal of environmental research and public health*, 12(12): 15075-15087.
- Nieminen, T. M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N. & Shotyk, W. (2007). Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Metal Ions in Life Sciences*, 2: 1-30.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. & Mizuno, T. (2011). AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 52(8): 1433-1442.
- Parida, B. K., Chhibba, I. M. & Nayyar, V. K. (2003). Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Scientia Horticulturae*, 98(2): 113-119.
- Parker, D. R. & Norvell, W. A. (1999). Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. *Advances in Agronomy*, 65: 151-213.
- Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E. & Parsons, J. G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(6): 727-734.
- Posmyk, M. M., Kontek, R. & Janas, K. M. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2): 596-602.

- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3): 393-404.
- Rao, K. M. & Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157(1): 113-128.
- Saito, A., Saito, M., Ichikawa, Y., Yoshiba, M., Tadano, T., Miwa, E., & Higuchi, K. (2010). Difference in the distribution and speciation of cellular nickel between nickel-tolerant and non-tolerant *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 cells. *Plant, Cell & Environment*, 33(2): 174-187.
- Schutzendubel, A. & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- Seregin, I. & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257-277.
- Sinha, S., Bhatt, K., Pandey, K., Singh, S. & Saxena, R. (2003). Interactive metal accumulation and its toxic effects under repeated exposure in submerged plant *Najas indica* Cham. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(4): 0696-0704.
- Soltani, A., Gholipoor, M. & Zeinali, E. (2006). Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 55(1-2): 195-200.
- Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J. & Macek, T. (2018). Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? *Frontiers in Plant Science*, 9: 1476.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company.
- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. & Gaur, J. P. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short-and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere*, 62(4): 538-544.
- Verma, S. & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum*, 44(1): 117-123.
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1): 88-93.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Yusof, M. L. M., Ghosh, S. & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11: 359.
- Zhong, W. S., Ren, T. & Zhao, L. J. (2016). Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1): 46-55.

Evaluation of nickel accumulation and tolerance by *Trifolium repens* L. in hydroponic culture

S. Amir Ahmady¹, T. Asemaneh ^{*}, A. S. Javanmard²

Received: 2021.05. 24

Accepted: 2022.02.22

Abstract

Although nickel is an essential element for plants, it has toxic effects at high concentrations. White clover (*Trifolium repens*) is a widely cultivated forage crop with high biomass. On the other hand, nickel pollution on farms has increased. Accordingly, in this study, the effects of nickel treatments (at 0, 10, 50, 100, 200, 500, and 1000 μM levels) were investigated on seed germination characteristics of the plant in a growth chamber and then on biochemical and physiological parameters in hydroponic culture, in a completely randomized statistical design. The results showed that seed germination, percent and speed, seed vigor, and seedling length increased and decreased with low and high levels of nickel, respectively. Seedlings' death was observed at 100 μM and higher concentrations of nickel. Concentrations of 10 and 50 μM of nickel harmed biochemical parameters including chlorophyll, carbohydrate, protein, and peroxidase activity and raised the content of carotenoids. By increase in levels of nickel treatments, nickel concentrations increased in roots, and shoots. In comparison to the control, the treatments of 10 and 50 μM nickel concentrations led to an increase and decrease in stem dry weight, shoot length, leaf area, and leaf dry weight, respectively. It seems that 10 μM and 50 μM concentrations of nickel function as suitable and toxic levels for the growth of this plant, respectively. It also seems that white clover is a nickel-sensitive plant and not able to tolerate and accumulate nickel, and it is not a proper candidate for phytoremediation.

Key words: Heavy metal resistance, Nickel accumulation, Phytoremediation, *Trifolium repens* L.

¹M.Sc. in Plant Physiology, Yasouj University, Yasuj, Iran.

² Assistant Professor, Biology Department, Yasouj University, Yasuj, Iran.

³ Assistant Professor, Biology Department, Yasouj University, Yasuj, Iran.* Corresponding author: asemaneh@yu.ac.ir

آرایه شناسی مولکولی و تبارشناسی (*Rutilus s. str.* (Teleostei: Leuciscidae)

در حوضه جنوبی دریای خزر

آرش جولاده رودبار،^۱ علی نزل آبادی،^۲ مجید نوائیان^۳

چکیده

جنس *Rutilus* یکی از جنس‌های مهم خانواده کپورماهیان سرمخروطی *Leuciscidae* است که اعضای آن از شرق سибیری تا غرب اروپا پراکنده شده‌اند. همواره شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های این جنس به دلیل شباهت‌های بالای ریختی و وجود جمعیت‌های حد واسط برای محققان مشکل ساز بوده است. اگر چه در مطالعات مختلف ویژگی‌های ریختی اعضای این جنس بررسی شده است اما آرایه‌شناسی مولکولی و تبارشناسی اعضای آن در جنوب دریای خزر مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین به منظور بررسی وضعیت اعضای *Rutilus* در جنوب دریای خزر مطالعه‌ای با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی انجام شد. نمونه‌های اعضای این جنس از تور پره مناطق ساحلی شهرهای بندر ترکمن، بندرگز، بابلسر، نور، رامسر، بندر انزلی و آستارا خریداری شد. پس از تکثیر ژن COI، قطعه مذکور توالی‌یابی شد. با استفاده از توالی‌های حاصله و دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI درخت‌های تبارشناسی به روش *Bayesian inference* تخمین *Maximum likelihood* و شبکه‌های پلوتایی ترسیم شد. با توجه به نتایج بدست آمده نمونه‌های تعیین توالی شده از حوضه جنوبی دریای خزر در خوشه *R. frisii* قرار گرفتند. همچنین حضور گونه‌های *R. rutilus* و *R. kutum* در مناطق مورد بررسی تأیید نشد. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار در ژن COI و تنوع فنوتیپی بسیار بالا به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از پلاستیسیته اکولوژیک، تحمل درجات مختلفی از شوری، دارا بودن جمعیت‌های ساکن و مهاجر در بین اعضای این جنس باشد.

واژه‌های کلیدی: ایران، فاصله ژنتیکی، فنوتیپ، کپورماهیان، COI

۱. دانش‌آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(نویسنده مسئول: jouladehrudbar@ut.ac.ir)

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره)، تهران، ایران

مقدمه

خانواده کپورماهیان سر مخروطی Leuciscidae با دارا بودن ۱۴ جنس و ۴۱ گونه معتبر در حدود ۱۵ درصد از فون ماهیان آب‌های داخلی ایران را تشکیل می‌دهد (Jouladeh-Roudbar et al., 2015; 2020). جنس *Rutilus* یکی از جنس‌های اقتصادی این خانواده است که در حال حاضر دارای ۱۰ گونه معتبر بوده و اعضای آن در سراسر اوراسیا، در آب‌های شور، لب شور و شیرین یافت می‌شود (Eschmeyer et al., 2018; Coad, 2018; Levin et al., 2017). گستره جغرافیایی تحت اشغال این گونه از شرق سبیری شروع شده و تا غرب اروپا ادامه پیدا می‌کند (Kottelat & Freyhof, 2007; Ketmaier et al., 2008; Levin et al., 2017).

حداقل شش گونه از این جنس در حوضه‌های دریای سیاه-آزوف، کاسپین، آرال و اقیانوس منجمد شمالی توصیف شده است. اعتبار این گونه‌ها اغلب در مطالعات مختلف به چالش کشیده شده و مورد بحث بوده است (Reshetnikov et al., 2003; Mina et al., 2006; Kottelat & Freyhof, 2007; Coad, 2018; Jouladeh-Roudbar et al., 2020). از طرفی دیگر ساختار جمعیتی گونه‌های پونتو-کاسپین کاملاً پیچیده بوده و اغلب آن‌ها دارای جمعیت‌های ساکن و یا رود کوچ (anadromous) هستند که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوضه دریای سیاه، آزوف، آرال و کاسپین وارد می‌شوند (Levin et al., 2017). به طور سنتی جمعیت غیر مهاجر به عنوان *R. rutilus* شناخته شده است (Levin et al., 2017; Coad, 2018). اخیراً مطالعات نسبتاً جامع و کاملی در ارتباط با فیلوژنی مولکولی و فیلوژئوگرافی این جنس در گستره زیستی آن صورت گرفته است که نتایج قابل تأملی از وضعیت آرایه‌شناسی اعضای این جنس در اوراسیا ارائه می‌دهد (Ketmaier et al., 2008; Levin et al., 2017). بر اساس نتایج ارائه شده سه دودمان اصلی از جنس *Rutilus* شناسایی شده است. ۱- دودمان *R. frisii*، ۲- *Rutilus rutilus s. str.* و ۳- گروهی که در دریای آنگان، کاسپین، سیاه-آزوف و آرال، آب‌های داخلی آسیای مرکزی، رودخانه‌های سبیری و اقیانوس منجمد شمالی پراکنده شده‌اند. بر اساس نتایج بدست آمده از تعیین توالی ژن *Cytb* دسته سوم اختلاف ژنتیکی معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین گونه‌های *R. schelkovnikovi*، *R. r. aralensis*، *R. stoumboudae* از درجه اعتبار ساقط و مترادف *Rutilus rutilus* قرار گرفتند.

بر اساس مطالعات مختلف تاکنون تاکسون‌های *Rutilus caspicus* (Yakovlev 1870)، *Rutilus lacustris* (Pallas 1814)، *Rutilus rutilus* (Linnaeus 1758)، *R. r. caspius* و *R. r. caspius natio kurensis* Berg 1932، *Rutilus rutilus* (Linnaeus 1758)، *kutum* Kamenskii, 1901، *natio knipowitschi* Pravdin 1927 از دریای کاسپین و رودخانه‌های منتهی به آن گزارش شده است (Bogutskaya & Naseka, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007; Coad 2018; Jouladeh-Roudbar et al., 2020).

اغلب این تاکسون‌ها از لحاظ ریختی دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند که باعث شده شناسایی و تفکیک آن‌ها را با مشکل مواجه کند (Berg 1949; Abdolhay et al., 2010; Kashefi et al., 2012; Kohestan-Eskandari et al., 2014). علی‌رغم اینکه جمعیت‌های این جنس در مطالعات مختلف از لحاظ ریختی بررسی و مطالعه شده‌اند اما در مورد وضعیت آرایه‌شناسی آن‌ها در حوضه جنوبی دریای کاسپین مطالعه‌ای صورت نگرفته و مشخص نیست کدام تاکسون یا تاکسون‌های نامبرده شده معتبر بوده و در قسمت‌های جنوبی یافت می‌شوند. لذا این مطالعه به منظور بررسی وضعیت آرایه‌شناسی و تبارشناسی این جنس در جنوب دریای کاسپین برای روشن شدن وضعیت نمایندگان آن با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی هدف گذاری شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای انجام این تحقیق در خلال سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸ نمونه‌های بالغ با ویژگی ریختی متفاوت شامل تعداد فلس روی خط جانبی، شعاع باله پشتی، شعاع باله سینه‌ای، خار آبششی و رنگ بدن، از جنس *Rutilus* از مناطق ساحلی شهرهای بندرترکمن (۲ نمونه)، بندرگز (۲ نمونه)، بابلسر (۱ نمونه)، نور (۳ نمونه)، رامسر (۳ نمونه)، محمود آباد (۳ نمونه)، بندر انزلی (۳ نمونه) و آستارا (۳ نمونه) از صیادان تور پره خریداری شد (جدول ۱ و شکل ۱). قسمتی از باله سینه‌ای سمت راست بدن نمونه‌های خریداری شده در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و جهت انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

جدول ۱- ویژگی‌های ریختی نمونه‌های مورد مطالعه در هر ایستگاه

ردیف	محل صید	شعاع باله پشتی	شعاع باله سینه‌ای	فلس روی خط جانبی	خار آبششی	رنگ بدن
۱	بندرترکمن	۹	۱۴	۴۷	۱۴	کرم
۲		۹	۱۹	۴۸	۱۴	نقره‌ای
۳	بندرگز	۱۰	۱۵	۵۴	۱۱	نقره‌ای-طلایی
۴		۹	۱۴	۵۱	۱۵	نقره‌ای
۵	بابلسر	۸	۱۸	۴۹	۱۳	نقره‌ای-طلایی
۶	نور	۱۰	۱۹	۵۳	۱۴	نقره‌ای-طلایی
۷		۱۰	۱۷	۵۰	۱۴	کرم
۸		۱۰	۱۴	۵۲	۱۲	کرم
۹	رامسر	۹	۱۵	۵۰	۱۱	کرم
۱۰		۹	۱۹	۴۹	۱۴	کرم
۱۱		۸	۱۸	۵۳	۱۴	نقره‌ای
۱۲	محمود آباد	۱۰	۱۸	۵۸	۱۳	نقره‌ای-طلایی
۱۳		۹	۱۸	۴۸	۱۱	کرم
۱۴		۹	۱۶	۵۸	۱۵	نقره‌ای
۱۵	بندر انزلی	۹	۱۷	۴۶	۱۱	کرم
۱۶		۱۰	۱۹	۵۴	۱۳	کرم
۱۷		۹	۱۹	۵۵	۱۲	نقره‌ای
۱۸	آستارا	۸	۱۵	۵۴	۱۲	نقره‌ای
۱۹		۹	۱۴	۴۹	۱۴	نقره‌ای-طلایی
۲۰		۱۰	۱۵	۴۹	۱۲	نقره‌ای



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه برداری؛ ۱- بندر ترکمن، ۲- بندر گز، ۳- بابلسر، ۴- نور، ۵- رامسر، ۶- بندر انزلی و ۷- آستارا.

استخراج DNA: پس از تبخیر الکل از باله‌های تثبیت شده، قسمتی از باله، در آب مقطر هموژن شد، سپس با استفاده از کیت شرکت BIO-RAD استخراج DNA انجام شد. برای اطمینان حاصل کردن از کیفیت و کمیت DNA های استخراجی از روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز ۰/۷ درصد به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد.

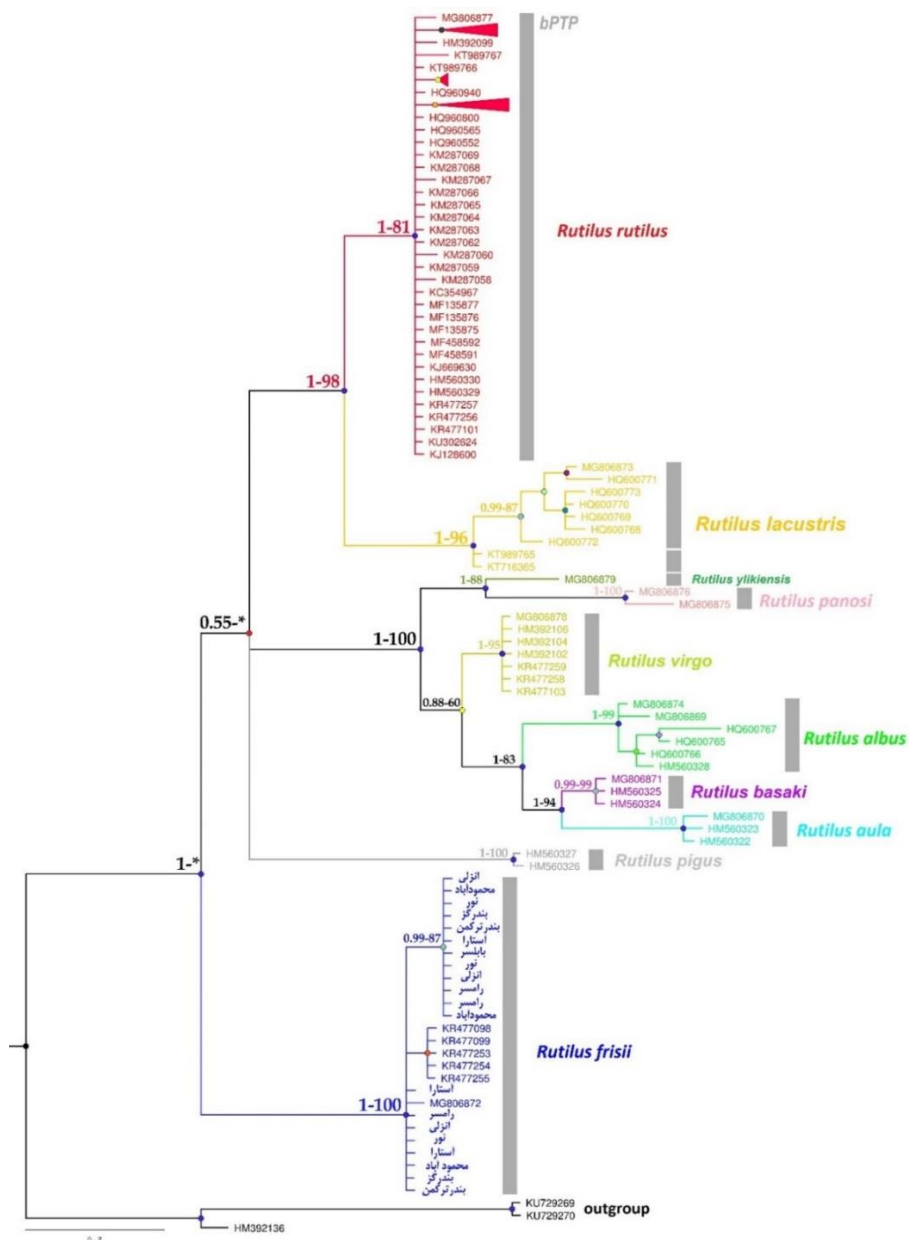
واکنش PCR: برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز سی میتوکندریایی نمونه ها از آغازگر رفت (5'-FishF1-3') و برگشت (3'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') و برگشت (5'-FishR1-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') استفاده شد (Ward et al. 2005). حجم واکنش نهایی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که از مقدار شش میکرولیتر بافر 10X، ۳ میکرولیتر منیزیم کلرید ($MgCl_2$)، دو میکرولیتر پرایمر رفت و دو میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر $dNTPs$ (10 mM)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۵ $u/\mu l$) و ۲ میکرولیتر DNA الگو بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، به دنبال آن سی و چهار چرخه (واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۷ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر موفق ناحیه COI پنج میکرولیتر از محصول PCR همراه با Dye رنگ آمیزی روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و سپس الکتروفورز شد و در ادامه در معرض تابش نور U.V قرار داده شد.

توالی‌یابی: پس از حصول اطمینان از تکثیر موفق و بدون آلودگی قطعه مورد نظر ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR توسط کیت خالص سازی شرکت ماکروژن (MacroGen, Korea) خالص سازی و جهت توالی‌یابی به همان شرکت ارسال شد. قطعه تکثیر شده با استفاده از پرایمر FishR1 توالی‌یابی شدند.

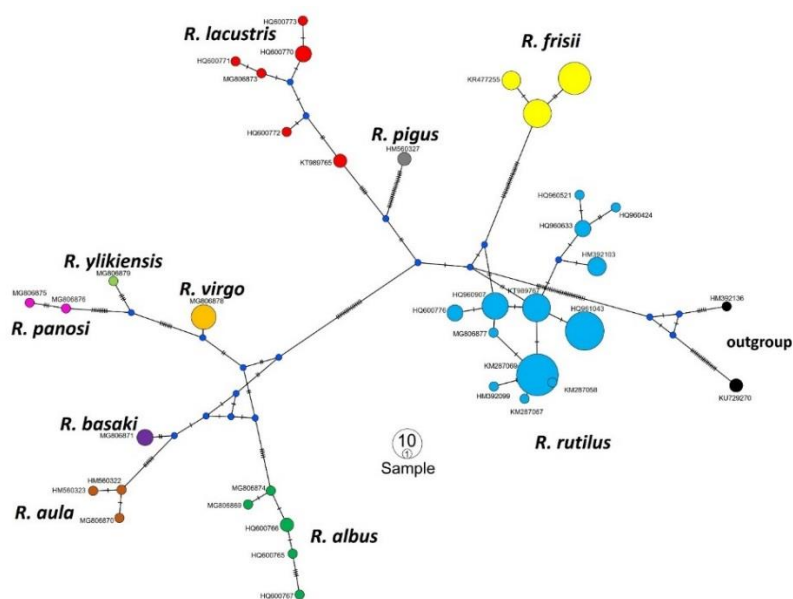
آنالیز داده‌ها: توالی‌ها با ۱ استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2020 ویرایش شدند. عملیات یکپارچگی توالی‌های ژن COI با استفاده از ClustalW multiple alignment در نرم‌افزار BioEdit v. 7.2.5 انجام شد (Hall 1999). به منظور یافتن توالی‌های مشابه جهت ترسیم درخت تبارشناسی، توالی ویرایش شده با ۱ استفاده از جستجوی BLAST در بانک جهانی NCBI با سایر توالی‌های این جنس مقایسه شدند. مدل تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار jModelTest انتخاب شد (Darriba et al. 2012). براساس نتیجه حاصله از این نرم‌افزار، مدل T92+G برای تجزیه و تحلیل پیشنهاد شد. برای ترسیم درخت‌های تبارشناسی از روش Bayesian inference در نرم‌افزار MrBayes v. 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) و تکرار ۵ میلیون نسل و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML GUI v. 2.0 (Silvestro & Michalak, 2012) و ۵ هزار تکرار استفاده شد. برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی توالی‌های حاصله از روش K2P در نرم‌افزار MEGA v. 7.0 استفاده شد (Kumar et al. 2016). همچنین برای ترسیم درخت‌های بدست آمده نیز از نرم‌افزار FigTree v. 1.5 استفاده گردید (Rambaut 2009). برای تجزیه و تحلیل مرزبندی گونه‌ای از روش bPTP و تعداد ۲۰۰ هزار نسل استفاده شد. برای ترسیم شبکه هاپلوتایپی نیز از نرم‌افزار PopART v. 1.7 استفاده شد. گونه *Squalius cephalus* نیز به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از دریافت نتایج تعیین توالی از شرکت ماکروژن و تصحیح آن‌ها، ۶۳۰ جفت باز از ۲۰ نمونه برای آنالیز بدست آمد. علاوه بر این ۱۱۲ توالی دیگر اعضای این جنس از بانک جهانی NCBI استخراج شد و با توالی‌های فوق هم‌ردیف شدند که در نتیجه از مجموع ۶۳۰ جفت باز، ۱۲۳ جایگاه دارای چند شکلی (پلی مورفیسم) و ۵۰۷ جایگاه ثابت و فاقد چند شکلی (مونومورفیسم) بودند. همچنین از ۶۳۰ باز مورد بررسی ۱۰۸ جایگاه به عنوان Parsim-informative شناسایی شد. پس از ترسیم درخت‌های تبارشناسی Maximum likelihood و Bayesian inference مشخص گردید که دارای شکل مشابهی هستند. بنابراین درخت BI انتخاب، اعداد احتمال پسین (BI posterior probability) و بوت استرپ (ML bootstrap) حاصله پیش از هر گره درج گردید (شکل ۲). با توجه به نتایج حاصله از درخت‌های تبارشناسی، ۱۰ گونه *R. albus*, *R. virgo*, *R. panosi*, *R. ylikensis*, *R. lacustiris*, *R. rutilus*, *R. frisia* و *R. pigu*, *R. aulai*, *basaki* در خوشه‌های مجزا که با میزان بالای BI و ML قرار گرفتند. همچنین نتایج مرزبندی گونه‌ای bPTP نیز برای تمامی خوشه‌های ذکر شده گونه واحد بود اما برای خوشه *R. lacustiris* دو گونه پیش بینی شد. علاوه بر این نتایج تحلیل بازهای توالی‌های بررسی شده نشان داد ترکیب باز تیمین ۳۰/۲ درصد، آدنین ۲۴/۸ درصد، گوانین ۱۹/۵ درصد و سیتوزین ۲۵/۶ درصد است. همچنین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌های گونه‌های جنس *Rutilus* مورد تجزیه و تحلیل در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۳/۲۰ بین دو گونه *R. albus* و *R. panosi* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۸۲ بین دو گونه *R. aula* و *R. basaki* است (جدول ۲). همچنین فاصله درون گونه‌ای برای *R. frisia* به میزان ۰/۰۳ درصد، *R. rutilus* ۰/۱۶ درصد، *R. panosi* ۰/۲۷ درصد، *R. albus* ۰/۲۵ و *R. lacustiris* ۰/۲۰ درصد محاسبه شد. شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده نیز در شکل ۳ به نمایش درآمده است.



شکل ۲- درخت تبارشناسی ترسیم شده به روش Maximum likelihood و Bayesian inference. شماره دسترسی نمونه‌های استفاده شده از بانک NCBI در مقابل خوشه‌ها درج شده است. شاخه‌هایی که در درخت ML وجود نداشتند با علامت * مشخص شده است. نتایج مرزبندی گونه‌ای bPTP نیز به نوار خاکستری رنگ به نمایش درآمده است.



شکل ۳- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده اعضای جنس *Rutilus* با استفاده از توالی‌های COI مورد بررسی در این مطالعه.



شکل ۴- نمای جانبی ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii*، صیدشده از سواحل مابین بابل و فریدونکنار



شکل ۵- نمای جانبی ماهی کلمه *Rutilus lacustris*، صید شده از رودخانه ارس

جدول ۲- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد بررسی جنس *Rutilus* بر اساس درصد تفاوت در ژن COI.

ردیف	گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	<i>R. frisii</i>										
۲	<i>R. rutilus</i>	۲/۲۸									
۳	<i>R. ylikiensis</i>	۲/۸۱	۲/۵۹								
۴	<i>R. virgo</i>	۲/۶۱	۲/۳۹	۰/۹۱							
۵	<i>R. panosi</i>	۲/۸۵	۲/۶۹	۱/۲۴	۱/۶۳						
۶	<i>R. albus</i>	۳/۰۸	۲/۷۳	۱/۸۶	۱/۰۹	۲/۵۳					
۷	<i>R. lacustris</i>	۲/۴۷	۱/۲۴	۲/۷۷	۲/۵۷	۲/۸۱	۲/۹۴				
۸	<i>R. basaki</i>	۳/۰۳	۲/۵۰	۱/۴۹	۰/۹۲	۲/۲۲	۱/۰۸	۲/۷۸			
۹	<i>R. aula</i>	۳/۱۳	۲/۴۹	۱/۹۷	۱/۳۹	۲/۵۱	۱/۵۳	۲/۸۸	۰/۸۲		
۱۰	<i>R. pingus</i>	۲/۶۵	۲/۴۵	۲/۹۵	۲/۷۶	۳/۰۰	۳/۲۰	۲/۴۵	۳/۱۸	۳/۰۸	
۱۱	برون گروه	۴/۲۴	۴/۲۷	۴/۴۰	۴/۷۳	۴/۶۰	۴/۷۸	۴/۲۰	۴/۸۱	۴/۸۱	۴/۷۰

بحث و نتیجه گیری

همانطور که اشاره شد تاکنون تاکسون تاکسون‌های (*Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870) *Rutilus lacustris* (Pallas 1814) *Rutilus kutum* Kamenskii, 1901 *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) *Rutilus r. caspius* و *R. r. caspius natio kurensis* Berg, 1932 *Rutilus r. caspius natio knipowitschi* Pravdin, 1927 Bogutskaya & Naseka, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007;) شده است (Coad, 2018; Jouladeh-Roudbar et al., 2020). با توجه به نتایج بدست آمده از ترسیم درخت‌های تبارشناسی ML و BI، مرزبندی گونه‌ای bPTP و همچنین میانگین فاصله ژنتیکی K2P نشان داد جمعیت‌های ساکن حوضه جنوبی دریای خزر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارد (جدول ۲ و شکل ۲). گواه این مسئله فاصله درون جمعیتی بسیار اندک (۰/۰۳ درصد) در بین نمونه‌های بررسی شده است. با توجه به نتایج درخت‌های تبارشناسی ترسیم شده، اعتبار سه گونه *R. frisii*، *R. rutilus* (شکل ۴)، *R. lacustris* (شکل ۵) و از حوضه دریای کاسپین به نظر قابل تأیید است. همچنین تمامی نمونه‌های تعیین توالی شده از حوضه جنوبی دریای خزر با ساپورت بالا در خوشه *R. frisii* قرار گرفته‌اند. علاوه بر این توالی هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی، حضور گونه *R. rutilus* را در مناطق نمونه‌برداری شده در حوضه جنوبی دریای خزر تأیید نکرد. پیش از این نیز در مطالعه‌ای مشابه Levin و همکاران (2017) حضور گونه دیگر از جنس *Rutilus* را تأیید نکرده بودند.

همانطور که اشاره شد در مطالعات مختلف به تنوع ریختی بالای اعضای جنس *Rutilus* در حوضه جنوبی دریای خزر اشاره شده است (Abdolhay et al., 2010; Kashefi et al., 2012; Kohestan-Eskandari et al., 2014). به نظر می‌رسد این تنوع فنوتیپی بسیار بالا ناشی از پلاستیسیته اکولوژیک، تحمل درجات مختلفی از شوری است و دارا بودن جمعیت‌های ساکن و مهاجر باعث

ایجاد جمعیت های مختلف با ویژگی های متفاوت در بین اعضای جنس *Rutilus* در حوضه هایی مانند پونتو-کاسپین گردیده است (Reshetnikov *et al.*, 2003; Bogutskaya & Naseka, 2004; Mina *et al.*, 2006; Kottelat & Freyhof, 2007; Levin, 2017).

پس از بررسی نتایج این مطالعه و مقایسه آن با نتایج دیگر مطالعات ریخت سنجی جمعیت های جنس *Rutilus* این سوال به ذهن می رسد، که علت اختلاف زیاد در ویژگی های ریختی و عدم اختلاف در ژنوم میتوکندریایی اعضای این جنس چیست؟ به نظر می رسد تغییرات فنوتیپی اعضای این جنس ممکن است در خلال مراحل تکامل لاروی در آب شیرین، لب شور و یا شور اتفاق بیافتد. به عنوان مثال در برخی مطالعات تغییرات سریع فنوتیپی در هنگام معرفی جمعیت ساکن آب شیرین به دریاچه های لب شور گزارش شده که باعث ایجاد ویژگی های فنوتیپی مشابه جمعیت های مهاجر گردیده است (Kozhara & Mironovsky, 1995; Kozhara, 1997; Levin 2017). یکی از مواردی که به نظر می رسد به عنوان یکی از علل اصلی نمود تغییرات فنوتیپی در جمعیت های مهاجر و یا ساکن این جنس با شد فرآیند استخوان سازی درون غشایی (Intramembranous ossification) است. با توجه به اینکه محیط یونی آب شیرین و دریا با یکدیگر کاملاً متفاوت است به نظر می رسد ظرفیت معدنی شدن (mineralization) اندام های ماهیان می تواند تحت تاثیر این محیط قرار بگیرد. استخوانی شدن با دریافت مواد معدنی محیطی مقدمه تشکیل بسیاری از استخوان ها در بدن ماهیان است (Brighton & Hunt, 1991).

یکی دیگر از مواردی که می تواند توجیه کننده عدم وجود اختلاف ژنتیکی در ژن COI بین جمعیت های *Rutilus* باشد وجود منشأ اکولوژیک برای جمعیت های آن است (Levin *et al.*, 2017). با توجه به نتایج حاصله از ترسیم شبکه هاپلوتایپی دو گونه *R. rutilus* و *R. frisii* دارای تعداد نسبتاً بالای هاپلوتایپ بودند. به نظر می رسد وجود هاپلوتایپ های متفاوت ساکن دریای سیاه و کاسپین می تواند به علت قرار گرفتن جغرافیای پونتو-کاسپین به عنوان یک دیرینه-پناهگاه (palaeorefugium) برای اعضای این جنس برای گذر از دوران یخبندان و احتمالاً گسترش مجدد در پسایخبندان باشد. در مطالعات متفاوتی از این منطقه به عنوان یک پناهگاه مهم برای جانداران اورا سیاه در دوره های متفاوت یخبندان یاد شده است (Bernatchez, 2001; Kotlik *et al.*, 2004; Culling *et al.*, 2006; Hänfling *et al.*, 2009; Timoshkina *et al.*, 2009). از طرفی برخی گونه های این جنس (*R. basaki* و *R. virgo*) دارای تعداد اندکی هاپلوتایپ بودند. وجود تعداد کم هاپلوتایپ می تواند نشان دهنده کلونیزه شدن جمعیت فعلی به وسیله والدینی تحت تاثیر عواملی مانند اثر بنیانگذار (founder effect) باشد (Levin *et al.*, 2017).

در مجموع با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه اختلاف معنی داری را در بین جمعیت های مورد بررسی در جنوب دریای کاسپین نشان نداد. بنابراین بر اساس تقدم در نام گذاری پیشنهاد می گردد گونه *R. frisii* به عنوان گونه معتبر در نظر گرفته شده و دیگر تاکسون های نامبرده شده به عنوان مترادف آن در نظر گرفته شوند. البته پیشنهاد فوق بر اساس نتایج تعیین توالی ژن میتوکندریایی COI ارائه شد، بنابراین پیشنهاد می گردد برای بهتر مشخص شدن وضعیت آرایه شناختی اعضای این جنس از ژن های هسته ای نیز استفاده شود تا بتوان نتیجه گیری کامل تری ارائه نمود.

منابع

- Abdolhay, H.A. Khalijah, D.S. Pourkazemi, M. Shapor, S.S. Rezvani, S. Satar, M.K. and Hosseinzadeh Sahafi, H. (2010) Morphometrics studies of Mahisefid (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) from selected rivers in the southern Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 9: 1-18
- Berg, L.S. (1949) Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, 4th edition. Part 1. Akademia Nauk USSR, Moscow and Leningrad. 466 p.
- Bernatchez, L. (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution. 55: 351–379.
- Bogutskaya, N.G. and Naseka, A.M. (2004) Catalogue of Agnathans and Fishes of Fresh and Brackish Waters of Russia with Comments on Nomenclature and Taxonomy. The Russian Academy of Sciences, Moscow.
- Brighton, C.T. and Hunt, R.M. (1991) Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. Journal of Bone and Joint Surgery. 73: 832-847.
- Coad, B.W. (2018) Freshwater Fishes of Iran Updated 2 May 2018. [Cited 2 May 2018]. Available from: www.briancoad.com.
- Culling, M.A. Janko, K. Boron, A. Vasil'ev, V.P. and Hewitt, G.M. (2006) European colonization by the spined loach (*Cobitis taenia*) from Ponto- Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation. Molecular ecology. 15: 173-190.
- Darriba, D. Taboada, G.L. Doallo, R. and Posada, D. J. (2012) 2: More models, new heuristics and high-performance computing. Nature Methods. 9: 772.
- Eschmeyer, W.N. Fricke, and R. van der Laan, R. (2018) Catalog of Fishes: Genera, Species, References. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Catalog of Fishes electronic version. doi:10.11646/zootaxa.3882.1.1
- Hall, T. A. (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Hänfling, B. Dümpelmann, C. Bogutskaya, N.G Brandl, R. and Brändle, M. (2009) Shallow phylogeographic structuring of *Vimba vimba* across Europe suggests two distinct refugia during the last glaciation. Journal of Fish Biology. 75: 2269-2286.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics. 17: 754-755.
- Jouladeh-Roudbar, A. Vatandoust, S. Eagderi, S. Jafari-Kenari, and S., Mousavi-Sabet, H. (2015). Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation. 8: 855-909
- Jouladeh-Roudbar, A. Ghanavi, H.R. and Doadrio, I. (2020) Ichthyofauna from Iranian freshwater: annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment, Zoological Studies. 59: 0d
- Kashefi, P. Bani, A. and Ebrahimi, E. (2012) Morphometric and meristic variations between non-reproductive and reproductive kutum females (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901), in the southwest Caspian Sea. Italian journal of zoology. 79: 337-343.

- Ketmaier, V. Bianco, P.G. and Durand, J.D. (2008) Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 362–367.
- Kohestan-Eskandari, S. Anvarifar, H. Mousavi-Sabet, H. Yousefi, M. and Khanzade, M. (2014) A morphology-based hypothesis for homeward migration success and population differentiation in the anadromous kutum *Rutilus kutum* (Pisces: Cyprinidae) along the southern Caspian Sea, Iran. *Folia Zoologica*. 63: 151-160.
- Kotlík, P. Markov, A. S. Choleva, L. Bogutskaya, N.G. Ekmekci, F.G. and Ivanova, P.P. (2008) Divergence with gene flow between Ponto- Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular ecology*. 17: 1076-1088.
- Kottelat, M. and Freyhof, J. (2007) Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat 646 p.
- Kozhara, A.V. (1997). Regular phenotypic changes accompanying osmotic adaptations in some cyprinids: micro vs macroevolution. *Zhurnal obshchei biologii*. 58: 17–26.
- Kozhara, A. V. and. Mironovsky, A. N. (1995). Selection for tolerance to the increased mineralization—a possible factor of intraspecific divergence in the bream (*Abramis brama* (L), Cypriniformes, Cyprinidae) from the Caspian Sea drainage. *Zhurnal Obshchei Biologii*. 56: 239–247.
- Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 33: 1870-1874.
- Levin, B.A. Simonov, E.P. Ermakov, O.A. Levina, M.A. Interesova, E.A. Kovalchuk, O.M. Malinina, Y.A. Mamilov, N.S. Mustafayev, N.J. Pilin, D.V. Pozdeev, I.V. and Pozdeev, I.V. (2017) Phylogeny and phylogeography of the roaches, genus *Rutilus* (Cyprinidae), at the Eastern part of its range as inferred from mtDNA analysis. *Hydrobiologia*. 788: 33-46.
- Mina, M.V. Reshetnikov, Y.S. and Dgebuadze, Y.Y. (2006) Taxonomic novelties and problems for users. *Journal of Ichthyology*. 46: 476-480.
- Rambaut, A. (2009) FigTree v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Reshetnikov, Y.S. Popova, O.A. and Sokolov, L.I. (2003) Atlas of Russian Freshwater Fishes, Vol. 1. Nauka, Moscow.
- Silvestro, D. Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*. 12: 335-337.
- Timoshkina, N.N. Barmintseva, A.E. Usatov, A.V. and Muge, N.S. (2009) Intraspecific genetic polymorphism of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Russian Journal of Genetics*. 45: 1098-1106.
- Ward, R.D. Zemiak, T.S. Innes, B.H. Last, P.R. and Hebert, P.D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360:1847–1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716.

Molecular systematics and phylogeny of *Rutilus* s. str. (Teleostei: Leuciscidae) at the southern part of Caspian Sea

Received: 2021.11.6

Accepted: 2022.2.7

Abstract

Rutilus is one of the most important genera of the Leuciscidae family, whose members are distributed from Eastern Siberia to Western Europe. Due to the similarity of morphologic characters and the existence of intermediate populations, it has always been difficult for researchers to identify the species and populations of this genus. Although several studies have been conducted based on morphological characters of members of this genus, the molecular systematics and phylogeny of *Rutilus* in the southern Caspian Sea have not been studied. A study was performed by using the COI gene sequence to investigate the status of *Rutilus* members in the southern Caspian Sea. Samples of members of this genus were purchased from the beaches of Bandar-e-Turkmen, Bandar-e-Gaz, Babolsar, Nour, Ramsar, Bandar-e-Anzali, and Astara. After amplifying the COI gene, the fragment was sequenced. Using the sequence results and other sequences in the NCBI gene bank, phylogeny trees were plotted by the Bayesian inference method, Maximum likelihood estimation, and haplotype network. The sequenced specimens from the southern basin of the Caspian Sea were placed in the *R. frisii* clade. Also, the presence of *R. rutilus* and *R. kutum* species in the studied areas was not confirmed. Due to the insignificant difference in COI gene and phenotypic diversity, it seems the differences are due to ecological plasticity, tolerance to salted waters coupled with degrees of salinity, and having resident and migratory populations among members of this genus.

Keywords: *Carps, COI, Genetic distance, Phenotype, Iran*

-
1. PhD student, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
 2. Master's student, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (*Corresponding Author: jouladehroudbar@ut.ac.ir)
 3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Yadgar Imam (RA), Tehran, Iran

بررسی تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات فیزیکی بذر درختان بنه (مطالعه موردی: ذخیره گاه سوستان در استان آذربایجان غربی)

قدرت رحیم زاده*^۱، رحیم میرزایی ملا احمد^۲

چکیده

مقدمه: تولید بذر یکی از کلیدی‌ترین عوامل در تجدید حیات دانه‌زاد گیاهان و درختان است و در امر احیاء، توسعه جنگل‌ها، جنگل کاری‌ها و مخصوصاً تولید نهال در نهالستان‌ها کاربرد فراوان دارد. بنابراین انتخاب بذرهای با کیفیت و رسیده و دارای شکل فیزیکی مناسب، اهمیت زیادی دارد. به‌طور کلی عامل ارتفاع از سطح دریا یکی از عوامل محدودکننده گسترش گیاهان است.

روشها: این تحقیق با هدف بررسی تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات فیزیکی بذر بنه در ذخیره‌گاه سوستان که یکی از چهار ذخیره‌گاه بنه در استان آذربایجان غربی است، به‌اجرا درآمد. ذخیره‌گاه مورد نظر به ۴ کلاس ارتفاعی شامل ۱۵۱۵، ۱۶۱۵، ۱۷۱۵ و ۱۸۱۵ متر ارتفاع از سطح دریا تقسیم شد. در هر قطعه نمونه تعداد سه پایه و از هر پایه تعداد ۵ خوشه به‌طور تصادفی جمع‌آوری و مشخصه‌های فیزیکی بذر شامل: طول خوشه، تعداد میوه در خوشه، طول میوه، عرض میوه، وزن میوه، وزن بذر و درصد پوکی بذر در هر طبقه ارتفاعی بررسی شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزارهای Excel و SPSS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها و تجزیه واریانس به کمک آزمون F و آزمون مقایسه‌ای چندگانه دانکن و آزمون کروسکال‌والیس انجام شد.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد همه صفات به‌جز درصد پوکی بذر، در ارتفاعات مختلف از سطح دریا دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۹ درصد هستند. طول خوشه و تعداد میوه در خوشه با افزایش ارتفاع افزایش نشان داد، طول، عرض و وزن میوه با افزایش ارتفاع روند نامنظم داشت. بیشترین طول و وزن میوه در ارتفاع ۱۷۱۵ و کمترین مقدار آنها در ارتفاع ۱۶۱۵ متر دیده شد. وزن بذر با افزایش ارتفاع روند افزایشی نشان داد. درصد پوکی بذر در ارتفاعات میانی حوزه دارای پایین‌ترین مقدار بود.

واژه‌های کلیدی: ارتفاع، پوکی بذر، جنگل بنه، طول میوه، عرض میوه، وزن میوه، وزن دانه.

۱. دانشجوی دکترای جنگل دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تهران، ایران (* نویسنده مسئول: gh.rahimzadeh@ut.ac.ir)

۲. استادیار موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تهران، ایران

مقدمه

جنگل‌ها یکی از منابع تجدید شونده و ثروتی برای تمام جوامع بشری هستند. با توجه به روند تخریب و نابودی جنگل‌ها در اثر بهره‌برداری‌های بی‌رویه و عدم زادآوری طبیعی بایستی هر چه زودتر با اعمال روش‌های مدیریتی علمی و جامع از کاهش نگران‌کننده سطح این منابع ارزشمند در جهت حفاظت و احیای آنها تلاش شود. در این راستا، بانک‌های ژن گیاهی در سراسر جهان با جمع‌آوری، شناسایی، حفاظت و احیاء منابع تجدیدشونده گیاهی، نقش مهمی در حفظ و بقای پوشش گیاهی و تنوع گونه‌ای ایفا می‌کنند. با این وجود عواملی نظیر شیب، ارتفاع، شرایط متفاوت اقلیمی موجب ایجاد اکوتیپ‌های مختلف و به تبع آن اندازه‌های متفاوت در مقدار و اندازه بذر می‌گردد (Ke & Zhong, 2000; Yanlong, 2007). یکی از علل مهم عدم زادآوری طبیعی و کفایت در جنگل‌های زاگرس را می‌توان نبود یا کمبود پرندگان برای انتقال بذر دانست. طبیعی است که در جنگل‌ها، نبودن بستر مناسب در اثر فرسایش خاک، چرای دام و کمبود درختان مادری بذرده نیز از عوامل مؤثر در این خصوص است (Marvi Mohadjer, 2005). زادآوری جنگل یک فرآیند دینامیک است که در نتیجه استقرار و رشد درختان نوظهور به جمعیت درختان بالغ افزوده می‌شود و از دست رفتن درختان بالغ در اثر مرگومیر تدریجی در طول زمان جبران می‌شود (Tahmasebi, 2015). یکی از متداول‌ترین روش‌ها در احیای جنگل‌های زاگرس بذرکاری است. وجود مشکلاتی نظیر کمبود درختان مادری دانه‌زاد، تناوب سال بذردهی، وجود آفات و امراض فراوان و مشکلات نگهداری بذر در طولانی مدت سبب شده است تا تهیه بذر، با کیفیت خوب، برای برنامه‌های تولید نهال و احیا جنگل اغلب با مشکل روبرو شود (Alvaninejad et al., 2009). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که گونه بنه در چند دهه اخیر در بسیاری از نقاط ایران فاقد تجدید حیات مناسب بوده و این امر دلیل وقوع آتش‌سوزی در عرصه‌ها، عدم وجود درختان مادری مناسب بذرده، تاج پوشش نامناسب و عدم حضور گونه‌های درختچه‌ای و بوته‌ای به خصوص گونه بادام کوهی به عنوان گیاه پرستار بوده است (Salehi & Hoveyzeh, 2001; Shekarchian & Fatahi, 2001; Tahmasebi & Fatahi, 2001; Zahedi pour et al., 2006). به‌طور کلی عامل ارتفاع از سطح دریا یکی از عوامل محدودکننده گسترش گیاهان و درختان جنگلی است. در شمال ایران بسته به نقاط مختلف و شکل پستی و بلندی البرز حد بالای گسترش جنگل‌ها بین ۱۸۰۰ تا ۲۵۰۰ متر نوام دارد. این حد برای جنگل‌های غرب و جنوب‌غربی تا ۳۰۰۰ متر بالا می‌رود (Marvi Mohadjer, 2005). از طرفی اغلب صفات بذر و نهال با عوامل جغرافیایی (طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا) همبستگی معنی‌داری دارند (Bakshi & Rawat, 2011). جنگل‌های بنه (*Pistacia atlantica*) یکی از مهمترین عرصه‌های رها شده و در حال تخریب کشور بوده که سطحی حدود ۲/۴ میلیون هکتار از جنگل‌های خارج از شمال را به خود اختصاص می‌دهد (Tahmasebi & Fatahi, 2001). بنه از گونه‌های با ارزش شیب‌های جنوبی البرز و جنگل‌های زاگرس است که علاوه بر ارزش بوم‌شناختی ارزش‌های اقتصادی بسیار زیادی نیز دارند. بهره‌برداری بی‌رویه و غیراصولی از این گونه با ارزش، حیات آن را به مخاطره جدی روبه‌رو ساخته و موجب زوال آن در عرصه‌های جنگلی شده است (Fatahi, 1994). به‌واسطه وجود ارزش‌های متعدد این درخت و حفظ ذخائر توارثی آن، تلاش در جهت بازسازی و توسعه کشت آن از ضرورت‌های توسعه کشور است. گونه بنه اغلب به وسیله بذر و نهال توسعه می‌یابد، اما قطع درختان، چرای دام و خشکسالی، سالهاست که کاشت آن را در استان‌های بنه خیز، با شکست‌های پی‌درپی مواجه کرده است (Jahanpour et al., 2011). در رابطه با تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر مشخصات تولید

بذر و خصوصیات کمی و کیفی بذر درختان جنگلی تحقیقات اندکی در داخل و خارج صورت گرفته است که در ادامه مورد بررسی قرار می گیرد. حیدری و همکاران با هدف بررسی اثر ارتفاع بر مشخصه های کمی بذر بنه در جنگل باغ شادی شهر ستان خاتم، منطقه مورد مطالعه را به سه کلاسه ارتفاعی، شامل ارتفاع کمتر از ۲۱۰۰ متر، ارتفاع بین ۲۱۰۰ تا ۲۵۰۰ متر و ارتفاع بیشتر از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا تقسیم و در هر طبقه ارتفاعی، تعداد ۲۰ اصله و در مجموع ۱۶۰ اصله درخت بنه جهت جمع آوری نمونه بذر انتخاب کردند و سپس مشخصه های کمی شامل: وزن ۱۰۰۰ دانه، درصد پوکی، طول بذر و عرض بذر را در هر یک از کلاسه های ارتفاعی بررسی نمودند و نتیجه گرفتند تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر همه مشخصه های مورد بررسی، معنی دار است (Heydari et al., 2012). میرزایی ملاحمد و همکاران در پژوهشی تحت عنوان بررسی منابع بذری ذخیره گاه های بنه (*Pistacia atlantica*) در استان آذربایجان غربی، به منظور بررسی اثر ارتفاع بر مشخصه های کمی و کیفی بذر بنه، ذخیره گاه های مورد مطالعه را بسته به مساحت و دامنه تغییرات ارتفاعی (از ۱۴۵۰ تا ۲۰۰۰ متر) به سه تا پنج طبقه با ۱۰۰ متر اختلاف ارتفاع تقسیم و تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر مشخصه های کمی و کیفی بذر بنه را معنی دار ارزیابی کردند (Mirzaei Mola Ahmad et al., 2014). رحیم زاده و همکاران در پژوهشی تحت عنوان بررسی تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر مشخصه های کمی بذر بنه در ذخیره گاه بنه کلاه نوکان از توابع شهرستان سردشت، منطقه مورد مطالعه را به ۵ کلاسه ارتفاعی شامل ۱۵۵۰، ۱۶۵۰، ۱۷۵۰، ۱۸۵۰ و ۱۹۵۰ متر تقسیم کردند و نتیجه گرفتند که عامل ارتفاع از سطح دریا بر مشخصه های فیزیکی بذر بنه معنی دار و بر پوکی بذر بی معنی است (Rahimzadeh et al., 2022). حق دوست و اکبری نیا در پژوهشی با عنوان ریخت شناسی بذر توسکا در محدوده طرح جنگل داری گلبند نوشهر، اقدام به جمع آوری بذرها ی توسکا ییلاقی در یک گرادیان ارتفاعی با کلاسه بندی ارتفاعی ۵۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰ و ۱۷۰۰ متر نمود و نشان داد طول و عرض بذر با افزایش ارتفاع روند افزایشی دارد (Haghdoust & Akbarinia, 2014). در پژوهشی دیگر با هدف بررسی اثر ارتفاع از سطح دریا بر اندازه بذور و درصد جوانه زنی بلوط ایرانی، در سه ایستگاه ارتفاعی و در دو جهت جغرافیایی در رویشگاه ریمله شهرستان خرم آباد از توابع استان لرستان، اقدام به جمع آوری بذر از سه ارتفاع ۱۳۵۰، ۱۹۰۰ و ۲۴۵۰ متر بالاتر از سطح دریا و در دو جهت شمالی و جنوبی رویشگاه شد، نتایج نشان داد اثر ارتفاع از سطح دریا بر صفات طول بذر، قطر بذر و درصد جوانه زنی بذر با ۹۹ درصد اعتماد و بر وزن هزار دانه با ۹۵ درصد اعتماد، معنی دار است (Vereh Zardi et al., 2014). سیدی و زینالی در پژوهشی با عنوان تأثیر ارتفاع از سطح دریا بر جوانه زنی بذور و زیتوده نونهال های بلوط ایرانی، اقدام به جمع آوری بذور سالم از گونه بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lind) از چهار گرادیان ارتفاعی واقع در شهرستان بانه نمود، نتایج پژوهش نشان داد که اثر ارتفاع از سطح دریا روی صفت قطر، طول و وزن بذر معنی دار بود (Seyedi & Zeynali, 2019). شفیع زاده و همکاران در پژوهشی با عنوان اثر تغییرات ارتفاعی بر خصوصیات فیزیکی و فیزیولوژیکی بذر توسکا ییلاقی، در محدوده طرح جنگلداری واز، سری ۱ از شهرستان نور، به منظور بررسی روند تغییرات ویژگی های فیزیکی و فیزیولوژیکی، بذر گونه توسکا را در دامنه ارتفاعی ۲۰۰-۲۰۰۰ متر از سطح دریا با فواصل ارتفاعی ۵۰۰ متر، جمع آوری و پس از خالص سازی نسبت به اندازه گیری رطوبت، وزن هزار دانه، ابعاد و اندازه بذر و میوه، جوانه زنی و درصد پوکی بذر اقدام کردند و نشان دادند با افزایش ارتفاع، مقدار این مشخصه ها دارای روند افزایشی است (Shafizadeh et al., 2014). همه پژوهش های فوق در گرادیان های ارتفاعی متفاوت و با طبقات دارای حداقل ۳۰۰ متر اختلاف ارتفاع نسبت به هم، مشخصه های کمی و کیفی بذور

درختان جنگلی را مورد بررسی قرار داده و نتایج آن‌ها حاکی از معنی‌دار بودن تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر کمیت و کیفیت بذور است. نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد گونه بنه در بسیاری از نقاط ایران فاقد تجدید حیات مناسب بوده، کشت مصنوعی آن به دلایل مختلف با شکست مواجه شده و اغلب صفات بذر و نهال با عوامل جغرافیایی (ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی) همبستگی معنی‌داری دارد. با توجه به این موارد، تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا بر خصوصیات بذر دهی درختان بنه و بررسی ارتباط بین کمیت و کیفیت بذور تولیدی با تغییرات ارتفاعی، به بررسی تاثیر عامل ارتفاع از سطح دریا به عنوان عامل محدود کننده گسترش گیاهان که هم دما و هم میزان بارندگی و هم نوع بارندگی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بر وضعیت تولید بذر گونه بنه پرداخته تا بهترین دامنه ارتفاعی جهت تهیه بذر سالم و با کیفیت شناسایی شود. همچنین با توجه به این که گرادیان دمایی در زاگرس به صورتی است که با افزایش ۱۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا، دمای هوا معادل حدود ۰/۷ تا ۱ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد (Najafifar, 2009) لذا با توجه به این موضوع در این پژوهش هم به جهت ایجاد نوآوری نسبت به سایر تحقیقات مشابه و هم به جهت بررسی دقیق‌تر تاثیر عامل ارتفاع بر خصوصیات بذر بنه، فاصله طبقات ارتفاعی ۱۰۰ متری لحاظ شد (در تحقیقات مشابه فاصله طبقات چندصد متر است).

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه ذخیره‌گاه سوسستان یکی از چهار ذخیره‌گاه مهم بنه در استان آذربایجان غربی به مساحت ۴۳ هکتار است که در روستای سوسستان از توابع شهرستان سردشت بین طول ۵۳۵۲۲۱۶ تا ۵۳۵۱۵۷ شرقی و عرض ۴۰۳۴۱۹۵ تا ۴۰۳۳۲۹۲ شمالی واقع شده و گونه غالب آن بنه است، جهت شیب غالب جنوب و جنوب غربی، شیب غالب ۶۴٪، متوسط ارتفاع از سطح دریا در این ذخیره‌گاه ۱۶۱۵ متر است. برای بررسی پارامترهای مورد مطالعه شامل: طول خوشه، تعداد میوه در خوشه، طول میوه، عرض میوه، وزن میوه، وزن بذر و در صد پوکی بذر، ذخیره‌گاه مورد نظر به ۴ کلاسه ارتفاعی شامل ۱۵۱۵، ۱۶۱۵، ۱۷۱۵ و ۱۸۱۵ متر ارتفاع از سطح دریا تقسیم شد (عامل شیب، جهت جغرافیایی و خاک یکسان انتخاب شد)، مساحت ذخیره‌گاه در راستای افزایش ارتفاع از سطح دریا به قطعات نمونه یک هکتاری (۱۰۰×۱۰۰ متر) تقسیم گردید و در هریک از این قطعه نمونه‌ها آماربرداری ۱۰۰ در صد انجام گرفت (Zubairi, 2000) همچنین به منظور بررسی و مقایسه پایه‌های بذرده، سه پایه بذرده در هر قطعه نمونه شامل قطورترین پایه، کم قطرترین پایه و یک قطر میانه که پس از آماربرداری صد درصد مشخص شده بود، به طور تصادفی انتخاب و علامت‌گذاری گردید (Yuosefi, 2001). در مجموع تعداد ۶۰ درخت انتخاب و از هر پایه تعداد ۵ خوشه بطور تصادفی در جهات شمالی، جنوبی، شرقی، غربی و مرکز تاج جمع‌آوری و مشخصه‌های فیزیکی بذر در هر طبقه ارتفاعی بررسی شد. نمونه‌گیری از داده‌های حاصل از عملیات صحرائی و اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر، به کمک نرم افزارهای Excel و SPSS انجام شد و میانگین‌های مورد نظر محاسبه گردید. مقایسه میانگین‌ها و تجزیه واریانس به کمک آزمون F و آزمون مقایسه‌ای چندگانه دانکن و کروسکال والیس (برای داده‌های غیر نرمال مثل پوکی بذر) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه انحراف معیار و میانگین خصوصیات کمی بذر نشان داد که صفات مورد اندازه گیری شامل: طول خوشه، طول و عرض میوه، تعداد میوه در خوشه، وزن میوه و بذر در سطح اعتماد ۹۹ درصد در ارتفاعات مختلف از سطح دریا دارای اختلاف معنی دار هستند (جداول شماره ۱ و ۲).

جدول ۱- آنالیز واریانس صفات کمی بذر درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا، ذخیره گاه سوستان

Table 1. Analysis of variance of quantitative traits of seeds of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level, Sustan reservoir

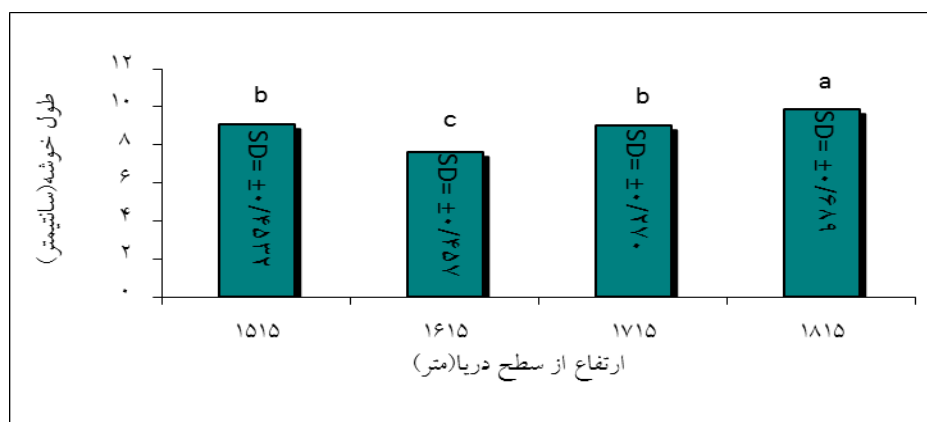
منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه- آزادی	میانگین مربعات	Fمیزان	سطح معنی- داری
طول خوشه	۴۲۱/۳۲۶	۳	۱۴۰/۴۲۲	۲۷/۷۲۹	۰/۰۰۰
خطا	۳۲۸۲/۰۹۸	۶۴۱	۱۲		
کل	۳۷۰۳/۴۲۴	۶۴۴			
تعداد میوه در خوشه	۱۵۷/۲۸۹۲	۳	۹۶۴/۰۵۲	۱۴/۶۳۱	۰/۰۰۰
خطا	۴۲۲۳۶/۹۲۲	۶۴۱	۶۵/۸۹۲		
کل	۴۵۱۲۹/۰۷۹	۶۴۴			
طول میوه	۲۴۹/۶	۳	۲/۰۸۳	۴/۱۹۴	۰/۰۰۰
خطا	۳۱۸/۳۹۹	۶۴۱	۰/۴۹۷		
کل	۳۲۴/۶۴۸	۶۴۴			
عرض میوه	۵۰۷/۵۴	۳	۱۸/۱۶۹	۳۹/۶۱۸	۰/۰۰۰
خطا	۲۹۳/۹۶۲	۶۴۱	۰/۴۰۷۴۵۹		
کل	۳۴۸/۴۶۹	۶۴۴			
وزن میوه	۰/۰۷	۳	۰/۰۲۳	۱۱/۵۰۱	۰/۰۰۰
خطا	۰/۲۹۲	۶۴۱	۰/۰۰۲		
کل	۰/۳۶۱	۶۴۴			
وزن دانه	۰/۰۰۸	۳	۰/۰۰۳	۶/۱۳۱	۰/۰۰۰
خطا	۰/۲۶۶	۶۴۱	۰/۰۰۰		
کل	۰/۲۷۴	۶۴۴			

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار صفات کمی بذر درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا، ذخیره گاه سوستان

Table 2. Comparison of the mean and deviation of quantitative traits seeds of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level, Sustan Reservoir.

ارتفاع از سطح دریا	طول خوشه		تعداد میوه در خوشه		طول میوه		عرض میوه		وزن میوه		وزن دانه		درصد پوکی بذر	
	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
۱۵۱۵	۹/۰۶۴۶	۰/۴۵۳۲	۲۱/۰۵۷	۱/۲۹۴	۴/۸۲۰۹	۱/۱۹۲	۳/۵۳۷۲	۰/۱۴۱	۰/۱۴۸۹	۰/۰۰۷	۰/۰۱۹۷	۰/۰۰۱	۴۲/۸۸	۱/۷۱
۱۶۱۵	۷/۶۲۲۸	۰/۴۵۷	۲۳/۷۵۹۳	۰/۹۵	۴/۶۸۴۹	۲/۲۳۴	۲/۸۷۸۱	۰/۱۴۳	۰/۱۳۳	۰/۰۰۶	۰/۰۲۱۷	۰/۰۰۰۸	۳۵/۸۴	۲/۱۵
۱۷۱۵	۹/۰۱۱۵	۰/۲۷۰	۲۵/۵۱۲۵	۱/۷۸	۴/۹۵۸۱	۲/۲۹۹	۳/۴۰۸۸	۰/۲۸۳	۰/۱۶۵۴	۰/۰۱۳	۰/۰۲۴۶	۰/۰۰۰۷	۳۳/۱۱	۱/۶۵
۱۸۱۵	۹/۸۵۵۸	۰/۶۸۹	۲۶/۶۹۷	۱/۰۶۷	۴/۷۷۶۶	۲/۲۸۶	۲/۹۱۹۵	۰/۰۸۷	۰/۱۵۹	۰/۰۰۳	۰/۰۲۸۸	۰/۰۰۲	۳۸/۶	۳/۰۸

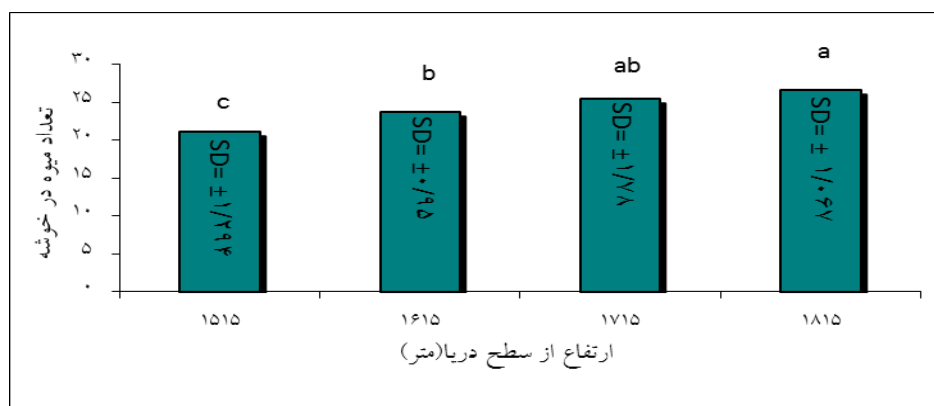
طول خوشه با افزایش ارتفاع از طبقه دوم ارتفاعی دارای روند افزایشی بود. نتایج آزمون دانکن نشان داد که طول خوشه در طبقه ارتفاعی ۱۸۱۵ متر با میانگین ۹/۸ سانتی متر به شکل معنی داری ($p \leq 0.1$) بیشتر از سایر طبقات است و طبقه ۱۶۱۵ متر نیز با میانگین ۷/۶ سانتی متر کمتر از سایر طبقات است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه طول خوشه درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 1. Comparison of cluster length of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level

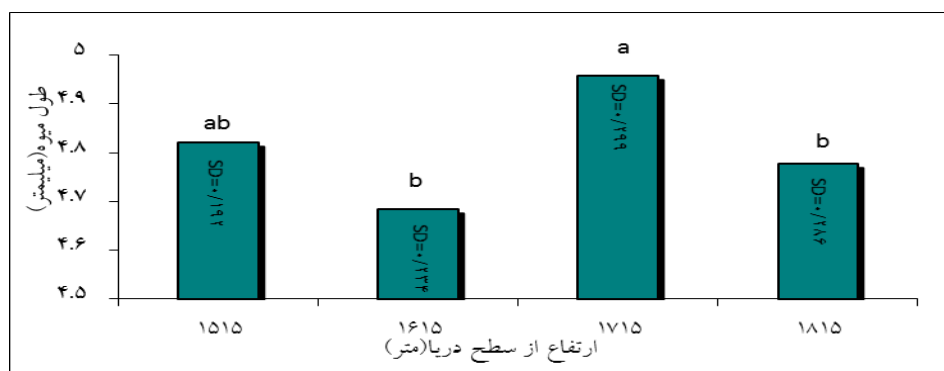
تعداد میوه در خوشه با افزایش ارتفاع دارای روند افزایشی بود. نتایج آزمون دانکن نشان داد تعداد میوه در خوشه در طبقه ارتفاعی ۱۸۱۵ با میانگین ۲۶/۷ عدد میوه در خوشه در سطح اعتماد ۹۹ درصد بیشتر از طبقات ۱۵۱۵ و ۱۶۱۵ متر بوده و با سایر طبقات اختلاف معنی دار ندارد. همچنین طبقه ۱۵۱۵ به طور معنی داری با میانگین ۲۱ عدد میوه در خوشه دارای تعداد میوه کمتر از سایر طبقات است (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه تعداد میوه در خوشه درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 2. Comparison of the number of fruits in clusters of pistacia atlantica trees at different altitudes

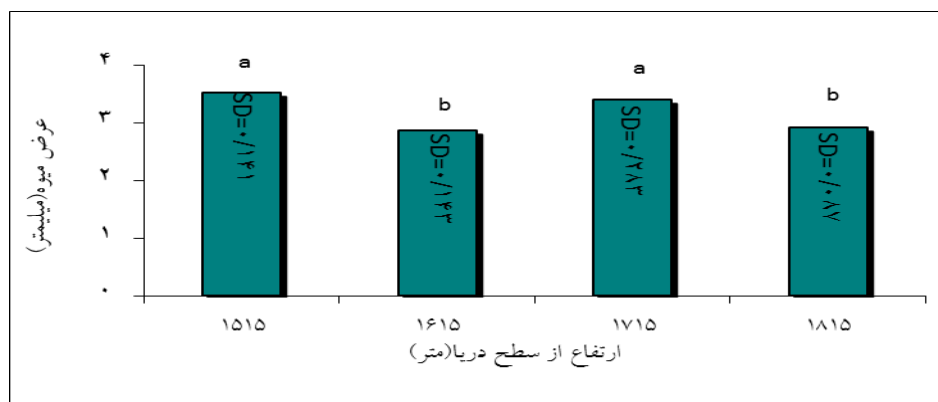
طول میوه با افزایش ارتفاع دارای روند نامنظم بود. نتایج آزمون دانکن نشان داد طبقه ارتفاعی ۱۷۱۵ متر با میانگین طول میوه معادل با ۴/۹۵ میلیمتر در سطح اعتماد ۹۹ درصد بیشتر از طبقات ارتفاعی ۱۶۱۵ و ۱۸۱۵ متری بوده ولی با طبقه ارتفاعی ۱۵۱۵ متری دارای اختلاف معنی دار نیست. همچنین طبقه ارتفاعی ۱۶۱۵ متر در همین سطح اعتماد دارای طول میوه کمتر از طبقه ۱۷۱۵ بوده و دارای اختلاف معنی دار است ولی با سایر طبقات اختلاف معنی دار ندارد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه طول میوه درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 3. Comparison of fruit length of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level

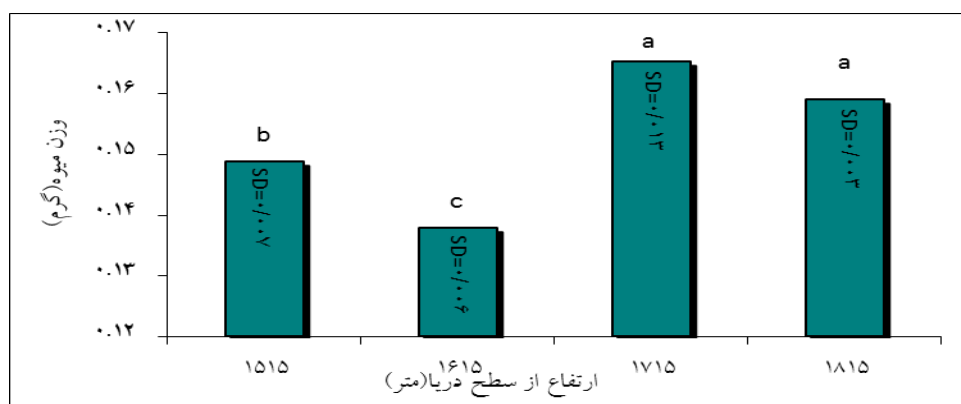
عرض میوه با افزایش ارتفاع روند نامنظمی نشان داد، طبقه ارتفاعی ۱۵۱۵ با میانگین عرض میوه معادل ۳/۵۳ میلی متر به ترتیب دارای بیشترین عرض میوه بوده و دارای اختلاف معنی دار نسبت به طبقات ۱۶۱۵ و ۱۸۱۵ متر است ولی با طبقه ۱۷۱۵ اختلاف معنی دار نداشت. ضمناً عرض میوه در طبقه ۱۶۱۵ در سطح اعتماد ۹۹ درصد دارای اختلاف معنی دار با طبقات ۱۵۱۵ و ۱۷۱۵ بوده و از عرض میوه کمتری نسبت به دو طبقه یاد شده برخوردار بوده ولی با طبقه ۱۸۱۵ اختلاف معنی دار نشان نداد (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه عرض میوه درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 4. Comparison of fruit width of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level

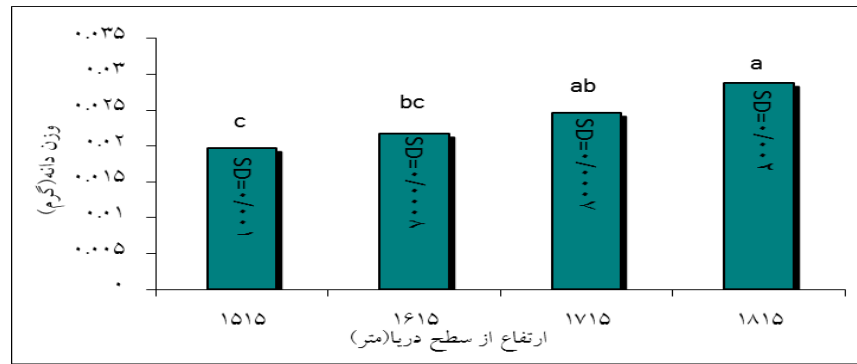
وزن میوه با افزایش ارتفاع دارای روند نامنظم بود. نتایج آزمون دانکن نشان داد که طبقه ارتفاعی ۱۷۱۵ با میانگین وزن میوه معادل ۰/۱۶۵۴ گرم دارای بیشترین وزن میوه نسبت به طبقات ۱۵۱۵ و ۱۶۱۵ بوده و اختلاف آن با طبقات یاد شده معنی دار است اما با طبقه ۱۸۱۵ اختلاف معنی دار نداشت. همچنین وزن میوه در طبقه ۱۶۱۵ با اعتماد ۹۹ درصد با همه طبقات دارای اختلاف معنی دار بوده و دارای کمترین مقدار است (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه وزن میوه درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 5. Comparison of fruit weight of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level

وزن دانه یا بذر با افزایش ارتفاع دارای روند افزایشی بود. نتایج دانکن نشان داد وزن بذر در طبقه ۱۸۱۵ متر با میانگین ۰/۰۲۸۸ گرم بیشتر سایر طبقات است. این اختلاف با طبقات ۱۶۱۵ و ۱۵۱۵ متر معنی دار ولی با طبقه ۱۷۱۵ متر معنی دار نیست. طبقه ۱۵۱۵ متر دارای وزن میوه کمتر از همه طبقات است و اختلاف آن فقط با طبقه ۱۶۱۵ متر معنی دار نیست (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه وزن دانه یا بذر درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 6. Comparison of seed weight of pistacia atlantica trees at different altitudes above sea level

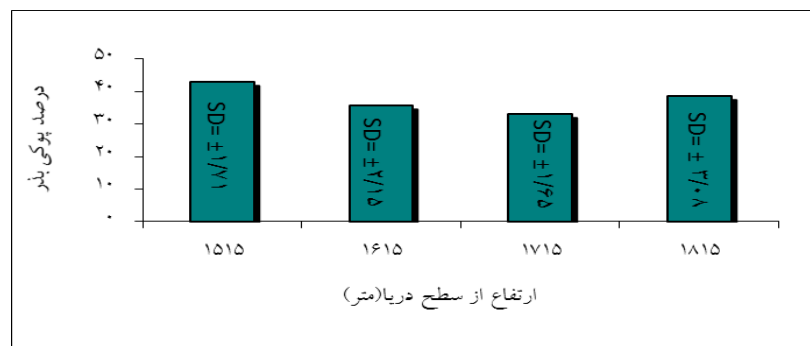
همچنین تجزیه و تحلیل آماری مقایسه درصد پوکی بذر درختان بنه در ارتفاعات مختلف از سطح دریا توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که اختلاف معنی داری در این خصوص وجود ندارد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه ناپارامتری درصد پوکی بذر در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Table 3. Nonparametric comparison of seedlessness at different altitudes above sea level

ذخیره گاه	خی-اسکویر	درجه آزادی	سطح معنی داری
سوستان	۵۵۴/۰	۳	۹۰۷/۰

نتایج دانکن در خصوص درصد پوکی بذر نشان داد که تفاوت بین طبقات بی معنی است و درصد پوکی بذر در طبقات ارتفاعی ۱۵۱۵ تا ۱۷۱۵ کاهشی و سپس افزایش می یابد و بیشترین درصد پوکی بذر در ارتفاع ۱۵۱۵ متر و کمترین مقدار آن در ارتفاع ۱۷۱۵ متر دیده می شود (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه درصد پوکی بذر در ارتفاعات مختلف از سطح دریا

Figure 7. Comparison of seedlessness at different altitudes above sea level

در مجموع ارتفاع ۱۸۱۵ دارای بالاترین میزان طول خوشه، تعداد میوه در خوشه و وزن دانه، ارتفاع ۱۷۱۵ دارای بالاترین میزان وزن میوه و طول میوه و ارتفاع ۱۵۱۵ دارای بیشترین مقدار عرض میوه است که نشان دهنده سازگاری بیشتر درختان بنه در این ذخیره گاه در ارتفاعات مذکور برای تولید میزان بیشینه مشخصه های مورد ارزیابی است. مقایسه نتایج این تحقیق با سایر تحقیقات

مشابه، نشان از تاثیر محیط و ارتفاع رویشگاه در خصوصیات مورد مطالعه دارد. حیدری (Heidary et al., 2012) در تحقیقی با هدف بررسی تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر مشخصات کمی بذر بنه در جنگل باغ شادی یزد نشان داد، دامنه ارتفاعی ۲۱۰۰ تا ۲۵۰۰ متر دارای بالاترین میزان خصوصیات طول و عرض بذر به ترتیب با میانگین ۹ و ۷ میلی متر است. اما در تحقیق حاضر بالاترین میزان خصوصیات طول و عرض میوه، به ترتیب در دامنه ارتفاعی ۱۷۱۵ و ۱۵۱۵ متر با میانگین ۴/۹۶ و ۳/۵۳ میلی متر دیده شد که نشان از ریز بودن دانه های بذور رویشگاه تحقیق حاضر نسبت به رویشگاه یاد شده است (طول و عرض بذر تقریباً نصف میانگین های این مشخصه ها در تحقیق یاد شده است). در مورد خصوصیت میانگین وزن هزار دانه در تحقیق حاضر، دامنه ارتفاعی ۱۸۱۵ متر با متوسط ۲۸/۸ گرم دارای بالاترین میانگین وزن هزار دانه است که در مقایسه با تحقیق حیدری (Heidary et al., 2012) با میانگین ۵۰ گرم در جنگل باغ شادی یزد، باز مقدار خیلی کمتری را نشان می دهد. وجود چندین تفاوت هایی خود بیانگر تاثیر شرایط اقلیمی بر خصوصیات بذرها و لزوم بررسی شرایط محیطی برای انتخاب گیاهان مادری مناسب است. میرزایی ملاحمد و همکاران (Mirzaei Mola Ahmad et al., 2014) در بررسی و مطالعه ذخیره گاه بنه شیخ رش از توابع شهرستان شاهیندژ در سه کلاسه ارتفاعی ۱۶۵۰، ۱۷۵۰ و ۱۸۵۰ نتیجه گرفتند که طول خوشه با افزایش ارتفاع دارای روند کاهشی و وزن میوه دارای روند افزایشی است و بیشترین مقدار این دو مشخصه به ترتیب در طبقه ارتفاعی ۱۶۵۰ متر با میانگین طول خوشه معادل ۹/۲۶ سانتی متر و طبقه ارتفاعی ۱۸۵۰ با میانگین وزن میوه معادل ۰/۲۱۶۸ گرم دیده شد. تعداد میوه در خوشه، طول میوه، عرض میوه و وزن دانه با افزایش ارتفاع روند نامنظم داشت و بیشترین مقدار این مشخصه ها به ترتیب در ارتفاعات ۱۷۵۰ با میانگین ۱۹/۹۱ عدد میوه، طبقه ارتفاعی ۱۸۵۰ با میانگین طول میوه ۶/۵۸ میلی متر، طبقه ارتفاعی ۱۶۵۰ با میانگین عرض میوه ۵/۸۰ میلی متر و طبقه ۱۸۵۰ با میانگین وزن دانه ۰/۳۹۹ گرم دارای بالاترین مقدار بود. نتایج این تحقیق با پژوهش حاضر در مورد مشخصه های طول خوشه، تعداد میوه در خوشه و وزن میوه و دانه متفاوت، و در مورد سایر مشخصه ها (طول و عرض میوه) همسو است. رحیم زاده و همکاران (Rahimzadeh et al., 2022) در بررسی ذخیره گاه کلاه نوکان از توابع شهرستان سردشت نشان دادند که طول خوشه با افزایش ارتفاع دارای روند کاهشی و تعداد میوه در خوشه، طول و عرض میوه و وزن میوه و دانه با افزایش ارتفاع دارای روند نامنظم است که نتایج این پژوهش نیز در مورد مشخصه های طول خوشه، تعداد میوه در خوشه و وزن دانه با پژوهش حاضر متفاوت و در مورد طول، عرض و وزن میوه همسو است. حیدری (Heidary, 2012) در تحقیق دیگری نتیجه گرفت که در صد پوکی بذر با افزایش ارتفاع در سطح اعتماد ۹۹ درصد معنی دار بوده ولی در پژوهش حاضر تغییرات درصد پوکی بذر با افزایش ارتفاع معنی دار نبود. در تحقیقات میرزایی ملاحمد و همکاران (Mirzaei Mola Ahmad et al., 2014) و رحیم زاده و همکاران (Rahimzadeh et al., 2022) تغییرات درصد پوکی بذر با افزایش ارتفاع بی معنی برآورد شد که با نتایج این پژوهش همسو است. سایر تحقیقاتی که بر روی دیگر گونه ها انجام شده باز حاکی از معنی دار بودن تاثیر عامل ارتفاع بر روی خصوصیات بذر درختان است. شفیعی زاده (Shafizadeh et al., 2014) در تحقیقی جهت بررسی تاثیر ارتفاع بر خصوصیات فیزیکی و فیزیولوژیکی بذر توسکای ییلاقی بیشترین طول و عرض بذر را در ارتفاع ۱۵۰۰ متر از سطح دریا برآورد کرد. همچنین سیدی و زینالی یادگاری (Seyedi, & Zeynali Yadegari, 2019) در تحقیقی نشان دادند که افزایش ارتفاع از سطح دریا روی صفت قطر، طول و وزن بذر بلوط معنی دار است. وجود چنین شباهت ها و تفاوت هایی اولاً بیانگر تاثیر شرایط اقلیمی (میزان بارش، نوع

بارش، پراکنش بارش، دما، نور، حرارت و غیره) بر خصوصیات درختان و تولید بذر است، ثانيا شرایط محیطی که متاثر از موقعیت جغرافیایی رویشگاه است در تمام پژوهش‌هایی که مرور شد، متفاوت بوده و باعث بروز تغییر در نتایج تحقیقات می‌شود، ثالثا ارتفاع کمینه و بیشینه گسترش درخت بنه در تمام این تحقیقات با هم تفاوت دارد یعنی شرایط محیطی و اقلیمی و خواص‌های اکولوژیکی گونه‌ها تعیین می‌کند که در چه ارتفاعی چه گونه‌ای گسترش پیدا کند. بنابراین یکی دیگر از دلایل تفاوت در نتایج این پژوهش‌ها متفاوت بودن ارتفاع رویشگاه بنه در پژوهش‌های فوق است.

نتیجه گیری

نتایج تجزیه واریانس بر روی خصوصیات فیزیکی بذر پسته وحشی در ذخیره‌گاه سوستان در استان آذربایجان غربی نشان داد که همه صفات، در ارتفاعات مختلف از سطح دریا با هم اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد دارند. طول خوشه، وزن دانه و تعداد میوه در خوشه با افزایش ارتفاع، روند افزایشی داشته و عرض میوه و درصد پوکی بذر با افزایش ارتفاع، کاهش نشان می‌دهد. همچنین وزن میوه و طول میوه دارای تغییرات نامنظم است. تغییرات درصد پوکی بذر با افزایش ارتفاع معنی دار نبود. درصد پوکی بذر می‌تواند به دلایلی چون عدم انجام گرده افشانی مناسب، مشکلات تولید مثل جنسی، وجود گل‌های ناقص در بنه، ناسازگاری والدین و غیره باشد، که نیاز به بررسی و مطالعه دارد. اما با وجود همه عوامل تاثیر گذار در میزان پوکی بذر، طبقه ارتفاعی ۱۷۱۵ متر دارای پایین‌ترین میزان پوکی بذر نسبت به سایر طبقات بوده و از نظر خصوصیات فیزیکی نظیر طول میوه و وزن میوه دارای بالاترین و از نظر طول خوشه، تعداد میوه در خوشه، عرض میوه و وزن دانه تقریبا از بهترین مقدار برخوردار است. بنابراین طبقه ارتفاعی ۱۷۱۵ متر به جهت داشتن بالاترین میزان درصد بذر سالم، برای بذرگیری مناسب‌تر است. اما نتایج کلی این تحقیق نشان داد که اولاً ارتفاع از سطح دریا بر بذردهی و خصوصیات فیزیکی بذر درختان بنه موثر است و ثانيا اختلاف ارتفاع در حد ۱۰۰ متر همانطور که باعث کاهش دما بین ۰/۷ تا ۱ درجه سانتی‌گراد در ارتفاعات زاگرس می‌شود (Najafifar, 2009) در ایجاد تغییرات در خصوصیات فیزیکی بذر بنه نیز موثر است.

منابع

- Alvaninejad, S., Tabary, M., Taghvaei, M., Espahbodi, K. and Hamzehpur, M. (2009). Effect of desiccation on germination and vigor of Manna Oak (*Quercus brantii* Lindl.) acorns, Iranian Journal of forest and poplar research, 16(4): 574-582. (In Persian).
- Fattahi, M. (1994). Study on Zagros oak forests and the most important their destruction causes. Research Institute of Forest and Rangelands Press, Tehran, 63 p. (In Persian)
- Fattahi, M. (1995). Morphology of wild pistachio seeds. Collection Papers of the first national seminar of pistachio, 3rd to 4th November, Center Research of natural resources and livestock affairs of Ilam province Forests and Rangelands, 63 pp.
- Haghdoust, N. and Akbarinia, M. (2014). Seed morphology, germination characteristics and growth of *Alnus subcordata* in an altitude gradient. Natural Ecosystems of Iran, 5 (3), 71-83.
- Haidari, M., Etemad, V., Khosropour, E. and Shabanian, N. (2012). Impact of altitude on the quantitative characteristics of Pistacia seed from the Iran-o-Turani ecological forest (Case Study: Baghe-shadi forest, Yazd)

- Journal of Renewable Natural Resources Research. Third year. The first number. Spring (2012) Seventh consecutive. 13-20.
- Jahanpour, F., Fatahi, M., and Karamian, R. (2011). Studying of light effect on survival of seed seedling of *Pistacia atlantica* in Khorram-Abad, Lorestan, Iran. Iranian Journal of Forest, 3: 91-98.
- Ke, W. and Zhong, Z.C. (2000). The variation of seed sizes of *Gordonia acuminata* geographic population and its effect on seed germination and seedling. Acta Ecologica Sinia, 20(4): 697-701
- Marvi Mohadjer, M.R. (2005). Silviculture. University of Tehran Press, Tehran, 385p (In Persian).
- Mirzaei Mola Ahmad, R., Paato, M., Moradi, A., Houshyar, M., and Rahimzadeh, Gh. (2014). Comparison of seed resources of *Pistacia atlantica* reserves in western Azerbaijan province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, 144.
- Najafifar, A. (2009). Ecological capability assessment report of Ilam province, report of landuse planning plan of Ilam province. Ilam Governor's Office Publications, Ilam, Iran. 64p. (In Persian).
- Rahimzadeh, Gh., Najafifar, A., and Mirzaei Mola Ahmad, R. (2022) Investigation of the effect of above sea level on quantitative characteristics of *Pistacia atlantica* seeds in North Zagros forests (Case study: of Kolah Nokan reserve in West Azarbaijan province). Forest and Wood Products, Vol. 74, No. 4, Winter 2022, University of Tehran.
- Rawat, K. and Bakshi, M. (2011). Provenance variation in cone, seed and seedling characteristics in natural populations of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks (Blue Pine) in India, Annals of Forest Research, 54(1): 39-55
- Salehi, H. and Hoveyze, H. (2001). *Pistacia atlantica*'s habitat characteristics and nature in southern Zagros, Proceedings of *Pistacia atlantica* Desf. second national conference, Fars province, Research Institute for Forests and Rangelands, 1st volume, 171-186 pp.
- Seyedi, N. and Zeynali Yadegari, L. (2019). Effect of altitude on seed germination and biomass of *Quercus branti*. Journal of Forest Research and Development, Vol. 5, No. 3
- Shafizadeh, F., Rezaei, Gh., Yazdian, F. and Hedayati, M.A. (2014). The Effect of Altitude Changes on Physical and Physiological Characteristics of *Alnus Subcordata* C.A. Mey. Case Study Vaz Forestry Plan Series 1, Iranian Journal of Natural Ecosystems, Volume 5, Number 1. Spring. 15-21
- Shekarchian, A. and Fatahi, M. (2001). The role of protection from grazing on sexual and nonsexual regeneration of *Pistacia atlantica* forests in Khabar area, Baft city, Iran. Second national conference about *Pistacia atlantica* in Fars, Research Institute of Forests and Rangelands, 478-483.
- Tahmasebi, M. and Fattahi, M. (2001). Study the ecological factors with *Pistacia atlantica*'s qualitative and quantitative factors in Ilam, Proceedings of *Pistacia atlantica* Desf. second national conference, Fars province, Research Institute for Forests and Rangelands, 1st volume, 145-170 pp.
- Tahmasebi, P. (2015). Ecology of Plant Communities, Shahrekord University Press. 274 pp. in Persian).
- Vereh Zardi, Z., Etemad, V., Nemiranian, M. and Atarod, P. (2014). The effect of altitude on seed size and germination percentage of *Quercus brantii* (Case study: Rimleh region of Khorramabad, Lorestan), 2nd National Forest Science Student Conference, Karaj
- Yanlong, E. (2007). Seed size effect on seedling growth under different light conditions in the clonal herb *Ligularia virgaurea* in QinghaiTibet Plateau. Acta Ecologica Sinica, 27(8): 3091-3108.
- Yuosefi, B. (2001). Comparative study of ecological and genetic characteristics of pistachio populations (*Pistacia atlantica*) in Kurdistan. Iranian Journal of Forest and Poplar Research (7). Pp. 99-65.
- Zahedi pour, H., Fattahi, M. and Mirdavoodi Akhavan, H.R. (2006). Study *Pistacia* spp.'s distribution and their habitat qualitative and quantitative characteristics in Saghez mountain Markazi province. Iranian Journal of Biology, 20(2): 190-202.

Zubairi, M. (2000). Forest inventory measurement of tree and forest. Second edition. University of Tehran Press. No. 2238. 401 p.

Investigation of the effect of altitude from the sea level on physical properties of *pistacia atlantica* seeds
(Case study: of Sustan Reserves in West Azerbaijan province)

Gh. Rahimzadeh^{*1}, R. Mirzaei Mola Ahmad²

Received: 2021/5/8

Acceptance: 2021/7/19

Abstract

Introduction: Seed production is one of the key factors in the regeneration of plants and trees and is widely used in regeneration, forest development, afforestation and especially seedling production in nurseries. Therefore, it is very important to select quality and ripe seeds with suitable physical shape. In general, elevation is one of the factors limiting the spread of plants.

Methods: The aim of this study was to investigate the effect of altitude factor on the physical properties of *pistacia atlantica* seeds in Sustan Reserve, which is one of the four *pistacia atlantica* reserves in West Azerbaijan Province. The reserve was divided into 4 altitude classes including 1515, 1615, 1715 and 1815 meters above sea level. In each sample plot, three stems and from each stalk 5 clusters were randomly collected and the physical characteristics of the seeds included: cluster length, number of fruits per cluster, fruit length, fruit width, fruit weight, seed weight and percentage of seedlessness in each Elevation class was examined. Data were analyzed using Excel and SPSS software and the means were compared and the analysis of variance was performed using F-test, Duncan multiple comparison test and Kruskal-Wallis test.

Results & Discussion: The results showed that all traits except the percentage of seed voids at different altitudes at sea level have a significant difference in the level of 99% confidence. Cluster length and number of fruits per cluster increased with increasing height, fruit length, width and weight had an irregular trend with increasing height. The highest length and weight of fruits were seen at 1715 meters and the lowest amount at 1615 meters. Seed weight showed an increasing trend with increase in height. The percentage of seedlessness was the lowest in the middle elevations of the basin.

Keywords: *Altitude, Fruit length, Frut weight, Fruit width, Pistacia atlantica forest, Seedlessness, seed weight.*

¹ PhD student in forestry of Tehran University, forest division expert, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural research, education and promotion organization (AREEO), Tehran, I.R.Iran, (*Corresponding Author's: gh.rahimzadeh@ut.ac.ir)

² Assist., Prof., Agricultural Education and Extension Institute, (AREEO), Tehran, I.R.Iran

بررسی مقایسه‌ای و تلفیقی کشندگی چند آفت‌کش میکروبی، شیمیایی و گیاهی روی تریپس گندم *Haplothrips tritici* K. (Thysanoptera: Phlaeothripidae) در شرایط آزمایشگاهی

فرشید شکوهی نیا^۱؛ علی میرشکار^{۲*}؛ عباس خانی^۳

چکیده

تلفیق حشره‌کش‌های زیستی و شیمیایی جهت کنترل تریپس گندم و کاهش دوز حشره‌کش‌های شیمیایی بسیار حائز اهمیت است. لذا در این تحقیق، کارایی حشره‌کش‌های گیاهی (تنداکسیر و پالیزین) و میکروبی (*Bacillus thuringiensis*) در مقایسه با حشره‌کش‌های شیمیایی تیاکلوپرید و تیاکلوپرید+دلتامترین بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار شامل غلظت‌های حشره‌کش‌های مورد استفاده و در سه تکرار انجام شد. بر اساس کمترین LC_{50} یک حشره‌کش شیمیایی و یک حشره‌کش گیاهی انتخاب شد. غلظت‌های LC_{15} و LC_{30} آنها با حشره‌کش میکروبی تلفیق و ۴۸ ساعت بعد تلفات محاسبه گردید. با افزایش غلظت حشره‌کش‌های شیمیایی و گیاهی، تلفات افزایش یافت. کمترین LC_{50} مربوط به حشره‌کش‌های تیاکلوپرید+دلتامترین و پالیزین بود که در تلفیق با حشره‌کش میکروبی استفاده شد. بیشترین تلفات (۷۶/۶۷ درصد) مربوط به تیمار تلفیقی B.t+تیاکلوپرید+دلتامترین LC_{15} بود که می‌توان آن را پس از مطالعات مزرعه‌ای به عنوان یک جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی برای محافظت گندم از تریپس در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات توصیه کرد.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش گیاهی، باکتری بیمارگر حشرات، بیسکابا، پروتئوس، کنترل تلفیقی، مهار زیستی

۱. دانشجوی ارشد سابق گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. استادیار گروه گیاهپزشکی (نویسنده مسئول)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل (* نویسنده مسئول: mirshekar@uoz.ac.ir)

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

مقدمه

گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) بیشترین تولید و سطح زیر کشت را در ایران و جهان دارد و بخش زیادی از نیازهای غذایی بشر را تامین می‌کند (Giraldo et al., 2019). تلفات گندم، از آفاتی که به سطح فتوسنتزی و اندام‌های مولد گیاه آسیب می‌رسانند، با میزان آسیب به گیاهان و مقاومت آنها در برابر آسیب تعیین می‌شود (Kozulina et al., 2019). آفاتی همچون تریپس که به برگ، سنبله و دانه این محصول آسیب می‌رسانند از نظر اقتصادی بسیار نگران کننده هستند (Kozulina et al., 2019; Kozulina et al., 2021). تریپس گندم (Thysanoptera: Phlaeothripidae) (*Haplothrips tritici* (Kurdjumov) یک آفت مکنده مهم در مزارع گندم است که به علت سازگاری با شرایط اقلیمی مختلف در سراسر دنیا پراکنده است (Ivantsova et al., 2017). حشره کامل آن به سطح فتوسنتزی گیاه (برگ، گلوم و ریشک) آسیب می‌زند و لارو آن باعث آسیب دانه، تخمدان و گل می‌شود و نهایتاً سبب کاهش عملکرد و ارزش نانواپی گندم می‌شود (Kozulina et al., 2021).

در کنترل آفات از روش‌های مختلف زراعی، ارقام مقاوم، عوامل زیستی و حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود (Baker et al., 2020). آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات موثرتر اند، اما کاربرد آنها تأثیرات منفی بر سلامت انسان و محیط‌زیست دارد و نیز کاربرد مداوم آنها می‌تواند در حشرات مقاومت ایجاد کند (Wakgari & Yigezu, 2018). مدیریت تلفیقی آفات برای بهره‌برداری از تعامل بین عوامل کنترل زیستی و شیمیایی به دنبال توسعه آفت‌کش‌های انتخابی است. از این‌رو کاربرد سموم کم‌دوام و ناپایدار که برای آفت هدف بسیار تخصصی هستند، اهمیت دارد. همچنین کاربرد آفت‌کش‌های زیستی در ترکیب با آفت‌کش‌های شیمیایی مقرون به صرفه‌تر است (Ouma et al., 2014). کاربرد برنامه‌های مدیریت تلفیقی در جهت محافظت گیاهان در برابر آفات سازگار با محیط‌زیست است. در این زمینه، استفاده از حشره‌کش‌های گیاهی و کاربرد دشمنان طبیعی حشرات، به خصوص عوامل بیماری‌زای حشرات مثل باکتری‌ها، یک راهکار جایگزین مفید است (Wakgari & Yigezu, 2018; Fernández-Chapa et al., 2019).

پروتئوس[®] با نام عمومی تیاکلوپراید+دلتامترین ۱۱ درصد OD است (Soleymanzade et al., 2017)؛ تیاکلوپراید موجود در حشره‌کش پروتئوس[®] دارای خاصیت تماسی، گوارشی و سیستمیک است و با ایجاد اختلال در انتقال پیام‌های عصبی واقع در سیستم عصبی حشره، باعث مرگ آن می‌شود. دلتامترین دارای خاصیت تماسی و غیر سیستمیک است که وجود آن در حشره‌کش پروتئوس سبب مسدود شدن کانال‌های سدیم در سطح سلول‌های عصبی حشره و در نهایت باعث فلج شدن و مرگ آن می‌شود. پروتئوس دارای اثر ضربه‌ای، ضد تغذیه‌ای و نیز دوام اثر طولانی است. این حشره‌کش برای کنترل بسیاری از آفات مثل عسلک، شته و تریپس است و با آفت‌کش‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و کودهای ریزمغذی قابل اختلاط است (Soleymanzade et al., 2017; Behnam-Oskuyee et al., 2020).

در مطالعه اثرات کشنده مخلوط تیاکلوپراید+دلتامترین روی شته پنبه در گیاه خیار در آزمایش زیست‌سنجی تلفات-غلظت (دامنه غلظت ۵۲/۲۵ - ۳/۳ در هزار) مشخص شد که شته پنبه تحت تأثیر منفی تیاکلوپراید+دلتامترین به‌ویژه در بالاترین غلظت قرار گرفت و باروری و زنده‌مانی شته کاهش یافت (Majidpour et al., 2020). با بررسی اثرات سمیت حاد حشره‌کش‌های

۱. حشره‌کشی سیستمیک، گوارشی و تماسی است که حاوی فرمولاسیون جدید او-دی یا روغن قابل انتشار است.

نئونیکوتینوئیدی استامی‌پرید، تیاکلوپراید، ایمیداکلوپراید و تیمتوکسام بر شته سبز هلو در گیاهچه فلفل مشخص شد که میزان LC_{50} برای تیاکلوپراید کمتر از دیگر حشره‌کش‌ها بود و تلفات بیشتری را در شته سبز هلو ایجاد کرد (Lin *et al.*, 2021). با مطالعه اثر حشره‌کش‌های فلوپیرادیفورون (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ در هزار)، اسپروتترامات (۰/۵ در هزار) و تیاکلوپراید (۰/۵ در هزار) به همراه آبیاری روی پوره پسیل پسته در باغ پسته گزارش شد که هفت روز پس از سم‌پاشی، کمترین تعداد پوره پسیل زنده (۲/۲۷ پوره) مربوط به تیمار تیاکلوپراید بود (Gheibi & Taheri, 2017). در بررسی اثرات کشندگی سه حشره‌کش شیمیایی لامبداسی‌هالوترین (۷۵ میلی-لیتر در هکتار)، دلتامترین+تیاکلوپراید (۱۰۰۰ میلی‌لیتر در هکتار) و دلتامترین (۳۰۰ میلی‌لیتر در هکتار) و دو عصاره گیاهی تجاری پالیزین و سیرینول (۱۰۰۰ میلی‌لیتر در هکتار) روی سن گندم مشخص شد که حشره‌کش دلتامترین+تیاکلوپراید با میانگین تلفات ۱۰۰ درصد بیشترین کارایی را در کنترل حشرات بالغ سن داشت و عصاره‌های گیاهی اثر حشره‌کشی کمتری داشتند (Honarmand *et al.*, 2016).

حشره‌کش‌های گیاهی به دلیل اثرات مضر کمتر بر ارگانیزم غیرهدف، ایمنی برای انسان و قابلیت تجزیه‌زیستی آسان به عنوان جایگزینی برای حشره‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شوند (Wakgari & Yigezu, 2018). حشره‌کش گیاهی تنداکسیر® حاوی عصاره فراوری شده سیر و فلفل قرمز است و در غلظت توصیه شده، برای پستانداران و سایر موجودات غیرهدف مثل زنبور عسل بدون ضرر است و باعث ایجاد مقاومت در حشرات نمی‌شود (Toorani *et al.*, 2020). پالیزین یک حشره‌کش گیاهی و تماسی است که شامل صابون غلیظ روغن نارگیل (۶۰ تا ۷۰ درصد) به همراه عصاره نعنا و اکالیپتوس است (Ali Bazhashi *et al.*, 2018; Toorani *et al.*, 2020). در بررسی اثرات کشندگی حشره‌کش تنداکسیر (غلظت‌های ۹۰۰، ۱۵۰۰، ۲۳۰۰، ۳۵۰۰ و ۵۳۰۰ در هزار) و دورکنندگی پالیزین (غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ در هزار) روی بالغ کنه دولکه‌ای مشخص شد که در آزمایش سمیت تماسی، تنداکسیر در غلظت ۵۳۰۰ در هزار بالاترین تلفات کنه دو لکه‌ای را ایجاد کرد و مقدار LC_{50} آن در مدت زمان ۴۸ ساعت برابر با ۹۰۷/۹۳۱ در هزار بود. با افزایش غلظت پالیزین، شاخص دورکنندگی از خنثی به طرف دورکنندگی تغییر یافت، به طوری که پالیزین در غلظت ۲۵۰ در هزار بی‌اثر بود ولی در بقیه غلظت‌ها دورکننده بود (Mirfakhraie & Mohammadian, 2017). افزایش تلفات با کاربرد حشره‌کش پالیزین نسبت به شاهد در آفات مکنده شته سیاه مرکبات، سفیدبالک و کنه تارتن دو نقطه‌ای گزارش شده است (Gholamzadeh-Chitgar & Pourmoradi, 2017; Ali Bazhashi *et al.*, 2018; Toorani *et al.*, 2020).

حشره‌کش‌های میکروبی به دلیل اختصاصی بودن، بی‌خطر بودن و جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست یک جایگزین برای حشره‌کش‌های شیمیایی هستند (Savini & Vincenzo, 2016; Fernández-Chapa *et al.*, 2019). موفق‌ترین عامل بیماری‌زای باکتریایی برای کنترل حشرات، *Bacillus thuringiensis* Berliner است که باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکل است (Savini & Vincenzo, 2020). حشره‌کش‌های حاوی این باکتری از نوع گوارشی بوده زیرا این باکتری ترکیبات حشره‌کش و کریستال‌های پروتئینی (مانند پروتئین حشره‌کش روبشی، پروتئین حشره‌کش ترشی و تورینجینسین) تولید می‌کند که برای بسیاری از حشرات به‌ویژه مراحل لاروی آنها سمی هستند. این پروتئین‌ها حشرات را از طریق اختلال در بافت روده میانی می‌کشند (Savini & Vincenzo, 2016; Fernández-Chapa *et al.*, 2019; Babin *et al.*, 2020).

ترکیب حشره‌کش‌ها و بیمارگرها برای افزایش کارایی کنترل آفات ممکن است به صورت هم‌افزایی عمل کند و باعث مصرف غلظت‌های کم‌تر سموم و حفظ دشمنان طبیعی شود، در حالی که می‌تواند آلودگی محیط‌زیست در اثر حشره‌کش‌های شیمیایی و ایجاد مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها را کاهش دهد (Fernández-Chapa et al., 2019; Toorani et al., 2020). با توجه به این که در ایران تاکنون به بررسی اثر تلفیقی حشره‌کش‌های شیمیایی، گیاهی و میکروبی علیه تریپس گندم پرداخته نشده است، لذا در این تحقیق کارایی چند حشره‌کش گیاهی و شیمیایی نسبتاً جدید (طبق توصیه سازمان حفظ نباتات) و یک فرآورده تجاری مبتنی بر اسپورهای باکتری *B. thuringiensis* به صورت منفرد آزمایش گردید و تاثیر اختلاط کاراترین حشره‌کش گیاهی و شیمیایی در دزهای زیر کشنده با حشره‌کش میکروبی روی تریپس گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان

بذور گیاه میزبان (گندم رقم کراس) در گلدان پلاستیکی (قطر ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر) با بستر کشت (خاک باغچه، ماسه و خاکبرگ با نسبت مساوی) کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه (دمای 26 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و ۸:۱۶ ساعت روشنایی: تاریکی) نگهداری شدند. برای جلوگیری از آلودگی سایر آفات مثل شته‌ها، گلدان‌های حاوی گندم به قفس‌های توری‌دار منتقل شدند. آبیاری در فواصل مناسب انجام شد. زمانی که گیاه به مرحله چند برگه رسید، برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. تعدادی از گلدان‌ها جهت پرورش کلنی آفت در قفس جداگانه‌ای نگهداری شدند.

جمع‌آوری و پرورش تریپس گندم

تریپس گندم از مزارع گندم آلوده به آن در مناطق مختلف شهرستان زهک (استان سیستان و بلوچستان) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و شناسایی شدند. جهت همسن‌سازی تریپس و بدست آوردن جمعیت یکنواخت، حشرات بالغ تریپس روی برگ‌های فاقد آلودگی گندم (سه هفته پس از جوانه‌زنی بذر) قرار داده و پس از ۲۴ ساعت حشرات بالغ از برگ‌ها جدا شدند. گیاهان آلوده به تخم تریپس به درون قفس با شرایط کنترل شده منتقل شدند. سپس نتاج حاصل روی گیاهان گندم مذکور درون قفس توری به ابعاد ($70 \times 100 \times 80$ سانتی‌متر) با شرایط دمای 26 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت روشنایی: تاریکی نگهداری شدند.

حشره‌کش‌های مورد استفاده

در این تحقیق از حشره‌کش‌های شیمیایی تیاکلوپرید (بیسکایا®) و تیاکلوپرید+دلتامترین (پروتئوس®) ساخت شرکت بایر آلمان، حشره‌کش‌های گیاهی تنداکسیر® و پالیزین® ساخت شرکت کیمیا سبزآور و حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (۳۲ درصد p/p، ۳۲ میلیون IU/G) به صورت پودر و تابل با نام تجاری پروبلت® ساخت شرکت نوآوران حیات پاک استفاده شد. بر اساس کاتالوگ شرکت بایر آلمان حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید دارای فرمولاسیون روغن قابل انتشار (OD) و ماده موثره تیاکلوپرید

۲۴ درصد است. حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین دارای فرمولاسیون OD و ماده موثره ۱۱ درصد است (Bayer Crop Science, 2016). بر اساس کاتالوگ شرکت کیمیا سبزآور، نوع فرمولاسیون حشره‌کش پالیزین و تنداکسیر به ترتیب به صورت مایع غلیظ قابل حل در آب و روغن امولسیون شونده است. ماده موثر پالیزین و تنداکسیر به ترتیب صابون روغن نارگیل 5 ± 65 درصد و روغن خوراکی حاوی عصاره فلفل تند 5 ± 85 درصد است (شرکت کیمیا سبزآور).

زیست‌سنجی مقدماتی و تعیین غلظت مناسب

این تحقیق در سال ۱۳۹۸ در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. از آنجا که خسارت عمده آفت تریپس گندم مربوط به سنین اول و دوم پورگی است (Omkar, 2020) و حشره کامل آن بسیار فعال بوده و حین کار در تشک پتری با سرعت زیادی حرکت می‌کند به طوری که اغلب از آن خارج می‌شود، لذا از پوره سن دوم در این آزمایش استفاده شد. ابتدا آزمایش‌های مقدماتی برای بدست آوردن غلظت‌های حداقل و حداکثر (۲۵ درصد و ۷۵ درصد تلفات) هر یک از سموم روی این آفت از روش رقیق‌سازی انجام شدند. تعداد ۱۵ عدد پوره سن دوم تریپس انتخاب گردید. برگ‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در آفت‌کش‌ها فرو برده شدند و سپس به ظروف نگهداری منتقل گردیدند. تعداد ۱۵ عدد پوره سن دوم روی برگ قرار گرفت. آزمایش سه تکرار داشت. برای هر یک از تیمارهای آزمایش، سه تکرار بود که مجموعاً ۴۵ عدد پوره سن دوم مورد استفاده قرار گرفت. تلفات به صورت درصد حشرات کاملاً مرده به تعداد اولیه در هر تیمار، پس از ۱۲ ساعت محاسبه شد. برای اصلاح درصد تلفات از فرمول ابوت (Abbott, 1925) استفاده شد. غلظت‌هایی که ۲۵ و ۷۵ درصد تلفات ایجاد کردند مشخص شدند و با استفاده از فاصله لگاریتمی سه غلظت بینابین تعیین و آزمایش‌های نهایی با پنج غلظت برای هر حشره‌کش به همراه تیمار شاهد انجام شد (Robertson & Preisler, 1992). آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد استفاده شد. جهت ایجاد سوسپانسیون یکنواخت، یک قطره از محلول توبین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) در شاهد و تیمارها استفاده شد. از توبین ۸۰ برای تشکیل سوسپانسیون یکنواخت از باکتری *B. thuringiensis* استفاده شد. غلظت سموم مورد استفاده در آزمایش‌ها برای بیسکایا شامل پنج غلظت ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، برای تیاکلوپرید+دلتامترین شامل پنج غلظت ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، برای پالیزین شامل پنج غلظت ۱۳۰۰، ۳۲۰۰، ۶۵۰۰، ۹۸۰۰ و ۱۳۰۰۰ پی‌پی‌ام و حشره‌کش تنداکسیر شامل پنج غلظت ۱۷۰۰، ۴۲۵۰، ۸۵۰۰، ۱۲۵۰۰ و ۱۷۰۰۰ پی‌پی‌ام بود. همچنین باکتری بیمارگر *B. thuringiensis* در پنج غلظت ۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۰۰۹، ۰/۰۰۵۳ و ۰/۰۰۳۲ پی‌پی‌ام مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده غلظت‌ها در هر یک از حشره‌کش‌ها بر حسب پی‌پی‌ام در جدول ۱ ارائه شده است. محدوده غلظت‌ها برای تیاکلوپرید و تیاکلوپرید+دلتامترین ۱۰۰-۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، برای پالیزین ۱۳۰۰-۱۳۰۰۰ پی‌پی‌ام، برای تنداکسیر ۱۷۰۰-۱۷۰۰۰ پی‌پی‌ام و برای *B. thuringiensis* ۰/۰۰۰۲۵-۳۲۰ پی‌پی‌ام بود (جدول ۱).

پس از تعیین غلظت‌های لگاریتمی، آزمایش اصلی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج غلظت برای هر حشره‌کش به همراه شاهد انجام شد. ابتدا کف تشک پتری پلاستیکی به قطر ۶ سانتی‌متر با دیسک برگ گندم به صورت رو به پشت برگ‌ها، پوشانده شد. از دیسک برگی تهیه شده از پهنک برگ گندم استفاده شد به طوری که به شکل کاملاً دایره‌ای (قطر ۶ سانتیمتر) کف تشک پتری را مفروش کند. واحد آزمایش در اینجا تشک پتری مفروش با برگ بود که این برگ در غلظت‌های تهیه شده از سموم به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفته تا کاملاً خشک شود. در ادامه، تعداد ۱۵ عدد

پوره سن دوم همسن تریپس به هر یک از واحدهای آزمایشی منتقل شد. این آزمایش در شرایط دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت تاریکی:روشنایی انجام شد. سپس ۱۲ ساعت بعد از تیمار، تعداد پوره‌های مرده و زنده توسط بینوکولار شمارش شد. پوره‌هایی که با وجود تحریک با سوزن پس از ۵ ثانیه قادر به راه رفتن نبودند، مرده تلقی شدند (Walter et al., 2018). پس از تعیین غلظت ۲۵ و ۷۵ درصد، غلظت‌های بینابین با فاصله لگاریتمی و انجام آزمایش نهایی، غلظت ۵۰ درصد بر اساس داده‌های خروجی نرم‌افزار محاسبه شد.

تعیین غلظت‌های زیر کشندگی (LC_{15} و LC_{30}) حشره‌کش‌های شیمیایی و گیاهی

به منظور انجام آزمایش تاثیر اختلاط حشره‌کش میکروبی با حشره‌کش‌های گیاهی و شیمیایی، یک حشره‌کش شیمیایی و یک حشره‌کش گیاهی که کمترین غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) بر پوره سن دوم تریپس گندم داشتند، انتخاب شدند و بر اساس داده‌های خروجی نرم‌افزار، دو غلظت زیر کشنده ۱۵ و ۳۰ درصد (LC_{15} و LC_{30}) از آنها تعیین شد. خسارت آفت‌کش‌ها روی دشمنان طبیعی را با کم کردن مقدار مصرف آن می‌توان کاهش داد. از آنجائی که انتخاب آفت‌کش با کمترین غلظت مدنظر است، از غلظت‌های زیرکشنده مذکور جهت تعیین کارایی آنها بر مرگ آفت استفاده شد. از این دو غلظت زیر کشنده در آزمایش تاثیر اختلاط حشره‌کش میکروبی با حشره‌کش‌های گیاهی و شیمیایی استفاده شد.

آزمایش کاربرد تلفیقی حشره‌کش شیمیایی و گیاهی با حشره‌کش میکروبی روی تریپس گندم

به‌منظور بررسی اثر اختلاط حشره‌کش شیمیایی و گیاهی با حشره‌کش میکروبی، دیسک برگی تهیه شده از پهنک برگ گندم که کف تشک پتری را مفروش کرده بود به عنوان واحد آزمایشی در یکی از غلظت‌های LC_{15} و LC_{30} حشره‌کش شیمیایی و گیاهی به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شد. پوره‌های سن دوم تریپس بلافاصله بعد از خشک شدن برگ‌ها (۱۰ دقیقه بعد)، داخل پتری قرار داده شدند. سپس ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با حشره‌کش‌های شیمیایی و گیاهی، غلظت LC_{50} باکتری بیمارگر *B. thuringiensis* اعمال شد. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: LC_{15} حشره‌کش، LC_{30} حشره‌کش، LC_{50} بیمارگر، LC_{15} حشره‌کش+ LC_{50} بیمارگر، LC_{30} حشره‌کش+ LC_{50} بیمارگر و شاهد (آب مقطر حاوی توپین). با توجه به داده‌های حاصل از آزمایش‌های مقدماتی زیست‌سنجی، یک حشره‌کش شیمیایی و یک حشره‌کش گیاهی که کمترین غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) را روی پوره سن دوم تریپس داشتند، انتخاب و دو غلظت زیر کشنده ۱۵ و ۳۰ درصد از آنها محاسبه گردید و در آزمایش‌های مربوط به کاربرد هم زمان حشره‌کش میکروبی با حشره‌کش‌های گیاهی و شیمیایی، مورد استفاده قرار گرفت. تلفات پوره‌ها ۴۸ ساعت بعد از تیمار حشره‌کش میکروبی ثبت و تلفات مشاهده شده در تیمارها با فرمول ابوت اصلاح گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

مقدار LC ها با روش تجزیه پروبیت و توسط نرم افزار SPSS 16، (SPSS, 2011)، محاسبه گردید. قبل از تجزیه داده‌ها برقراری شرایط آنالیز واریانس از نظر نرمال بودن و تصادفی بودن خطاها، همگنی واریانس‌ها و همبستگی واریانس‌ها با میانگین، توسط نرم‌افزار

SPSS بررسی شد و از نرمال بودن داده‌ها اطمینان حاصل شد. تجزیه و تحلیل آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA- One-Way و مقایسه میانگین آنها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد. قبل از مقایسه میانگین، برای اصلاح درصد تلفات از فرمول ابوت (Abbott, 1925) استفاده شد. نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2010 ترسیم شدند.

نتایج

نتایج تجزیه پروبیت داده‌های زیست‌سنجی حشره‌کش‌های شیمیایی تیاکلوپرید و تیاکلوپرید+دلتامترین، حشره‌کش‌های گیاهی پالیزین و تنداکسیر و حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis* بر پوره سن دوم تریپس گندم در جدول ۱ آورده شده است. نمودارهای پروبیت تلفات-لگاریتم غلظت نشان دادند که با افزایش غلظت حشره‌کش‌های شیمیایی و گیاهی میزان تلفات پوره سن دوم تریپس گندم افزایش یافت. با افزایش مدت زمان بعد از کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی و گیاهی میزان LC_{50} ، LC_{30} و LC_{15} کاهش یافت و تلفات تریپس افزایش یافت، به‌طوری که کمترین میزان LC_{50} ، LC_{30} و LC_{15} ۴۸ ساعت بعد از کاربرد تیاکلوپرید، تیاکلوپرید+دلتامترین، پالیزین و تنداکسیر مشاهده شد. بعد از گذشت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت کمترین میزان LC_{50} در بین حشره‌کش‌های شیمیایی تیاکلوپرید و تیاکلوپرید+دلتامترین مربوط به حشره‌کش تیاکلوپرید+دلتامترین بود و در بین حشره‌کش‌های گیاهی پالیزین و تنداکسیر مربوط به پالیزین بود. در نتیجه از حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین و حشره‌کش گیاهی پالیزین در آزمایش مربوط به کاربرد تلفیقی حشره‌کش میکروبی با حشره‌کش‌های گیاهی و شیمیایی استفاده گردید (جدول ۱). میزان LC_{50} حشره‌کش میکروبی با افزایش گذشت زمان بعد از کاربرد آن کاهش یافت و درصد مرگ افزایش یافت و در ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن کمترین میزان LC_{50} با غلظت ۲/۳۴ پی پی ام بدست آمد (جدول ۱).

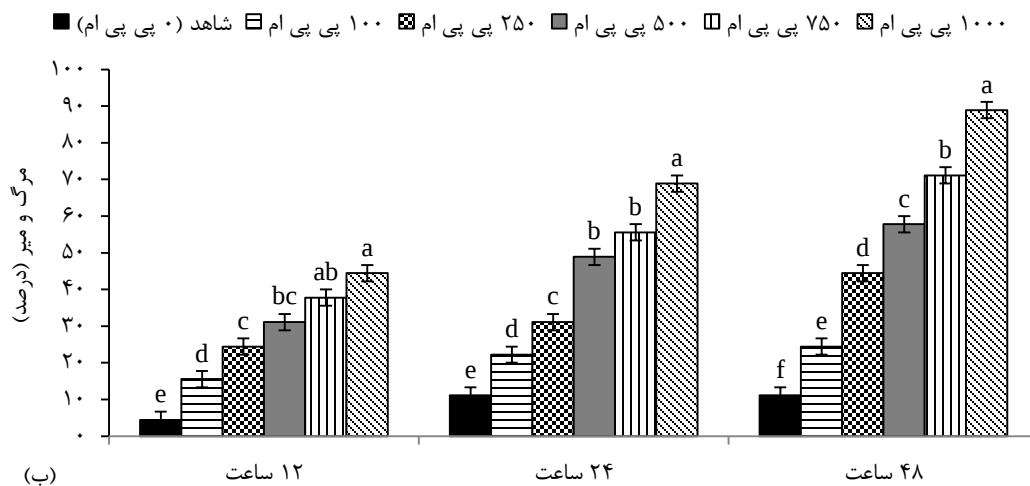
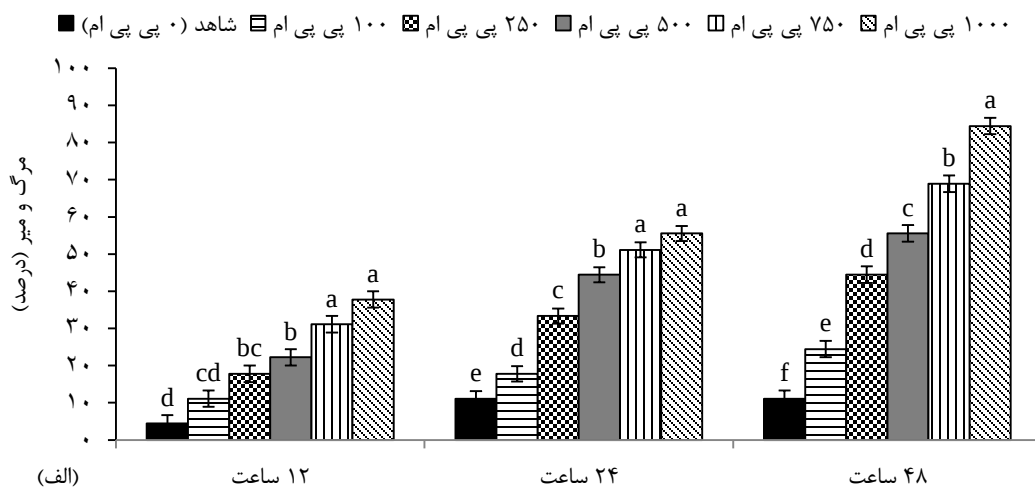
نتایج تجزیه واریانس کارایی حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید بر میزان تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن نشان داد که غلظت‌های مختلف تیاکلوپرید بر درصد تلفات آفت تریپس گندم در سطح احتمال ۱ درصد ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت‌های مختلف تیاکلوپرید (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (صفر) از نظر تلفات تریپس داشتند و با افزایش غلظت و نیز با افزایش گذشت زمان از کاربرد آنها درصد مرگ تریپس افزایش یافت. بیشترین درصد مرگ پوره سن دوم تریپس (۸۴/۴۴ درصد) در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام تیاکلوپرید و بعد از گذشت مدت ۴۸ ساعت از کاربرد آن بدست آمد (شکل ۱الف).

نتایج تجزیه واریانس اثر حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین بر میزان تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن نشان داد که غلظت‌های مختلف تیاکلوپرید+دلتامترین بر درصد مرگ آفت تریپس گندم در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت‌های مختلف تیاکلوپرید+دلتامترین (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد از نظر میزان تلفات تریپس داشتند و با افزایش غلظت تیاکلوپرید+دلتامترین و نیز با افزایش گذشت زمان از کاربرد آن، درصد تلفات تریپس افزایش یافت. بیشترین تلفات پوره سن دوم تریپس با ۸۸/۸۹ درصد در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام تیاکلوپرید+دلتامترین و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از کاربرد آن بدست آمد (شکل ۱ب).

نتایج تجزیه واریانس کارایی حشره کش گیاهی پالیزین بر میزان تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن نشان داد که کاربرد غلظت های مختلف پالیزین بر درصد تلفات تریپس گندم ($P < 0/01$) معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت های مختلف پالیزین (۱۳۰۰، ۳۲۰۰، ۶۵۰۰، ۹۸۰۰ و ۱۳۰۰۰ پی پی ام) تفاوت معنی داری با تیمار شاهد (صفر) از نظر درصد مرگ تریپس داشتند و با افزایش غلظت پالیزین و نیز با افزایش گذشت زمان از کاربرد آن درصد مرگ تریپس افزایش یافت. بیشترین درصد مرگ پوره سن دوم تریپس (۸۲/۲۲ درصد) در غلظت ۱۳۰۰۰ پی پی ام پالیزین و بعد از گذشت مدت ۴۸ ساعت از کاربرد آن بدست آمد (شکل ۲).

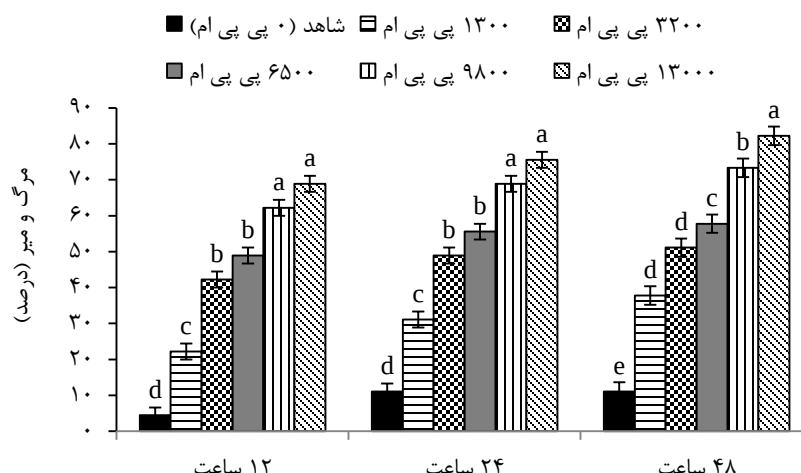
جدول ۱- تجزیه پروبیت داده های زیست سنجی برای پاسخ غلظت- تلفات پوره تریپس گندم به حشره کش های تیاکلوپرید، تیاکلوپرید+دلتامترین، پالیزین، تنداکسیر و *Bacillus thuringiensis* (B.t) در زمان های ۱۲ ساعت بعد از کاربرد آن

حشره کش	تعداد حشره	دامنه غلظت ها (پی پی ام)	شیب خط ($\pm SE$)	LC ₁₅ (پی پی ام) (حدود اطمینان ۹۵٪)	LC ₃₀ (پی پی ام) (حدود اطمینان ۹۵٪)	LC ₅₀ (پی پی ام) (حدود اطمینان ۹۵٪)	کای اسکور احتمال انطباق (P) (df=۱)	سطح
تیاکلوپرید	۴۵	۱۰۰ - ۱۰۰۰	$0/88 \pm 0/28$	۱۸۲ (۳۲-۳۱۱)	۶۹۱ (۴۲۷-۱۸۹۲)	۲۷۱۴ (۱۲۳۹-۵۷۷۵)	۹/۸۵	۰/۹۹
تیاکلوپرید+دلتامترین	۴۵	۱۰۰ - ۱۰۰۰	$0/85 \pm 0/26$	۹۹/۲۲ (۹/۰۲-۱۹۵/۸۵)	۳۹۹/۴۳ (۲۰۷/۳۱-۶۹۲/۷۷)	۱۶۶۳ (۸۸۰/۱۲-۱۴۷۴۷)	۱۰/۴۸	۰/۹۹
پالیزین	۴۵	۱۳۰۰-۱۳۰۰	$1/19 \pm 0/25$	۷۴۱ (۱۸۰-۱۳۹۸)	۱۹۹۲ (۹۰۳-۲۹۷۸)	۵۴۷۹ (۳۸۵۷-۷۸۹۲)	۲۳/۱۱	۰/۹۹
تنداکسیر	۴۵	۱۷۰۰ - ۱۷۰۰	$1/28 \pm 0/29$	۳۴۱۰ (۱۵۱۶-۵۰۲۵)	۸۵۳۱ (۶۰۰۴-۱۲۴۵۰)	۲۱۸۲۳ (۱۴۴۱۴-۵۳۷۵۵)	۱۹/۵۳	۰/۹۹
B.t	۴۵	۰/۰۰۰۲۵ - ۳۲۰	$0/26 \pm 0/04$	-	-	۱۹/۸۰ (۳/۱۹۴-۸۷/۶۰)	۳۵/۳۹	۰/۹۹



شکل ۱- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار درصد تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر غلظت‌های مختلف حشره‌کش‌های تیاکلوپرید (الف) و تیاکلوپرید+دلتامترین (ب) در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت.

در هر زمان، ستون‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۲- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار درصد تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر غلظت‌های مختلف پالیزین در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. در هر زمان،

ستون‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج تجزیه واریانس اثر حشره‌کش گیاهی تنداکسیر بر میزان مرگ پوره سن دوم تریپس گندم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف حشره‌کش تنداکسیر بر درصد مرگ تریپس در سطح احتمال ۱ درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت‌های مختلف تنداکسیر (۱۷۰۰، ۴۲۵۰، ۸۵۰۰، ۱۲۵۰۰ و ۱۷۰۰۰ پی پی ام) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد از نظر درصد مرگ تریپس داشتند و با افزایش غلظت تنداکسیر و نیز با افزایش گذشت زمان از کاربرد آن درصد تلفات تریپس افزایش یافت. بیشترین درصد مرگ پوره سن دوم تریپس (۶۲/۲۲ درصد) در غلظت ۱۷۰۰۰ پی پی ام تنداکسیر و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از کاربرد آن بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار درصد تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر غلظت‌های مختلف تنداکسیر در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

زمان (ساعت)	غلظت (ppm)					
	کنترل (صفر)	۱۷۰۰	۴۲۵۰	۸۵۰۰	۱۲۵۰۰	۱۷۰۰۰
۱۲	۴/۴۴ ^e	۸/۸۹ ^e	۱۷/۷۸ ^{cd}	۲۶/۶۷ ^{bc}	۳۵/۵۶ ^b	۴۸/۸۹ ^a
۲۴	۱۱/۱۱ ^e	۱۵/۵۶ ^{de}	۲۴/۴۴ ^{cd}	۳۳/۳۳ ^{bc}	۳۷/۷۸ ^b	۵۱/۱۱ ^a
۴۸	۱۱/۱۱ ^e	۲۲/۲۲ ^d	۳۱/۱۱ ^c	۴۴/۴۴ ^b	۵۵/۵۶ ^a	۶۲/۲۲ ^a

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج تجزیه واریانس اثر حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis* بر میزان مرگ و میر پوره سن دوم تریپس گندم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف آن بر درصد مرگ تریپس ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت‌های مختلف حشره‌کش میکروبی (۰/۰۰۰۲۵، ۰/۰۱۶، ۰/۰۹، ۵۳ و ۳۲۰ پی پی ام) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد از نظر تلفات تریپس گندم داشتند و با افزایش غلظت حشره‌کش میکروبی و نیز با افزایش گذشت زمان از کاربرد آن درصد تلفات افزایش یافت. بیشترین درصد مرگ پوره سن دوم تریپس (۸۸/۸۹ درصد) در غلظت ۳۲۰ پی پی ام حشره‌کش میکروبی و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از کاربرد آن حاصل شد (جدول ۳).

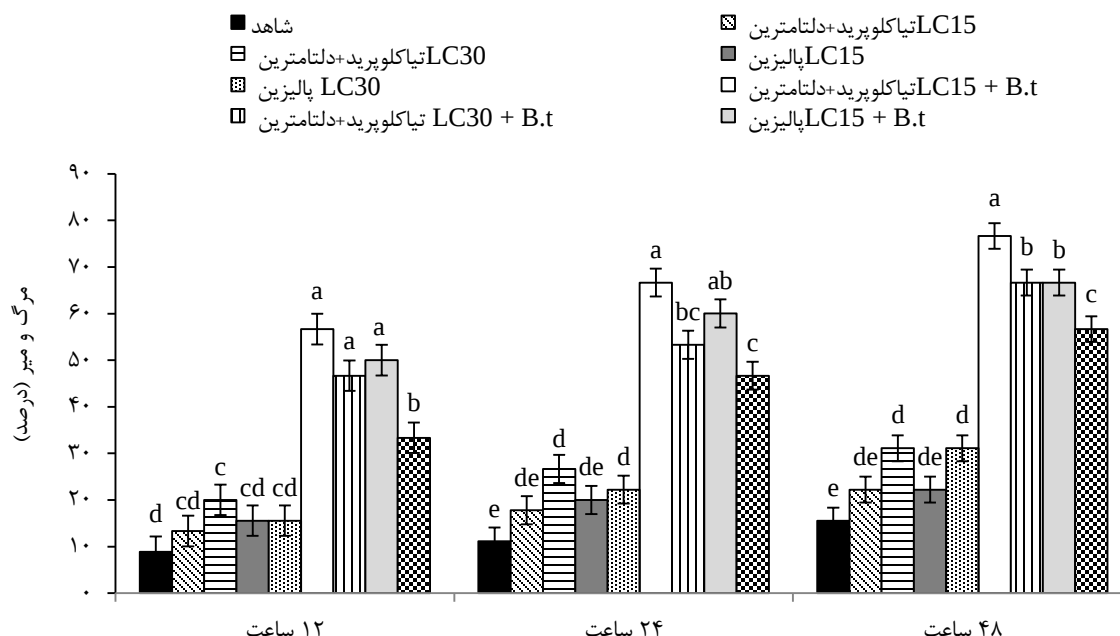
در آزمایش تلفیق حشره‌کش‌های شیمیایی، گیاهی و میکروبی، غلظت‌های ۷ و ۲۰ پی پی ام از حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین، غلظت‌های ۲۶ و ۷۲ پی پی ام از حشره‌کش گیاهی پالیزین و غلظت ۲۲۱ پی پی ام از حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis* روی پوره سن دوم تریپس گندم بررسی شدند. نتایج تجزیه واریانس اثر تلفیق حشره‌کش‌های تیاکلوپرید+دلتامترین، پالیزین و *B. thuringiensis* بر میزان تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که اثر حشره‌کش‌های تلفیقی بر درصد مرگ در سطح احتمال ۱ درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تیمارهای مختلف تلفیق حشره‌کش‌ها (تیاکلوپرید+دلتامترین LC₁₅، تیاکلوپرید+دلتامترین LC₃₀، پالیزین LC₁₅، پالیزین LC₃₀، *B. thuringiensis* + تیاکلوپرید+دلتامترین LC₁₅، *B. thuringiensis* + تیاکلوپرید+دلتامترین LC₃₀، *B. thuringiensis* + پالیزین LC₁₅، *B. thuringiensis* + پالیزین LC₃₀) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (صفر) از نظر تلفات تریپس داشتند. بیشترین درصد مرگ پوره سن دوم تریپس گندم (۷۶/۶۷ درصد) با کاربرد تلفیقی *B. thuringiensis* + تیاکلوپرید+دلتامترین LC₁₅ به‌ویژه بعد از ۴۸ ساعت بدست آمد (شکل ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار درصد تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر غلظت‌های مختلف *Bacillus*

thuringiensis در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

غلظت (ppm)							زمان (ساعت)
خطای معیار	۳۲۰	۵۳	۰/۹	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۲۵	کنترل (صفر)	
$\pm 2/57$	71/11 ^a	46/67 ^b	33/33 ^c	20/00 ^d	13/33 ^d	4/44 ^e	۱۲
$\pm 2/41$	75/56 ^a	48/90 ^b	33/33 ^c	22/22 ^d	13/33 ^e	11/11 ^e	۲۴
$\pm 2/04$	88/89 ^a	55/56 ^b	37/78 ^c	22/22 ^d	13/89 ^e	11/11 ^e	۴۸

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳- مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار درصد تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر تیمارهای تلفیقی تیاکلوپرید+دلتامترین، پالیزین و *Bacillus thuringiensis* (B.t) در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت.

در هر زمان، ستون‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث

روش‌های شیمیایی به دلیل ضریب اطمینان بالای آنها به عنوان رایج‌ترین روش مبارزه با آفات در سراسر جهان استفاده می‌شوند (Iglesias et al., 2021). توجه بشر به اهمیت مواد غذایی بدون پسماند حشره‌کش‌های شیمیایی، مقاومت آفات به سموم، آلودگی محیط‌زیست و اثر مضر سموم بر سلامت انسان موجب افزایش تحقیقات برای دستیابی به روش‌های کنترل ایمن، اقتصادی و سازگار با محیط‌زیست و آفت‌کش‌های کم‌خطر شده است (Wakgari & Yigezu, 2018; Iglesias et al., 2021). این تحقیق درباره اثر حشره‌کش‌های شیمیایی تیاکلوپرید و پروتئوس (تیاکلوپرید+دلتامترین)، حشره‌کش‌های زیستی تنداکسیر، پالیزین و *B. thuringiensis* و تلفیق آنها روی پوره سن دوم تریپس گندم در ایران بود. گزارش‌های زیادی تأثیرات منفی حشره‌کش‌های تیاکلوپرید و دلتامترین را بر آفات تأیید کردند، اما مطالعات در مورد مخلوط آنها محدود است و در تریپس گندم نیز بررسی نشده است (Majidpour et al., 2020). مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که تیاکلوپرید برای حشرات بالغ سفیدبالک با LC_{50} متوسط ۱۴/۷ میلی گرم بر لیتر بسیار سمی است (Dong et al., 2017). کاربرد غلظت‌های زیرکشنده تیاکلوپرید اثر منفی بر فراسنجه‌های جدول زندگی شته سبز گندم از قبیل نرخ ذاتی افزایش جمعیت، نرخ خالص تولید مثل، مدت زمان طول یک نسل و نرخ متناهی افزایش جمعیت داشت و LC_{50} آن برابر با ۲۱۲/۷ میلی گرم ماده موثره بر لیتر گزارش گردید (Aeinechi & Naseri, 2020). مشخص شده

است که کنترل آفت با تیاکلوپرید می‌تواند به دلیل کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز در اثر اتصال تیاکلوپرید به پروتئازها و تشکیل کمپلکس باشد که موجب ممانعت از فعالیت آنها و نهایتاً کاهش جمعیت آفت می‌شود (Aeinechi & Naseri, 2020).

مطالعه حشره‌کش‌های تیاکلوپرید+دلتامترین و پیری پروکسی فن بر سفیدبالک نیشکر نشان داد که مخلوط تیاکلوپرید+دلتامترین سمی‌ترین حشره‌کش برای مراحل مختلف زندگی سفیدبالک بود و زنده‌مانی حشرات بالغ در برگ‌های نیشکر تحت تیمار غلظت بالای تیاکلوپرید+دلتامترین (۱۵۰۰ پی پی ام) ۴۳/۳ درصد بود (Behnam-Oskuyee *et al.*, 2020). دوره رشد پوره‌های سن سوم تا چهارم شته پنبه تحت تأثیر مخلوط تیاکلوپرید+دلتامترین قرار گرفت، و مقدار LC₅₀ برای شته ۱۴/۱ میلی گرم در لیتر بود. غلظت LC₃₀ اثرات بیشتری نسبت به LC₁₀ روی شته پنبه ایجاد کرد و باروری آفت به طور معنی داری کاهش یافت (Majidpour *et al.*, 2020). با کاربرد حشره‌کش‌های دلتامترین+تیاکلوپرید و لامبداسی هالوترین روی سن گندم مشخص شد که بیشترین تلفات حشرات بالغ سن با ۱۰۰ درصد مربوط به حشره‌کش دلتامترین+تیاکلوپرید بود (Honarmand *et al.*, 2016). نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش تلفات پوره سن دوم تریپس گندم در اثر حشره‌کش‌های تیاکلوپرید و مخلوط تیاکلوپرید+دلتامترین با نتایج مطالعات فوق مطابقت داشت.

سایر مطالعات ثابت کردند که حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی در کاهش جمعیت آفات موثر هستند (Dong *et al.*, 2017; Koohzad-Mohammadi *et al.*, 2017). حشره‌کش تیاکلوپرید یک نئونیکوتینوئید است و بنابراین بر گیرنده‌های استیل کولین حشرات تأثیر می‌گذارد در حالی که دلتامترین (پیرتروئید) با تعدیل ورود سدیم به سیستم عصبی مداخله می‌کند (Majidpour *et al.*, 2020). ترکیب تیاکلوپرید و دلتامترین در فرمولاسیون تیاکلوپرید+دلتامترین ممکن است اثرات هم‌افزایی داشته باشد (Behnam-Oskuyee *et al.*, 2020). تمام حشره‌کش‌های با فرمولاسیون او-دی تأثیر ضربه‌ای و ماندگاری بهتری دارند و بر اساس کاتولوگ شرکت بایر حشره‌کش‌های بیسکایا و تیاکلوپرید+دلتامترین اثر ضربه‌ای فوق العاده بالایی دارند و در نتیجه سمپاشی آنها با توجه به متحرک بودن تریپس گندم، می‌تواند بسیار مفید باشد (Rezaei *et al.*, 2020).

تنداکسیر اثرات کشندگی و زیرکشندگی بالایی بر رشد جمعیت مینوز گوجه‌فرنگی داشت و باعث طولانی‌تر شدن دوره یک نسل شد (Kabiri Raeisabad, 2019). پالیزین در ۷۲ ساعت پس از کاربرد سبب مرگ ۹۶/۳۹ درصد از آفت شته سیاه مرکبات شد (Gholamzadeh-Chitgar & Pourmoradi, 2017). تلفات حشرات کامل سفیدبالک در زمان کاربرد پالیزین بسیار کمتر از زمان کاربرد سم کنفیدور بود (Ali Bazhashi *et al.*, 2018). کارایی کمتر حشره‌کش‌های گیاهی نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی در این مطالعه مانند مطالعات فوق مشاهده گردید. نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش تلفات پوره سن دوم تریپس گندم با افزایش غلظت حشره‌کش‌های تنداکسیر و پالیزین و با افزایش گذشت زمان از مصرف آنها با نتایج مطالعات فوق مطابقت داشت. نتایج نشان داد که هرچند تنداکسیر و پالیزین دارای اثرات کشنده مشابه حشره‌کش‌های شیمیایی نیستند اما با توجه به پژوهش‌هایی که در ارتباط با اثر عصاره‌های گیاهی بر آفات دیگر انجام شده است، این عصاره‌ها به‌ویژه پالیزین تأثیر نسبتاً مناسبی بر پوره سن دوم تریپس گندم داشتند. در مطالعه کاربرد حشره‌کش‌های دلتامترین+تیاکلوپرید، لامبداسی هالوترین و پالیزین روی سن گندم مشخص شد که میزان تلفات حشرات بالغ سن با حشره‌کش گیاهی پالیزین کمتر از حشره‌کش شیمیایی دلتامترین+تیاکلوپرید بود (Honarmand *et al.*, 2016). وجود ماده فعال کاپسیسین در گیاه فلفل قرمز و اثرات کشندگی و ضد تغذیه‌ای این ماده در بی‌مهرگان تایید شده است و

می‌تواند دلیلی برای اثر کشندگی حشره‌کش تنداکسیر باشد (Li et al., 2019). اثر کشندگی حشره‌کش پالیزین به نقش آن در صدمه به اسکلته خارجی آفت و اختلال سیستم تنفسی نسبت داده می‌شود که نهایتاً سبب خروج مایعات حیاتی از بدن آفت و مرگ آن می‌شود (Toorani et al., 2020).

باکتری *B. thuringiensis* به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیکی آفات در مطالعات زیادی گزارش شده است (Ali et al., 2010; Babin et al., 2020; Plata-Rueda et al., 2020). از آنجا که این باکتری عامل بیماری‌زای حشرات، میزبان خود را از طریق روده میانی آلوده می‌کند، بنابراین پتانسیل بیشتری را به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی برای آفات دارد (Plata-Rueda et al., 2020). کاربرد حشره‌کش *B. thuringiensis* موجب تلفات بالای کرم برگ‌خوار پاییزه در برنج شد (Del Valle Loto et al., 2019). حشره‌کش *B. thuringiensis* سبب کاهش یا مهار رشد، نمو و وزن لارو می‌شود و چرخه زندگی آفت کرم میوه‌خوار بادمجان را مختل می‌کند (Prodhan et al., 2019). اثر باکتری *B. thuringiensis* روی آفت تریپس گندم باعث کاهش مصرف اولیه برگ شد که این نشان‌دهنده اثر مسمومیت و ضدتغذیه‌ای باکتری روی این آفت است. نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش تلفات تریپس در اثر کاربرد *B. thuringiensis* با مطالعات فوق مطابقت داشت. تغییر نفوذپذیری و آسیب روده میانی ناشی از *B. thuringiensis* در جذب غذا اختلال ایجاد می‌کند، بر فعالیت آنزیم‌های مرتبط با گوارش تأثیر می‌گذارد و متابولیسم انرژی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین مسمومیت ناشی از این باکتری موجب تغییر pH همولنف آفت شده و پاسخ ایمنی را سرکوب می‌کند و نهایتاً سبب مرگ آفت می‌شود (Plata-Rueda et al., 2020).

تأثیر مثبت تلفیق آفت‌کش‌های میکروبی با آفت‌کش‌های شیمیایی و گیاهی در کنترل آفات در دیگر مطالعات گزارش شده است (Ouma et al., 2014; Narkhede et al., 2017). نتایج تحقیق نشان داد که جمعیت پوره سن دوم تریپس گندم با کاربرد تلفیقی *B. thuringiensis* + تیاکلورپید+دلتامترین LC₁₅، کاهش یافت. در کاربرد همزمان آفت‌کش‌ها، زمانی که حشره‌کش میکروبی ۲۴ ساعت بعد از تیمار اول اعمال گردید، مشخص شد که تلفیق *B. thuringiensis* + پالیزین LC₁₅ بعد از تیمار تلفیقی *B. thuringiensis* + تیاکلورپید+دلتامترین LC₁₅ بیشترین تلفات تریپس را داشت. اثر هم‌افزایی لاروکشی تمفوس با *B. thuringiensis* LC₅₀ را در پشه آنوفل کاهش داد و پتانسیل لاروکشی تمفوس+باکتری *B. thuringiensis* در مقایسه با کاربرد منفرد آنها افزایش یافت (Narkhede et al., 2017). کاهش ۶۰ درصدی تریپس در لوبیا سبز پس از سم‌پاشی ترکیبی آفت‌کش گیاهی تجاری چریش (*Azadirachta indica*) و قارچ بیمارگر *Metarrhizium anisopliae* گزارش گردید (Ouma et al., 2014). کاربرد اسانس گیاهان زنیان رومی، مرزه، پونه کوهی، رازیانه، زیره سبز و زوفا اثر هم‌افزایی با حشره‌کش تیاکلورپید+دلتامترین در برابر تخم و بالغ سفیدبالک داشت که به وجود متابولیت‌های ثانویه و نقش دفاعی آنها در گیاهان نسبت داده شده است (Ouma et al., 2014; Soleymanzade et al., 2017). نتایج این تحقیق مبنی بر اثر مثبت تلفیق *B. thuringiensis* با تیاکلورپید+دلتامترین و پالیزین در کنترل تریپس گندم با نتایج مطالعات فوق مطابقت داشت. محققان افزایش پتانسیل لاروکشی با فرمولاسیون ترکیبی *B. thuringiensis* و آفت‌کش شیمیایی را به تغییر شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لاروها مثل کاهش سطح آلفا استراز، استیل کولین استراز و پروتئین و افزایش فعالیت قلیایی فسفاتاز نسبت دادند (Narkhede et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

کاربرد ترکیبی حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین در غلظت LC₁₅ با حشره‌کش باکتریایی *B. thuringiensis* برای تریپس گندم بسیار سمی بود و پوره سن دوم این آفت را به‌طور قابل توجهی کنترل کرد. حشره‌کش‌های گیاهی پالیزین و تنداکسیر و حشره‌کش *B. thuringiensis* در کاربرد منفرد می‌توانند در کنترل تریپس گندم مفید واقع شده و به‌عنوان جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی مورد استفاده قرار بگیرند. کاربرد تلفیقی حشره‌کش‌ها می‌تواند کنترل تریپس گندم را بهبود بخشد و خطر مقاومت تریپس به حشره‌کش‌ها و نیز آلودگی زیست‌محیطی را کاهش دهد. تلفیق باکتری *B. thuringiensis* به همراه حشره‌کش شیمیایی تیاکلوپرید+دلتامترین می‌تواند برای کنترل تریپس گندم به‌عنوان بخشی از استراتژی مفید مدیریت تلفیقی آفات استفاده شود. همچنین پیشنهاد می‌شود تحقیقات مزرعه‌ای برای تایید بیشتر یافته‌های این مطالعه انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زابل به خاطر حمایت مالی این مطالعه (IR-UOZ-GR-0821) تشکر و قدردانی می‌نمایند. پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه‌ی دوره کارشناسی ارشد نگارنده‌ی اول در رشته‌ی حشره‌شناسی کشاورزی است.

منابع

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2): 265-267.
- Aeinechi, P. and Naseri, B. (2020). Effect of Thiacloprid and Eforia on the life table parameters and detoxification enzymes activity in wheat aphid, *Schizaphis graminum* (Rondani). *Journal of Entomological Research*, 12(2): 83-101. (In Farsi with English summary).
- Ali, S., Zafar, Y., Ali, G.M. and Nazir, F. (2010). *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 9(14): 2022-2031.
- Ali Bazhashi, Z., Seddigh, S. and Tafaghodinia, B. (2018). Comparison of Confidor and Palizin in control of greenhouse whitefly adults in Gerbera commercial greenhouses in Pakdasht. *Applied Plant Protection*, 6(1): 55-63. (In Farsi with English summary).
- Babin, A., Nawrot-Esposito, M.P., Gallet, A., Gatti, J.L. and Poirie, M. (2020). Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. *Scientific Reports*, 10: 16241.
- Baker, B.P., Green, T.A. and Loker, A.J. (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control*, 140: 104095.
- Behnam-Oskuyee, S., Ziaee, M. and Shishehbor, P. (2020). Evaluation of different insecticides for the control of sugarcane whitefly, *Neomaskellia andropogonis* Corbett (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(4): 255-260.
- Del Valle Loto, F., Carrizo, A.E., Romero, C.M., Baigorí, M.D. and Pera, L.M. (2019). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from northern Argentina: Esterases, profiles, and susceptibility to *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae). *Florida Entomologist*, 102: 347-352.
- Dong, S., Ren, X., Zhang, D., Ji, X., Wang, K. and Qiao, K. (2017). Single basal application of Thiacloprid for the integrated management of *Meloidogyne incognita* and *Bemisia tabaci* in tomato crops. *Scientific Reports*, 7: 41161.

- Fernández-Chapa, D., Ramírez-Villalobos, J. and Galán-Wong, L. (2019). Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: An overview. Pages 1-22. In: Jia, Y. (ed.), Protecting rice grains in the post-genomic era. London: IntechOpen.
- Gheibi, M. and Taheri, Y. (2017). Effect of flupyradifurone, spirotetramat and thiacloprid insecticides on common pistachio psylla, *Agonoscaena pistaciae* Burckhardt & Lauterer (Hem.: Psyllidae). IAU Entomological Research Journal, 8(4): 255-270. (In Farsi with English summary).
- Gholamzadeh-Chitgar, M. and Pourmoradi, S. (2017). An evaluation of the effect of botanical insecticide, palizin in comparison with chemical insecticide, imidacloprid on the black citrus aphid, *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe and its natural enemy, *Aphidius colemani* Viereck. Journal of Plant Protection Research, 57: 101-106.
- Giraldo, P., Benavente, E., Manzano-Agugliaro, F. and Gimenez, E. (2019). Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. Agronomy, 9(7): 352.
- Honarmand, P., Nouri, G., Rafiee-Dastjerdi, H., Hassanpour, M. and Fathi, S.A.A. (2016). Lethal effect of three synthetic insecticides and two commercial botanical extracts on the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton under the field and laboratory conditions. Plant Pest Research, 6(3): 65-77. (In Farsi with English summary).
- Iglesias, L., Havey, M.J. and Nault, B.A. (2021). Management of onion thrips (*Thrips tabaci*) in organic onion production using multiple IPM tactics. Insects, 12(3): 207.
- Ivantsova, E.A., Novochadov, V.V., Onistratenko, N.V. and Postnova, M.V. (2017). Ecological aspects of phytosanitary optimization of arid agrobiocenoses of the south of Russia. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 23(5): 834-842.
- Kabiri Raeisabad, M. (2019). Lethal and sublethal effects of botanical insecticide, tondexir (Tondexir®) and chemical insecticide, indoxacarb (Avaunt®) on the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42(1): 45-64. (In Farsi with English summary).
- Koohzad-Mohammadi, P., Ziaee, M. and Nikpay, A. (2017). Insecticides from different classes impact on *Neomaskellia andropogonis* population under sugarcane field conditions. Sugar Tech, 19: 623-631.
- Kozulina, N.S., Vasilenko, A.A. and Shmeleva, Z.N. (2019). The development of the environmentally safe method for disinfection and biostimulation of spring wheat seeds using electromagnetic field of super-high frequency (AGRITECH Scopus). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 315: 022047.
- Kozulina, N.S., Vasilenko, A.V., Vasilenko, A.A. and Shmeleva, Z.N. (2021). Effective protection of grain crops from pests. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 677: 042014.
- Li, B., Yang, M., Shi, R. and Ye, M. (2019). Insecticidal activity of natural capsaicinoids against several agricultural insects. Natural Product Communications, 14(7): 1934578X1986269.
- Lin, Q., Chen, H., Dai, X., Yin, S., Shi, C., Yin, Z., Zhang, J., Zhang, F., Zheng, L. and Zhai, Y. (2021). *Myzus persicae* management through combined use of beneficial insects and Thiacloprid in pepper seedlings. Insects, 12: 791.
- Majidpour, M., Maroofpour, N., Ghane-Jahromi, M. and Guedes, R.N.C. (2020). Thiacloprid +Deltamethrin on the life-table parameters of the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), and the parasitoid, *Aphidius flaviventris* (Hymenoptera: Aphelinidae). Journal of Economic Entomology, 113(6): 2723-2731.
- Mirfakhraie, S. and Mohammadian, P. (2017). Effects of botanical insecticides Sirinol, Tondexir and repellency of Palizin on two spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) in the laboratory conditions. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 40(3): 1-12. (In Farsi with English summary).
- Narkhede, C., Patil, C., Suryawanshi, R., Koli, S., Mohite, B. and Patil, S. (2017). Synergistic effect of certain insecticides combined with *Bacillus thuringiensis* on mosquito larvae. Journal of Entomological and Acarological Research, 49(1): 6265.
- Omkar, A. (2020). Sucking Pests of Crops. Springer Nature, Singapore. 515 pp.
- Ouma, B., Muthomi, J., Nderitu, J. and Toroitich, F. (2014). Management of thrips in French beans by integrating biological and synthetic pesticides in conventional spray regimes. Journal of Renewable Agriculture, 2: 27-37.

- Plata-Rueda, A., Quintero, H.A., Serrão, J.E. and Martínez, L.C. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains on the nettle caterpillar, *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae). *Insects*, 11(5): 310.
- Prodhan, M., Haider, Z., Shirale, D.K., Islam, M., Hossain, M., Paranjape, V. and Shelton, A.M. (2019). Susceptibility of field populations of eggplant fruit and shoot borer (*Leucinodes orbonalis* Guenée) to Cry1Ac, the protein expressed in Bt eggplant (*Solanum melongena* L.) in Bangladesh. *Insects*, 10(7): 198.
- Rezaei, M., Gheibi, M., Hesami, S. and Zohdi, H. (2020). Effect of sub-lethal concentration of Biscaya®, Neem Azal®, and Tondexir® on life parameters of *Habrobracon hebetor* say (Hymenoptera: Braconidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 40(1): 119-129.
- Robertson, J.L. and Preisler, H.K. (1992). Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, 127 Pp. USA.
- Savini, V. and Vincenzo, P. (2016). *Bacillus thuringiensis* insecticide properties. Pages 139-155. In: Savini, V. (ed.), *The diverse faces of Bacillus cereus*. USA: Academic Press.
- Soleymanzade, A., Khorrami, F., Forouzan, M., Noori, H. and Poushand, F. (2017). Insecticidal activity of some medicinal plant essential oils combined with Proteus® against greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) under greenhouse conditions. *Journal of Entomological Research*, 9(3): 13-20.
- Spss, I. (2011). IBM SPSS statistics for Windows, version 20.0. IBM Corp, New York.
- Toorani, A.H., Amiri Besheli, B. and Abbasipour, H. (2020). Toxicity of selected plant derived pesticides to the citrus spider mites (Acari: Tetranychidae) and their predator, *Stethorus gilvifrons*, in the semi-field conditions. *International Journal of Acarology*, 46(8): 644-651.
- Wakgari, M. and Yigezu, G. (2018). Evaluation of some botanical extracts against two-spotted spider mite (Tetranychidae: *Tetranychus urticae* koch) under laboratory condition. *Ethiopian Journal of Science*, 41(1): 1-7.
- Walter, N.T., Adeleye, V.O., Muthomi, P.K., Rojas, R.J.O., Strzyzewski, I., Funderburk, J. and Martini, X. (2018). Toxicity of different insecticides against two thrips (Thysanoptera: Thripidae) pests of concern in central america. *Florida Entomologist*, 101(4): 627-633.

Comparative and combined toxicity of some microbial, chemical and botanical pesticides on *Haplothrips tritici* K. (Thysanoptera: Phlaeothripidae) in laboratory conditions

F. Shokouhi-Nia¹, A. Mirshekar^{2*} and A. Khani³

Received: 2021.11.30

Accepted: 2022.3.12

Abstract

The combination of biological and chemical insecticides is very important to control wheat thrips and reduce the dose of chemical insecticides. Therefore, in this study, insecticidal activity of botanical (Tondexir and Palizin) and microbial pesticides (*Bacillus thuringiensis* (B.t)) in comparison with chemical (Thiacloprid and Thiacloprid+Deltamethrin) insecticides on wheat thrips was investigated. A completely randomized experiment was performed with three replications and five concentrations of each insecticide. Based on the lowest LC₅₀, a chemical insecticide and a botanical insecticide were selected. Their LC₁₅ and LC₃₀ concentrations were combined with microbial insecticide and 48 h later, the mortality was calculated. The mortality increased with increasing concentrations of chemical and botanical insecticides. The lowest amount of LC₅₀ was related to Thiacloprid+Deltamethrin and Palizin which were used in combination with microbial insecticide. The highest mortality (76.67%) was related to the combination treatment of B.t+Thiacloprid+Deltamethrin LC₁₅, which can be recommended after field studies as an alternative of chemical insecticides to protect wheat against thrips.

Keywords: Botanical pesticide, Entomopathogenic bacteria, Biscaya, Proteus, Integrated control, Biological control

1. Former MSc student of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol

2. Assistant Professor of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol

(*Corresponding author: mirshekar@uoz.ac.ir)

3. Associate Professor of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>

10.22051/JAB.2021.34309.1398

اثرات پرتوتابی گاما بر ترکیبات آلرژن و میزان کشندگی زهر زنبور عسل در مدل حیوانی همستر

پروین شورنگ*^۱، فاطمه عباسی^۱، فاطمه طه‌پوری^۲، حامد عسکری^۱

چکیده

مقدمه: این پژوهش با هدف کاهش سمیت و کشندگی زهر زنبور عسل با استفاده از پرتوتابی گاما و سنجش کیفیت زهر زنبور عسل فراوری شده انجام شد. **روش‌ها:** نمونه‌های زهر با دزهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری گاما پرتوتابی شد. ترکیبات زهر اندازه‌گیری شد. ۸۰ سر همستر در ۵ گروه با ۴ تکرار گروه‌بندی شد. مقدار ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم زهر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق و دوز کشندگی ۵۰ درصد محاسبه شد. بافت کبد همسترها تثبیت و برش‌گیری و با همتوکسلین-انوزین رنگ آمیزی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS آنالیز شد. **نتیجه:** پرتوتابی سبب کاهش مقدار فسفولیپاز و افزایش زیرواحدهای پروتئینی کوچک شد. استفاده از دز ۶ و ۸ کیلوگری سبب افزایش ۳۴ درصدی دوز کشندگی ۵۰ درصد و کاهش ادم و پرخونی سیاهرگ‌های مرکزی و کاهش تورم هیپاتوسیت‌ها شد. **بحث:** دز ۶ کیلوگری پرتو گاما با حذف عوامل آلرژن می‌تواند برای کاهش سمیت زهر زنبور عسل استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پرتوتابی، زهر زنبور عسل، دوز کشندگی، سمیت

۱. دانشیار، پژوهشکده کشاورزی هسته ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای؛ (* نویسنده مسئول pshawrang@aeoi.org.ir)

۲. دکتر، پژوهشکده کشاورزی هسته ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای

۳. استادیار، موسسه واکسن و سرم سازی رازی

۴. کارشناس ارشد، پژوهشکده کشاورزی هسته ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای

مقدمه

زهر زنبور عسل دارای خواص ضد التهاب، تسکین آرتريت روماتوئید، سلامت سیستم ایمنی، درمان بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS)، کاهش درد است و در صنعت داروسازی و آپی تراپی کاربرد دارد. استفاده از زهر زنبور عسل در طب سنتی تاریخچه‌ای کهن دارد، اما از ورود زهر به طب جدید بیشتر از دو دهه گذشته است. حساسیت افراد به زهر زنبور متفاوت است و وجود ترکیبات آلرژن در زهر استفاده از آن و تعیین دز بهینه را برای درمان با مشکل روبرو کرده است. زهر زنبور عسل دارای ترکیبات آلرژن شامل آنزیم‌های فسفولیپاز و هیالورونیداز، پپتید ملیتین، آمین‌های بیوژنیک مانند هیستامین، دوپامین و نوراپی نفرین است (Bogdanov, 2016). روش های مرسوم حذف عوامل آلرژن از زهر زنبور عسل شامل کاهش pH، حرارت دادن (۵۰-۳۰ درجه سلسیوس)، فریز کردن، روش آنزیمی با استفاده از ممانعت کننده‌های آنزیمی، محیط های آنیونیک فسفات و آرسنات به منظور غیرفعال کردن آنزیم های زهر است (Badria et al., 2017). پرتوتابی گاما این قابلیت را دارد که با تغییر در ساختار عوامل آلرژن زهر زنبور عسل سبب تغییر عملکرد آنها شده و برای فراوری زهر زنبور عسل مورد استفاده قرار گیرد. (Costa et al., 1999) این پژوهش با هدف کاهش سمیت و کشندگی زهر زنبور عسل با استفاده از پرتوتابی گاما و سنجش کیفیت زهر زنبور عسل فراوری شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه زهر زنبور عسل: زهر زنبور عسل مورد استفاده در این پژوهش از تولیدکننده زهر زنبور عسل آذربایجان شرقی تهیه شد. استحصال زهر زنبور عسل با استفاده از دستگاه هوشمند اصغرپور انجام شده بود.

پرتوتابی گاما: پرتوتابی نمونه‌های زهر زنبور عسل با دزهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگری گاما در پژوهشکده کاربرد پرتوها با دستگاه پرتودهنده تحقیقاتی GC-220 (Gamma Cell 220) دارای چشمه کبالت-۶۰ با اکتیویته ۴۳۵۰ کوری انجام شد. برای این منظور مقدار ۵ گرم زهر زنبور عسل در ۵ ویال جداگانه تقسیم شد. یک نمونه به عنوان شاهد بود و ۴ نمونه جهت انجام پرتوتابی گاما ارسال شد. پرتوتابی گاما با نرخ متوسط ۱/۰۵ گری در ثانیه و با دقت بیش از ۹۰ درصد صورت گرفت. کنترل کیفی پرتوتابی با استفاده از دزیمرهای مرجع فریک بر اساس استاندارد ASTM E1026-95 انجام شد (ASTM, 1984).

سنجش کیفیت زهر زنبور عسل: اندازه‌گیری پروتئین حقیقی به روش برادفورد و الکتروفورز پروتئین به روش لاملی انجام شد (Sadeghi, et al., 2011). برای سنجش مقدار مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون از تست (Thiobarbituric acid reactive substances) TBARS استفاده شد. در این روش یک مولکول تیوباربیتوریک اسید با دو مولکول مالون دی آلدئید واکنش داده و رنگ صورتی نمایان می‌شود. رسم نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف مالون دی آلدئید خالص در برابر مقدار جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر انجام شد (Sadeghi, et al., 2011).

برای انجام HPLC ابتدا نمونه‌های زهر زنبور عسل و استاندارد ملیتین، دوپامین و هیستامین با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر آماده سازی و از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. از دستگاه HPLC تجزیه‌ای مدل ۱۲۰۰ شرکت اجیلنت امریکایی با پمپ چهارگانه quaternary DE62963133 مجهز به تزریق کننده خودکار DE64764663، دکتور طول موج چندگانه DE63055885

و ستون C₁₈ با قطر ۴/۶ و طول ۱۵۰ میلی متر (۱۰۰ Å، ۵ μm) استفاده شد. فازهای متحرک A و B به ترتیب H₂O و ACN:H₂O (80:20) هر دو حاوی یک دهم درصد تری فلوئورو استیک اسید بود و با برنامه گرادیان به مدت ۴۰ دقیقه، درصد فاز متحرک B از صفر به ۸۰ رسید. کروماتوگرام در طول موج ۲۱۴ نانومتر با شدت جریان ۱ mL/min ثبت شد.

گروه بندی حیوانات: در این مطالعه از ۸۰ سر همستر نر با متوسط وزن 100 ± 7 گرم استفاده شد. گروه بندی همسترها بر اساس تعداد ۵ تیمار (دزهای پرتوتابی) و ۴ تکرار (۴ سر همستر در هر قفس) و ۴ دوز تزریق در ۲۰ قفس انجام شد. از هر قفس ۲ همستر برای انجام مطالعات بافت شناسی تشریح شد.

تعیین دوز کشندگی ۵۰ درصد: برای تعیین دوز کشندگی ۵۰ درصد زهر زنبور عسل (LD₅₀) به هر ۴ سر همستر در هر گروه تیماری دزهای ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی گرم زهر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی ساعت ۸ صبح و یک بار تزریق شد (El Bakary, et al., 2020). بعد از تزریق میزان مرگ و میر همسترها ثبت و دوز کشندگی ۵۰ درصد به روش Spearman-Kärber محاسبه شد. در این روش ابتدا فاکتورهای a و b و حاصلضرب این دو برای هر گروه محاسبه شد. فاکتور a تفاوت دز هر گروه از گروه قبلی است و فاکتور b میانگین مرگ و میر هر دو گروه متوالی است. برای محاسبه مقدار LD₅₀ زهر زنبور عسل طبق روش Spearman-Kärber مجموع حاصلضرب a×b های تمامی گروه‌ها بر تعداد حیوان مورد استفاده برای هر گروه تقسیم شد و از بیشترین مقدار دوز مورد استفاده کسر شد (Ramakrishnan, 2016).

$$LD_{50} \text{ (mg/kg)} = \text{Dose}_{\text{Max}} - (\sum a \times b) / n$$

بافت شناسی کبد: همسترهای دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف تشریح و بافت کبد جدا شد. بافت کبد ابتدا با استفاده از سرم فیزیولوژیکی شستشو و سپس در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. بافت کبد پس از آبگیری با درجات صعودی اتانول بوسیله پارافین قالب گیری شد. برش گیری بافت کبد با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم انجام شد. برش های تهیه شده با استفاده از رنگ همتوکسلین-ئوزین رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ با درشت نمایی ۱۰۰× مشاهده و تصویربرداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: از مدل آماری $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ و طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. در این مدل Y_{ij} = صفت اندازه گیری شده؛ μ = میانگین کل برای هر صفت؛ T_i = اثر دز پرتوتابی؛ e_{ij} = خطای آزمایشی است. داده های آزمایشی به کمک نرم افزار آماری SAS و رویه GLM تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

مقدار پروتئین حقیقی زهر زنبور عسل

نتایج مقدار پروتئین حقیقی زهر زنبور عسل قبل و بعد از پرتوتابی در جدول ۱ گزارش شده است. طبق نتایج مقدار پروتئین حقیقی و مالون دی آلدئید در نمونه های پرتوتابی شده تفاوتی با نمونه شاهد نداشت ($P > 0/05$). پرتوتابی سبب تغییر ساختار پروتئین شده و تأثیری بر مقدار پروتئین ندارد (Puchala, et al., 1993). تغییر ساختار پروتئین در اثر پرتوتابی شامل تجزیه

زیرواحدهای پروتئینی و اتصال زنجیره های پروتئینی (ژلاتینه شدن پروتئین) به صورت باندهای مشخص در مطالعات الکتروفورز بین ژل بالا و پایین قابل تشخیص است (Ciesla, et al., 2004).

جدول ۱- مقدار پروتئین حقیقی و مالون دی آلدئید زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف

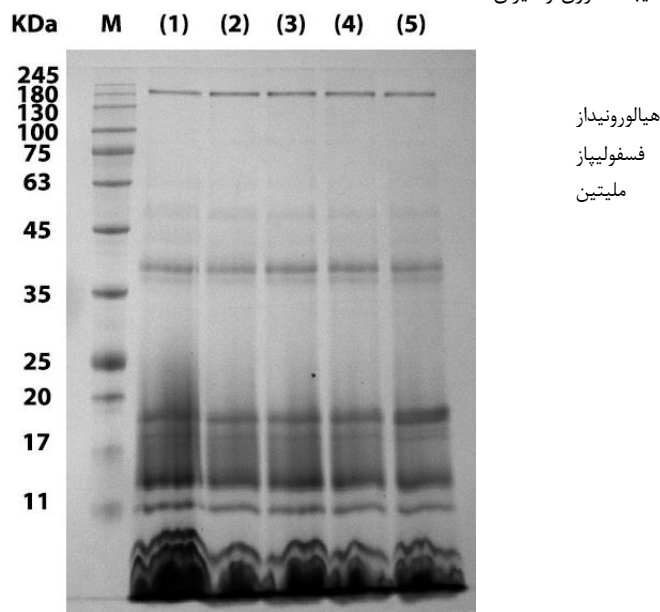
مالون دی آلدئید (nmol/ml)	پروتئین حقیقی (µg/mg)	
۰/۰۲	۱۶۰/۸۵	شاهد
۰/۰۳	۱۵۹/۹۵	۲ کیلوگری
۰/۰۴	۱۶۲/۳۰	۴ کیلوگری
۰/۰۳	۱۶۰/۹۶	۶ کیلوگری
۰/۰۲	۱۶۳/۶۰	۸ کیلوگری
۰/۰۴۵	۵/۳۵۸	اشتباه معیار (SEM)

عدم درج حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر نبود اختلاف معنی دار ($P > 0.05$) می باشد.

الکتروفورز زهر زنبور عسل

الگوی زیرواحدهای زهر زنبور عسل قبل و بعد از پرتوتابی در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج الکتروفورز ۱۰ باند مشخص با وزن مولکولی ۶/۱۵ تا ۱۹۲/۷۶ کیلودالتون در زهر زنبور عسل مورد مطالعه مشاهده شد. زیرواحدهای پروتئین زهر زنبور عسل مورد مطالعه و وزن مولکولی آن‌ها در جدول ۲ گزارش شده است. زیرواحدهای هیالورونیداز (۳۹/۸۹ کیلودالتون)، فسفولیپاز (۱۸/۸۰ و ۱۷/۷۹ کیلودالتون) و ملیتین (۵/۶۷ کیلو دالتون) شناسایی شد. زیرواحد دوپامین (۲/۰۲ کیلودالتون) شناسایی نشد و به دلیل کوچک بودن مولکول آن نیاز به وسعت بیشتر ژل دارد.

الگوی زیرواحدهای پروتئین زهر زنبور عسل (شکل ۱) و نتایج دنسیتومتری ژل الکتروفورز پروتئین زهر زنبور عسل (شکل ۲؛ جدول ۲) نشان داد که پرتوتابی با دز ۴ و ۶ کیلوگری سبب کاهش مقدار فسفولیپاز (زیرواحدها ۵) و افزایش زیرواحدهای پروتئینی کوچکتر از ۱۱ کیلودالتون شد ($P < 0.05$). فسفولیپاز تقریباً ۱۰ تا ۱۲ درصد از وزن خشک زهر زنبور عسل است. فسفولیپاز یک آلرژن قوی و مخرب‌ترین جز زهر زنبور عسل است که اثر همولیتیک دارد و سبب التهاب می شود. فسفولیپاز مهم‌ترین عامل حساسیت انسان به زهر است و باعث انقباض ماهیچه‌های صاف و اختلالات سلولی می‌شود. هیالورونیداز از دیگر اجزای زهر زنبور عسل است که ۱ تا ۲ درصد وزن خشک زهر را شامل می شود. هیالورونیداز سبب تجزیه بافت ها می شود (Bogdanov, 2016).

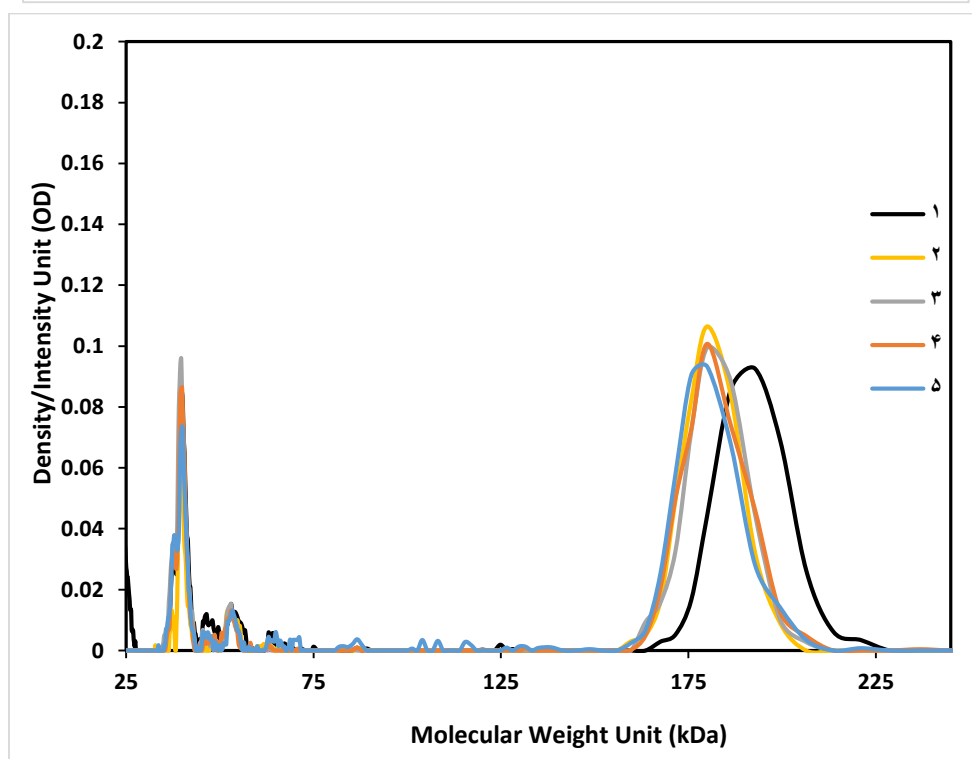
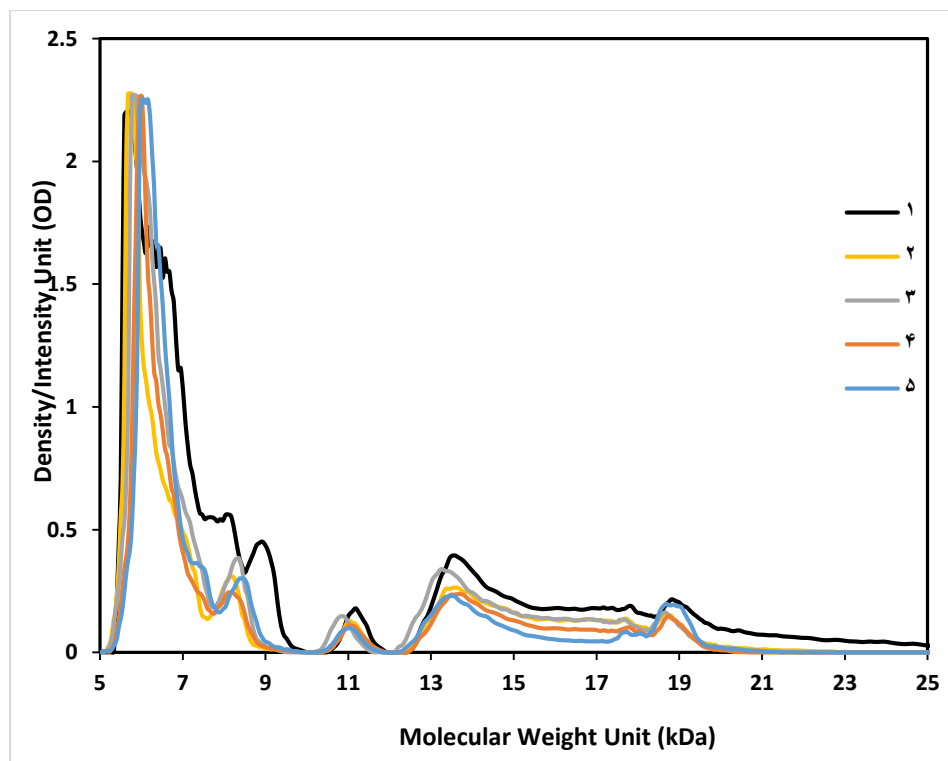


۰kGy ۲kGy ۴kGy ۶Gy ۸kGy مارکر وزن مولکولی

شکل ۱- الگوی زیرواحدهای پروتئین زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف

M مارکر وزن مولکولی؛ لاین ۱ زهر زنبورعسل خام، لاین ۲ زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دز ۲ کیلوگری، لاین ۳ زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دز ۴ کیلوگری، لاین ۴ زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دز ۶ کیلوگری، لاین ۵ زهر زنبورعسل پرتوتابی شده با دز ۸ کیلوگری، واسرشتی پروتئین در اثر پرتوتابی عامل غیرفعالسازی بسیاری از آنزیم‌ها در محصول پرتوتابی شده است. پرتوتابی با دادن انرژی و شکستن پیوندهای هیدروژنی در ساختمان پروتئین، تغییر ساختار ترمودینامیکی و در نهایت تغییر موقعیت اسیدهای آمینه آب‌گریز که در حالت طبیعی در بخش درونی مولکول پروتئین‌ها قرار دارند می‌شود. با تغییر موقعیت اسیدهای آمینه آب‌گریز و در سطح قرارگرفتن آن‌ها، آب‌گریزی یا هیدروفوبیسیستی سطحی پروتئین افزایش می‌یابد. در این شرایط پروتئین‌ها به هم متصل شده و یک مجموعه پروتئینی با وزن مولکولی زیاد تشکیل می‌دهند. تجمع یافتن و وارد نشدن مجموعه‌های پروتئینی در حد بالایی مؤید افزایش وزن مولکولی و اندازه پروتئین‌ها است (Ciesla, et al., 2004).

تغییر دانسیته نوری زیرواحدهای فسفولیپاز زهر زنبورعسل پرتوتابی شده در نتایج الکتروفورز نشان می‌دهد که پرتوتابی سبب تغییر ساختار این آنزیم شده است. نتایج HPLC نیز تغییر مقدار فسفولیپاز زهر زنبورعسل پرتوفراوری شده را نشان می‌دهد (جدول ۳).

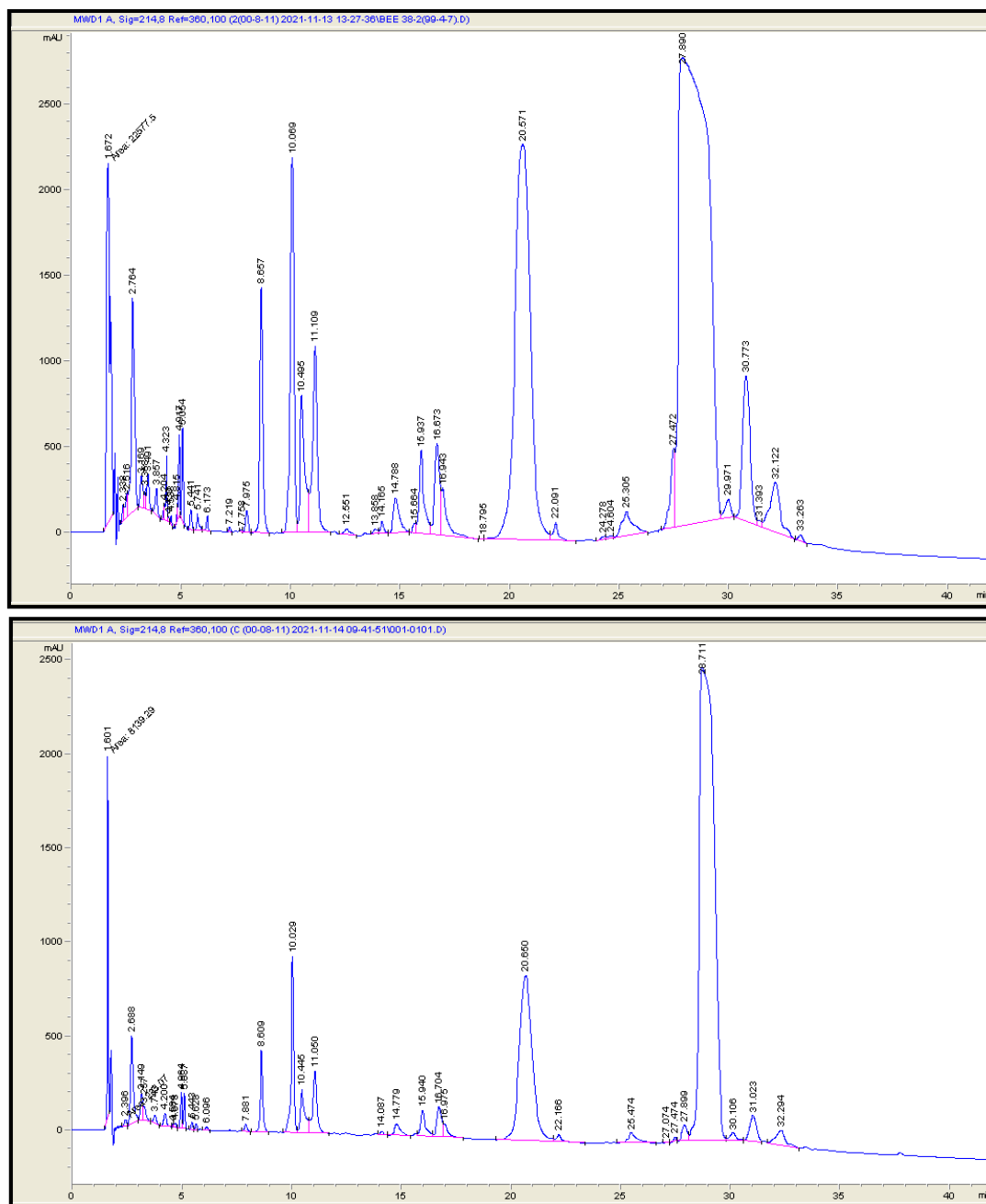


شکل ۲- دنسیتومتری ژل الکتروفورز پروتئین زهر زنبور عسل

جدول ۲- OD زیر واحدهای پروتئین زهر زنبور عسل پرتوتابی شده

پروتئین	وزن مولکولی (کیلو دالتون)	شاهد	۲ کیلوگری	۴ کیلوگری	۶ کیلوگری	۸ کیلوگری
زیر واحد ۱	۱۹۲/۷۶	۰/۴۲	۰/۷۲	۰/۶۰	۰/۸۲	۰/۷۲
زیر واحد ۲	۵۲/۹۹	۰/۴۱	۰/۲۸	۰/۲۲	۰/۲۸	۰/۲۱
زیر واحد ۳	۳۹/۸۹	۱/۱۱	۱/۱۵	۱/۵۸	۱/۸۷	۱/۳۳
زیر واحد ۴	۳۷/۷۷	۰/۳۴	۰/۱۳	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۶۹
زیر واحد ۵	۱۸/۸۰	۶/۹۸	۴/۶۲	۳/۸۴	۳/۱۳	۵/۹۰
زیر واحد ۶	۱۷/۷۹	۲/۷۵	۲/۷۹	۲/۳۷	۲/۶۲	۱/۹۷
زیر واحد ۷	۱۳/۵۷	۷/۷۳	۸/۸۸	۱۰/۳۳	۱۰/۳۱	۷/۵۳
زیر واحد ۸	۱۱/۱۸	۱/۴۸	۱/۶۹	۱/۷۱	۱/۸۰	۱/۴۶
زیر واحد ۹	۸/۱۰	۵/۰۱	۶/۰۲	۶/۲۸	۵/۹۶	۶/۲۲
زیر واحد ۱۰	۵/۶۷	۶۸/۴۴	۷۰/۸۲	۷۲/۶۰	۷۱/۶۶	۷۳/۹۵

طبق نتایج HPLC نمونه زهر زنبور عسل قبل و بعد از پرتوتابی، هیستامین، دوپامین، فسفولیپاز و ملیتین به ترتیب در زمان های ۱/۶۰۱، ۲/۶۸۸، ۲۰/۶۵ و ۲۸/۷۱۱ دقیقه تشخیص داده شد. در نمونه زهر شاهد مقدار هیستامین، دوپامین، فسفولیپاز و ملیتین بر اساس درصدی از سطح زیر منحنی به ترتیب ۴/۰۶۴، ۲/۲۰۳، ۲۰/۴۵۷ و ۵۶/۴۱۵ درصد بود (شکل ۳). بعد از پرتوتابی مقدار هیستامین، دوپامین و فسفولیپاز کاهش یافت (جدول ۳). هیستامین ۱ درصد وزن خشک زهر را شامل می شود و یکی از عوامل اصلی ایجاد درد، خارش و حساسیت پوستی پس از نیش زنبور عسل است (Bogdanov, 2016).



شکل ۳- کروماتوگرام زهر زنبور عسل قبل (بالا) و بعد (پایین) از پرتوتابی با دز ۶ کیلوگری

جدول ۳- نتایج HPLC زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف (درصد)

پروتئین	شاهد	۲ کیلوگری	۴ کیلوگری	۶ کیلوگری	۸ کیلوگری
هیستامین	۴/۰۶	۳/۹۶	۳/۸۹	۳/۸۷	۳/۹۷
دوپامین	۲/۲۰	۱/۸۱	۱/۶۲	۱/۱۸	۰/۹۶
فسفولیپاز	۲۰/۴۵	۱۷/۳۹	۱۶/۷۵	۱۳/۲۰	۱۲/۹۰
ملیتین	۵۶/۴۱	۵۴/۷۷	۵۳/۲۴	۵۴/۴۳	۵۲/۱۳

داده‌های مربوط به دوز کشندگی ۵۰ درصد در جدول ۴ گزارش شده است. طبق نتایج، استفاده از پرتوتابی سبب افزایش دوز کشندگی ۵۰ درصد شد ($P < 0.05$). پرتوتابی زهر زنبور عسل با دز ۲ و ۴ کیلوگری تأثیری بر افزایش دوز کشندگی نداشت ($P > 0.05$)؛ ولی پرتوتابی با دز ۶ و ۸ کیلوگری سبب افزایش ۳۴ درصدی دوز کشندگی زهر زنبور عسل شد. دلیل افزایش دز کشندگی کاهش سمیت زهر در اثر پرتوتابی است که با نتایج الکتروفورز و HPLC مطابقت دارد. پرتوتابی با دز ۶ و ۸ کیلوگری با کاهش مقدار ترکیبات آلرژن شامل دوپامین، هیستامین و فسفولیپاز سبب کاهش سمیت زهر زنبور عسل و افزایش دوز کشندگی ۵۰ درصد شده است.

جدول ۴= دوز کشندگی ۵۰ درصد (میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن همستر)

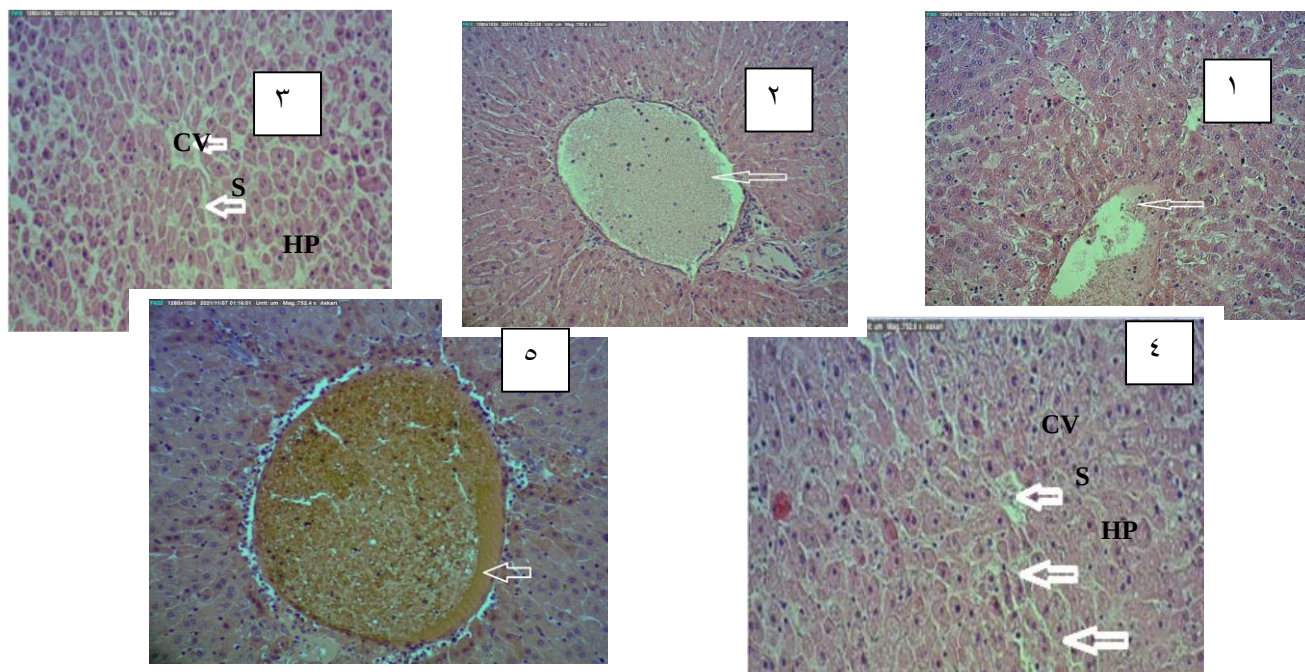
تیمار	دوز کشندگی ۵۰ درصد
شاهد	۱/۲۵ ^b
۲ کیلوگری	۱/۲۸ ^b
۴ کیلوگری	۱/۳۷ ^b
۶ کیلوگری	۱/۶۳ ^a
۸ کیلوگری	۱/۶۸ ^a
اشتباه معیار (SEM)	۰/۲۴۳

درج حروف متفاوت بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار است ($P < 0.05$).

بافت شناسی کبد

ساختار بافت شناسی کبد همسترهای دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف در مقاطع عرضی ناحیه ورید مرکزی در شکل ۴ نشان داده شده است. در حالت عادی ورید مرکزی حالت طبیعی داشته طناب های کبدی به صورت شعاعی و منظم در اطراف ورید مرکزی قرار گرفته است و سینوزوئیدها سالم و منظم هستند. تزریق زهر زنبور عسل پرتوتابی نشده سبب خونریزی در ورید کبدی، تخریب و نکروز هپاتوسیت‌ها و نامنظم شدن قرارگیری آن‌ها و همچنین افزایش اندازه و فاصله

سینوزوئیدهای کبد شد. تزریق زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دز ۲ کیلوگری سبب احتقان برجسته ورید کبدی شد. کاهش ادم و پرخونی سیاهرگ های مرکزی و کاهش تورم هپاتوسیت ها شد. هیستوپاتولوژی بافت کبدی با تزریق زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دز ۴ و ۶ کیلوگری نرمال بود. پرتوتابی با کاهش ترکیبات آلرژن بویژه فسفولیپاز و هیالوزونیداز سبب کاهش التهاب و خونریزی شده است. در گروه دریافت کننده زهر پرتوتابی با دز ۸ کیلوگری، نکروز شدید کبدی اطراف پورتال مشاهده شد. دلیل آسیب ها می تواند مربوط به اثرات ترکیبات حاصل از شکست اجزای زهر زنبور عسل در اثر پرتوتابی باشد که در نتایج الکتروفورز و HPLC تشخیص داده شد.



شکل ۴: ساختار بافت شناسی کبد همسترهای دریافت کننده زهر زنبور عسل پرتوتابی شده با دزهای مختلف. ۱- گروه شاهد: خونریزی در ورید کبدی و نکروز سلول های مجاور را نشان داد (فلش). ۲- گروه دریافت کننده زهر پرتوتابی با دز ۲ کیلوگری: احتقان برجسته ورید کبدی را نشان داد. ۳- گروه دریافت کننده زهر پرتوتابی با دز ۴ کیلوگری: هیستوپاتولوژی بافت کبدی نرمال را نشان داد. ۴- گروه دریافت کننده زهر پرتوتابی با دز ۶ کیلوگری: هیستوپاتولوژی بافت کبدی نرمال را نشان داد. ۵- گروه دریافت کننده زهر پرتوتابی با دز ۸ کیلوگری: نکروز شدید کبدی اطراف پورتال را نشان داد (فلش). HP: هپاتوسیت، S: سینوزوئید، CV: ورید مرکزی.

نتیجه گیری کلی

استفاده از پرتوتابی با دز ۶ و ۸ کیلوگری سبب افزایش دوز کشندگی ۵۰ درصد زهر زنبور عسل شد ولی با توجه به اینکه دز ۸ کیلوگری سبب شکست زیرواحدهای سنگین و افزایش زیرواحدهای سبک زهر زنبور عسل شد و اثرات منفی روی بافت کبد داشت می توان نتیجه گرفت که دز ۶ کیلوگری برای کاهش سمیت زهر زنبور عسل مناسب است.

منابع

- ASTM, (1984). Method for Using The Fricke Dosimeter to Measure Absorbed Dose in Water. ASTM Standard E 1026.
- Badria, F., Fathy, H.M., Fatehe, A.S. and Ghazy, M.G. (2017). Honey and Its Products. Chemical, Biological and Therapeutic Applications, Grin Verlag. 268 Pp.
- Munich. Bogdanov, S. (2016). Bee Venom: Production, Composition, Quality. The Bee Venom Book, Chapter 1, Muehlethurnen, Switzerland.
- Ciesla, K., Salmieri, S., Lacroix, M., Le Tien, C. (2004). Gamma irradiation influence on physical properties of milk proteins. Radiation Physics and Chemistry 71: 93–97.
- Costa H, Boni-Mitake M, Souza C.F. and Rogero J.R. (1999). Effects of gamma radiation on bee venom: preliminary studies. VII General Congress on Nuclear Energy, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- El Bakary, N.M., Alsharkawy, A.Z., Shouaib, Z.A., and Barakat, E.M.S. (2020). Role of Bee Venom and Melittin on Restraining Angiogenesis and Metastasis in γ -Irradiated Solid Ehrlich Carcinoma-Bearing Mice. Integr Cancer Ther. 19: 1-13.
- Puchala, M., and Schessler, H. (1993). Oxygen effect in the radiolysis of proteins. International Journal of Radiation Biology, 64: 149–156.
- Ramakrishnan, M.A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J Virol. 12; 5(2):85-6.
- Sadeghi, A.A., Shawrang, P., and Aminafshar, M. (2011). Analysis of Biological Components. 1th edn. Islamic Azad University Science and Research Branch Publications, 537 Pp. Tehran.

Effects of gamma irradiation on allergen compounds and lethality of bee venom in a hamster animal model

P. Shawrang^{1*}, F. Abbasi¹, F. Tahoori², H. Askari¹

Received:2021.12.8

Accepted:2022.3.12

Abstract

Introduction: This study aimed to investigate the effects of gamma irradiation on LD₅₀ of honey bee venom.

Methods: Venom samples were irradiated at doses of 0,2,4,6 and 8 kGy. Eighty hamsters were allocated to 5 treatments and 4 replicates. 0.5, 0.75, 1 and 2 mg of venom per kg of body weight were injected intra peritoneal and mortality recorded then was computed at LD₅₀. Hamsters' liver samples collected and fixed in 10% formalin then sliced, and stained. Data analyzed by SAS Software. **Result:** Irradiation decreased phospholipase amount and increased the small subunits of protein. Irradiation at doses of 6 and 8 kGy increased LD₅₀ by 34 percent and decreased the inflammation of hepatocytes and vein hyperemia in the liver. **Discussion:** Irradiation at dose of 6 kGy can be apply to reduce the toxicity of bee venom by removing allergen factors.

Key words: *Honey bee venom, Irradiation, Lethal dose, Toxicity.*

¹ Associate Professor, Nuclear Agriculture Research Institute, Nuclear Science and Technology Research Institute
(*Corresponding author: pshawrang@aeoi.org.ir)

² Ph.D., Nuclear Agriculture Research Institute, Nuclear Science and Technology Research Institute

³ Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Institute

⁴ Senior expert, Nuclear Agriculture Research Institute, Nuclear Science and Technology Research Institute

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۳

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>



10.22051/JAB.2021.34309.1398

تاثیر سرمازدگی بر سه رقم تجاری کیوی (هایوارد، طلایی و توسرخ)

شهرام صداقت حور^{۱*}، سیده خدیجه عباس نیا زارع^۲، سیده آمنه سجادی^۳

چکیده

به منظور بررسی میزان تحمل به سرما در سه رقم کیوی تجاری (هایوارد، طلایی و توسرخ) آزمایشی به صورت فاکتوریل سه عاملی در قالب بلوک‌های تصادفی با سه تکرار از اوایل بهمن سال ۱۳۹۷ تا اواخر فروردین سال ۱۳۹۸ انجام شد. در این آزمایش، فاکتور اول رقم کیوی در سه سطح شامل ارقام هایوارد، طلایی و توسرخ، فاکتور دوم اعمال تیمار سرما در ۳ سطح (۴، ۶- و ۱۶- درجه سانتی‌گراد) و فاکتور سوم در سه مرحله فنولوژیکی ارقام کیوی اعمال شد که شامل مراحل: رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و میوه‌های تلقیح شده بود. صفات ارزیابی شده شامل: عناصر سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، نشت یونی و پرولین بود. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان کلسیم، منیزیم، شاخص نشت یونی و پرولین نمونه‌ها در میوه‌های تلقیح شده دارای بیشترین میزان بود و در زمان رکود و متورم شدن جوانه‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر آماری با هم نداشتند. بر اساس نتایج حاضر، بیشترین میزان کلسیم و پرولین تحت دمای ۶- درجه سانتی‌گراد بدست آمد. همچنین بر اساس نتایج این آزمایش بیشترین میزان پرولین و کمترین میزان نشت یونی مربوط به رقم طلایی بود. از آنجایی که افزایش نشت یونی نشانه حساسیت بیشتر به سرما است لذا می‌توان نتیجه گرفت که رقم طلایی مقاومت بیشتری به سرما دارد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، فنولوژیکی، میوه‌بندی، نشت یونی.

۱. دانشیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (*نویسنده مسئول: sedaghathoor@iaurasht.ac.ir)

۲. دکتری تخصصی باغبانی، آموزش و پرورش لاهیجان، لاهیجان، ایران

۳. استادیار گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

مقدمه

گیاه کیوی از ارتفاع زیر صفر تا ۲۰۰۰ متری از سطح دریا در شمال ایران می‌تواند کشت شود. مقاومت گیاه کیوی به تغییرات دما و دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد، بیش‌تر از درختان مرکبات است، اما گل‌های کیوی در مقایسه با گل‌های مرکبات حساسیت بیشتری نسبت به سرما دارند. یخبندان پاییزی تولید غنچه گیاه در فصل بهار را به تاخیر می‌اندازد. هرگاه سرما پس از گلدهی اتفاق افتد، مانع تشکیل میوه خواهد شد (شیخی، ۱۳۸۴). تاکنون بیش از ۶۰ گونه و ۱۰۰ واریته از کیوی شناسایی شده است. رقم‌های معروف آن عبارتند از: رقم‌های ماده (هایوارد، برونو، آبوت، مانتی، آلیسون، گراسی، رد و گلدن) و رقم‌های نر (ماتوآ و توموری) است (محمدی و عبدی سنه‌کوهی، ۱۳۷۲). در میان ارقام مختلف کیوی‌فروت، کیوی توسرخ و کیوی طلایی از جمله میوه‌های کیوی‌فروت می‌باشند که به دلیل دارا بودن برخی از خصوصیات مطلوب، مانند زودرسی، عدم پرز و صاف بودن پوست میوه، رنگی بودن گوشت، طعم و مزه شیرین‌تر نسبت به گونه‌های سبز دارای بازارپسندی مناسبی هستند و با توجه به این خصوصیات، در مصارف تازه خوری و صنایع تبدیلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (افشار محمدیان و اسحاقی تیموری، ۱۳۸۷). بدون شک هایوارد بهترین رقمی است که تاکنون کشت شده است؛ میوه‌ها بزرگ‌تر از استاندارد و شکل و اندازه آنها کاملاً یکنواخت، موزون و بازارپسند است (محمدی و عبدی سنه‌کوهی، ۱۳۷۲). میوه‌های کیوی را می‌توان به مدت ۴ تا ۶ ماه در سردخانه با دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد، هر چند در این مدت سفتی بافت میوه به میزان زیادی کاهش می‌یابد، اما در بعضی موارد به علت کیفیت پایین میوه‌ها، نمی‌توان آن‌ها را به مدت طولانی در سردخانه نگهداری کرد (Antunes, & Sfakiotakis, 2002). کیوی برای تولید مناسب به ۳۰۰ تا ۴۰۰ ساعت تقریباً ۱۷-۱۳ شبانه روز دمای کمتر از ۷ درجه سانتی‌گراد نیاز دارد. هرچند یخبندان در از بین بردن نهال کیوی به خصوص نهالی که در دوران اولیه رشد می‌باشد، بسیار موثر است. با این وجود یک دوره استراحت ۲۳۰ روزه بدون یخبندان کمک موثری به آماده نمودن نهال کیوی برای گلدهی در سال بعد است. در مناطقی که درجه حرارت زمستان به کمتر از ۱۲ درجه سانتی‌گراد زیر صفر باشد، پرورش کیوی غیرممکن است، مگر اینکه امکانات کامل برای ایجاد باران مصنوعی فراهم شده باشد. به‌طور کلی خسارت و زیان شدید موقعی به گیاه وارد می‌شود که یک زمستان زودرس به دنبال یک پائیز معتدل بروز کند. هرچند جوانه‌ها، گل‌ها و میوه‌های کیوی در حرارت ۱/۵- درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر از آن صدمه می‌بیند، در فصل خواب و بی‌برگی، گیاه بالغ تا حدود ۱۲- درجه سانتی‌گراد را می‌تواند تحمل کند (محمدی و عبدی سنه‌کوهی، ۱۳۷۲). دمای پایین باعث کاهش فعالیت بیوسنتزی گیاهان، انجام وظایف فرآیندهای فیزیولوژیک و هم‌چنین باعث خسارت‌های دائمی و در نهایت باعث مرگ گیاه می‌شود. مقاومت به سرما می‌تواند به صورت توانایی گیاهان در تحمل کردن دمای زیر صفر بدون ایجاد خسارت سرما، موضوع مهمی برای تحقیق است. توانایی تخمین میزان مقاومت به سرما در گیاهان یک تحقیق بنیادی و کاربردی است (Weiser, 1970).

مقاومت گیاه نسبت به سرما و یخبندان یک صفت کمی است که تحت تاثیر مجموعه پیچیده‌ای از عوامل و متغیرهای محیطی قرار دارد. گیاهان چوبی مناطق معتدله و شمالی درجه حرارت‌های یخ‌زدگی را به صورت مقطعی دریافت می‌کنند. مشکل اصلی که گیاهان چوبی در شرایط درجه حرارت زیر صفر با آن مواجه هستند، تشکیل یخ است. بلورهای یخ می‌توانند موجب آسیب شدید به سلول‌های زنده شوند که این عمل می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود (کافی و مهدوی دامغانی، ۱۳۸۶). گیاهان چند ساله معمولاً در پاسخ به کوتاه شدن طول روز، کاهش دما و یخبندان‌های مقطعی شروع به تطابق‌یابی و افزایش تحمل به سرما و یخبندان

می‌کنند (Levitt, 1980). میزان رشد مجدد پس از برطرف شدن سرما و همچنین مقادیر نکروزه شدن ساقه نیز روشی بود که توسط Chat (1995) روی شاخه‌های کیوی استفاده شد. در نتیجه تحقیقات او مشخص شد که گونه *Actinidia deliciosa* دارای بیشترین بافت مردگی و کمترین میزان رشد مجدد پس از قرار گرفتن در محیط گرم بود.

دمای بحرانی برای سرمازدگی گونه‌های مختلف گیاهی، بافت‌ها و مراحل رشد متفاوت است و بروز یخبندان ۴- درجه سانتیگرادی یا شدیدتر از آن در هر زمانی از سال، به برگ‌های مو آسیب می‌زند. درحالی‌که شکوفه‌ها، خوشه‌ها و شاخساره‌های جوان در مقابل سرما حساس‌تر هستند و در دمای ۲- درجه سانتیگراد آسیب می‌بینند (Wilson, 2001). (Barranco & Ruiz (2005) با بررسی تحمل به یخ زدگی ۸ رقم زیتون نتیجه گرفتند که مقادیر نشت یونی در اثر اعمال هر چه بیشتر سرما تا ۲۲- درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد. جالب اینکه این افزایش در ارقام حساس زیتون مورد آزمایش آنها شدیدتر و به صورت ناگهانی دیده شد. اکثر درختان میوه مناطق معتدله در معرض سرمای زمستان یا یخبندان بهاره قرار می‌گیرند که این امر موجب خسارت‌های شدید اقتصادی می‌شود. یخبندان‌های شدید حتی می‌توانند به تنه و شاخه‌های بزرگتر خسارت وارد آورند. سیاه شدن آوند چوبی که عارضه‌ای ناشی از قهوه‌ای شدن اکسیداتیو سلول‌های این آوند است، نتیجه یخبندان‌های زمستانی است (طلایی، ۱۳۷۷). مرحله‌ی فنولوژیکی درختان می‌تواند در رابطه با آسیب‌های مهمی زیاده داشته باشد. مرحله گلدهی و ریزش گلبرگ در درختان بیشتر تحت تاثیر دماهای پایین قرار گرفته و حساس‌تر اند (Pakkish et al., 2011). در تحقیق حاضر، تنش سرما (یخ‌زدگی) در سه رقم کیوی تجاری (هایوارد، طلایی و توسرخ) با هدف تعیین مقاومت به سرمای جوانه‌های کیوی در مراحل مختلف رشد و همچنین تعیین بیشترین سرمای قابل تحمل در ارقام مورد نظر، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش روی سه رقم تجاری کیوی شامل هایوارد، طلایی و توسرخ انجام شد. برای این آزمایش از تاک‌های هم سن کیوی (۸ ساله) موجود در منطقه استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل سه عاملی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از شاخه‌های یک‌ساله بارده با قطر حدود یک سانتی‌متر استفاده شد. در هر تکرار ۹ تاک کیوی (از هر رقم سه تاک) انتخاب و مواد گیاهی لازم یعنی جوانه‌ها و میوه‌های تحت آزمایش از این تاک‌ها تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. فاکتور اول در این آزمایش رقم کیوی در سه سطح شامل ارقام هایوارد، طلایی و توسرخ و فاکتور دوم اعمال تیمار سرما در ۳ سطح در نظر گرفته شد. عامل سرما در ۳ سطح شامل تیمارهای: ۱) شاهد دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد در اتاق تاریک؛ ۲) دمای ۶- درجه سانتی‌گراد؛ ۳) دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد بود که با استفاده از فریزر ترموگرادیان قابل تنظیم تا دماهای مورد نظر اعمال شد. تیمارها در ۳ مرحله فنولوژیکی ارقام کیوی (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و میوه‌های تازه تلقیح شده) به عنوان عامل سوم اعمال شد.

در هر مرحله سه تاک (تکرار) از هر رقم انتخاب و از هر تاک ۴ شاخه یک ساله در چهار طرف تاک انتخاب و از هر شاخه تعدادی جوانه در حال رکود، متورم شده و میوه‌های تازه تلقیح شده برداشت شد. جوانه‌های در حال رکود در پانزدهم بهمن ماه، جوانه‌های متورم شده در تاریخ نوزدهم اسفند ۱۳۹۷ و میوه‌های تازه تلقیح یافته (طلایی و توسرخ) در تاریخ بیستم اردیبهشت ۱۳۹۸ و رقم هایوارد در تاریخ بیست و هشتم اردیبهشت ۱۳۹۸ برداشت شد و در هر مرحله بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. طبق روش

پیشنهادی (Levitt 1980)، از نمونه‌های برداشت شده ۳ گرم از شاخه‌ها جدا شد و برای اعمال تیمارهای سرما، مواد انتخابی (جوانه‌های راکد، متورم و میوه‌های تازه تشکیل شده) در مراحل مختلف با آب مقطر اسپری شده و به فریزر ترموگرادیان منتقل شد و با سرعت انجماد ۱۰ درجه در ساعت تا ۲ درجه سانتیگراد خنک شد، سپس با سرعت انجماد ۵ درجه در ساعت تا دماهای مورد نظر خنک شد و نمونه‌ها ۳ ساعت در دماهای مذکور نگه داشته شدند. بدین منظور ۰/۵ گرم نمونه از هر پلات آزمایشی با ۵۰ سی‌سی آب مقطر دوباره تقطیر شده را داخل ظروف دربسته در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد، سپس EC_1 آن اندازه گرفته شد و برای اندازه‌گیری EC_2 نیز ۰/۵ گرم نمونه را به مدت ۲۴ ساعت منجمد کرده و بعد از آن دوباره نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند، آن‌گاه با دستگاه EC سنج اعداد آن خوانده شد و سپس نشت یونی از رابطه‌ی زیر بدست آمد:

$$= 100 \times (EC_1 \div EC_2) = \text{نشت یونی}$$

و همچنین غلظت برخی از کاتیون‌ها از جمله Na, K, Mg, Ca و نیز میزان پرولین اندازه‌گیری شد.

عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری عناصر

برای استخراج عناصر، ۰/۳ گرم از نمونه خشک شده در آون را به کمک ترازوی مخصوص توزین و به بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۲/۳ میلی لیتر از مخلوط اسیدها (اسید سولفوریک و اسید سالیسیلیک) را اضافه کرده و با دقت تکان داده تا تمامی مواد گیاهی خیس شود. مخلوط یک شب به حال خود قرار داده شد و در روز بعد نمونه به مدت یک ساعت تا حرارت ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و بعد از خنک شدن، ۵ قطره آب اکسیژنه اضافه نموده و بالن‌ها دوباره روی اجاق قرار داده شد و حرارت به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد تا آب تبخیر و بخار سفید ظاهر شود. این عمل را تا بی‌رنگ شدن نمونه ادامه یافت. سپس نمونه‌ها را از روی اجاق برداشته و بعد از خنک شدن ۱۰ میلی لیتر آب اضافه نموده و تکان داده تا بیشتر مواد رسوب شده حل شود سپس به حجم رسانده و بعد از بهم زدن صاف شد (امامی، ۱۳۷۵). از عصاره تهیه شده برای اندازه‌گیری عناصر کلسیم و منیزیم، به وسیله دستگاه جذب اتمی استفاده شد (امامی، ۱۳۷۵). از عصاره تهیه شده برای اندازه‌گیری پتاسیم و سدیم توسط نشر شعله ای یا فلاایم‌فتمتر مدل Jenway استفاده شد (امامی، ۱۳۷۵).

اندازه‌گیری پرولین

اندازه‌گیری پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد. جهت اندازه‌گیری پرولین ۰/۱ گرم از بافت تر را در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده و مخلوط یکنواختی تهیه شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌گرم معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط کرده و ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار گرفت. بعد از این مدت، جهت قطع انجام کلیه واکنش‌ها، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ، سرد شد، سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه کرده و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه‌داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه، ۲ لایه کاملاً مجزا در آن‌ها تشکیل شد. از لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود، برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده شد. جذب مقدار مشخصی از این ماده رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و مقدار

پروبلین در هر نمونه با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد ($Y = 0.0008X + 0.0067$)، تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار MSTATC، مقایسه میانگین تیمارها به روش LSD انجام شد.

نتایج و بحث

مقدار عناصر در ارقام کیوی در دما و مراحل مختلف رشد جوانه‌ها

سدیم

بر اساس نتایج بدست آمده و تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر فاکتورهای آزمایشی بر میزان سدیم، اثر رقم، اثر سطوح مختلف سرما، اثر ساده مرحله فنولوژیک (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و میوه‌های تلقیح شده)، اثرات متقابل "رقم × سرما"، "رقم × مرحله فنولوژیک" و اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل "سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان سدیم معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشترین میزان سدیم مربوط به هایوارد بود و کمترین میزان سدیم مربوط به رقم طلایی و توسرخ بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که بیشترین میزان سدیم در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نداشت و کمترین میزان سدیم هم در دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد بدست آمد. بیشترین میزان سدیم در مراحل رکود و متورم شدن جوانه‌ها و کمترین میزان سدیم هم در مرحله میوه‌های تلقیح شده بدست آمد (جدول ۴). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × سرما"، بیشترین میزان سدیم متعلق به "هایوارد × دمای ۴+" بود و کمترین میزان سدیم هم مربوط به "طلایی × دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد" بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × مرحله فنولوژیک" بر میزان سدیم (جدول ۶) نشان می‌دهد که بیشترین میزان سدیم مربوط به "هایوارد × رکود" بود و کمترین میزان سدیم هم مربوط به همه "ارقام کیوی (هایوارد، طلایی و توسرخ) × میوه‌های تلقیح شده" بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر دوگانه "سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان سدیم مربوط به "دمای ۶- درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها" بود و کمترین میزان سدیم هم تحت ترکیب تیماری دماهای "۴+، ۶- و ۱۶- درجه سانتی‌گراد × متورم شدن" بدست آمد (جدول ۷). همچنین نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان سدیم مربوط به تیمارهای "توسرخ × ۶- درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها"، "هایوارد × ۴+ درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها"، "هایوارد × ۴+ درجه سانتی‌گراد × متورم شدن جوانه‌ها"، "طلایی × ۶- درجه سانتی‌گراد × متورم شدن جوانه‌ها" بود و کمترین میزان سدیم هم مربوط به تیمار "هایوارد × ۴+ درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" بود که تفاوت معنی‌داری با همه ترکیب تیماری ارقام مختلف در دماهای مختلف با میوه‌های تلقیح شده نداشت.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر فاکتورهای آزمایشی بر صفات اندازه گیری شده در کیوی

میانگین مربعات						
درجه آزادی	سدیم	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	نشت یونی	پرولین
تکرار	۲	۱/۹۴ ^{ns}	۳۳/۸۴ ^{ns}	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۰۱۲ ^{ns}	۳۸۴/۹۹ ^{ns}
رقم (A)	۲	۱۸/۶۵ ^{**}	۱۵۴۴۸/۳۹ ^{**}	۹۴/۸۲ ^{**}	۰/۰۳۳ ^{ns}	۱۳۴۲/۹۳ [*]
سرما (B)	۲	۳۹/۸۸ ^{**}	۱۴۲/۲۹ ^{ns}	۲۳۶/۷۵ ^{**}	۰/۰۲۹ ^{ns}	۲۹۱/۵۵ ^{ns}
AB	۴	۳۴/۸۹ ^{**}	۵۰۸۵/۲۲ ^{**}	۴۵/۱۲ ^{**}	۰/۰۱۷ ^{ns}	۴۱۰/۷۲ ^{ns}
مرحله فنولوژیک (C)	۲	۱۰۸۱/۷۶ ^{**}	۳۶۳۴/۹۵ ^{**}	۷۲۴/۸۷ ^{**}	۰/۸۷۳ ^{**}	۲۳۱۹۳/۰۰ ^{**}
AC	۴	۱۸/۲۳ ^{**}	۱۹۷۶/۷۰ ^{**}	۱۴۴/۶۸ ^{**}	۰/۰۰۸ ^{ns}	۲۴۵/۷۶ ^{ns}
BC	۴	۵/۹۲ [*]	۴۸۱/۱۲ ^{**}	۱۷/۰۵ [*]	۰/۰۱۷ ^{ns}	۱۷۱۵/۵۴ ^{**}
ABC	۸	۱۶/۶۸ ^{**}	۳۳۶۰/۴۴ ^{**}	۲۰/۷۱ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۲۰۰۳/۷۹ ^{**}
خطا	۵۲	۲/۳۱	۵۲/۱۰	۶/۷۰	۰/۰۱۰	۴۰۸/۷۱
ضریب تغییرات (/.)	-	۸/۱۵	۸/۴۱	۲۱/۸۲	۶/۰۱	۲۲/۳۵
۳۶/۷۶						

^{ns}: اختلاف غیر معنی دار؛ ^{*}: اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ و ^{**}: اختلاف معنی دار در سطح ۵٪

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر رقم بر صفات مورد آزمایش

رقم	سدیم (میلی)	پتاسیم (میلی)	کلسیم	نشت یونی	پرولین (میکرومول در گرم وزن تر)
	اکی والان بر لیتر)	اکی والان بر لیتر)	(میلی گرم در لیتر)	(μS/cm)	
هایوارد	۱۹/۶۱a	۱۱۲/۳a	۱۲/۸۵a	۸۴/۶۱b	۱۱/۲۴b
طلایی	۱۸/۰۷b	۷۹/۴۰b	۱۳/۰۵a	۸۲/۴۷b	۱۸/۷۸a
توسرخ	۱۸/۳۰b	۶۵/۸۳c	۹/۷۱b	۹۲/۹۰a	۱۴/۷۲b

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سرما بر صفات مورد آزمایش

سرما	سدیم	کلسیم	پرولین
(میلی اکی والان بر لیتر)	(میلی اکی والان بر لیتر)	(میلی اکی والان بر لیتر)	(میکرومول در گرم وزن تر)
دمای ۴+	۱۸/۸۰a	۹/۰۳c	۸/۷۵b
دمای ۶-	۱۹/۸۰a	۱۴/۹۴a	۱۶/۳۶a
دمای ۱۶-	۱۷/۳۸b	۱۱/۶۳b	۱۹/۶۳a

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر مراحل فنولوژیک بر صفات مورد آزمایش

مرحل فنولوژیک	سدیم (میلی اکی والان بر لیتر)	پتاسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	کلسیم (میلی گرم در لیتر)	منیزیم (میلی گرم در لیتر)	نشت یونی ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	پرولین (میکرومول در گرم وزن تر)
رکود جوانه ها	۲۲/۵۲a	۹۷/۳۷a	۹/۶۴b	۱/۵۱b	۷۰/۵۵b	۱۱/۲۸b
متورم شدن جوانه‌ها	۲۲/۱۰a	۷۴/۱۶c	۸/۱۷b	۱/۵۳b	۵۶/۱۴c	۳/۴۹c
میوه های تلقیح شده	۱۱/۳۵b	۸۶/۰۴b	۱۷/۷۹a	۱/۸۳a	۸۸/۱۷a	۲۹/۹۶a

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۵-مقایسه میانگین اثر "رقم × سرما" بر صفات مورد آزمایش

رقم × سرما	سدیم (میلی اکی والان بر لیتر)	پتاسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	کلسیم (میلی گرم در لیتر)	پرولین (میکرومول در گرم وزن تر)
هایوارد × دمای +۴	۲۱/۵۲a	۹۹/۹۹b	۱۰/۱۲bc	۸/۱۲de
هایوارد × دمای -۶	۱۹/۱۲bc	۱۰۸/۲b	۱۵/۹۵a	۲۰/۰۲bc
هایوارد × دمای -۱۶	۱۸/۱۸c	۱۲۸/۸a	۱۲/۴۶ab	۵/۵۹de
طلایی × دمای +۴	۱۷/۸۶c	۱۰۷/۰b	۱۰/۲۷bc	۶/۰۶de
طلایی × دمای -۶	۲۰/۹۷ab	۸۱/۶۳c	۱۳/۸۱ab	۳/۵۱e
طلایی × دمای -۱۶	۱۵/۳۸d	۴۹/۶۰e	۱۵/۰۷a	۴۶/۷۶a
توسرخ × دمای +۴	۱۷/۰۱cd	۵۸/۲۹de	۶/۶۹c	۱۲/۰۶cd
توسرخ × دمای -۶	۱۹/۳۰abc	۶۲/۰۶d	۱۵/۰۵a	۲۵/۵۶b
توسرخ × دمای -۱۶	۱۸/۵۸c	۷۷/۱۳c	۷/۳۷c	۶/۵۳de

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD است.

پتاسیم

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان پتاسیم، اثر رقم، اثر ساده مرحله فنولوژیک، اثرات متقابل "رقم × سرما"، "رقم × مرحله فنولوژیک"، "سرما × مرحله فنولوژیک" و اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان پتاسیم معنی‌دار بوده است (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیشترین میزان پتاسیم مربوط به هایوارد و کمترین میزان پتاسیم هم مربوط به طلایی بود (جدول ۲). همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان می‌دهد که بیشترین میزان پتاسیم در مرحله رکود جوانه‌ها و کمترین میزان پتاسیم هم در مرحله متورم شدن جوانه‌ها بدست آمد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × سرما"، بیشترین میزان پتاسیم متعلق به "هایوارد × دمای -۱۶- درجه سانتی‌گراد" بود و کمترین میزان پتاسیم هم مربوط به "طلایی × دمای -۱۶- درجه سانتی‌گراد" بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × مرحله فنولوژیک" بر میزان پتاسیم (جدول ۶) نشان می‌دهد که بیشترین میزان پتاسیم مربوط به "هایوارد × رکود" بود و کمترین

میزان پتاسیم هم از تیمار "توسرخ × متورم شدن" بدست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی داری با تیمارهای "توسرخ × رکود" و "طلایی × متورم شدن" نداشت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از "سرما × مرحله فنولوژیک"، بیشترین میزان پتاسیم مربوط به "دمای +۴ × رکود" و کمترین میزان پتاسیم هم مربوط به "دمای -۶ × متورم شدن" بود (جدول ۷) همچنین نتایج مقایسه میانگین اثر سه گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان پتاسیم مربوط به تیمارهای "هایوارد × ۱۶ - درجه سانتی گراد × رکود جوانه‌ها"، "هایوارد × +۴ درجه سانتی گراد × رکود جوانه‌ها" و کمترین میزان پتاسیم هم مربوط به تیمار "طلایی × ۱۶ - درجه سانتی گراد × رکود" و "طلایی × ۱۶ - درجه سانتی گراد × متورم شدن جوانه‌ها" بود (شکل ۱).

جدول ۶-مقایسه میانگین اثر "رقم × مراحل فنولوژیک" بر صفات مورد آزمایش

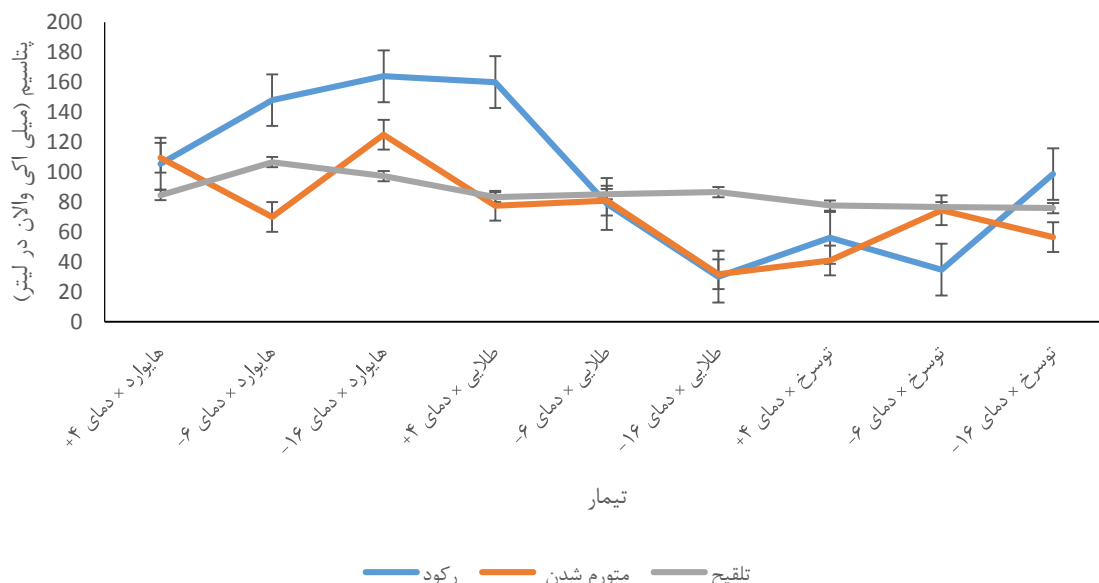
رقم × مراحل فنولوژیک	سدیم (میلی اکی والان بر لیتر)	پتاسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	کلسیم (میلی گرم در کلسیم (میلی گرم در پرولین (میکرومول در گرم وزن تر)
هایوارد × رکود	۲۴/۶۷a	۱۳۹/۲a	۱۱/۰۰cd
هایوارد × متورم شدن	۲۲/۸۲ab	۱۰۱/۶b	۵/۱۱e
هایوارد × تلقیح	۱۱/۳۳d	۹۶/۲۲bc	۲۲/۴۳a
طلایی × رکود	۲۰/۱۲c	۸۹/۶۱c	۱۲/۲۳c
طلایی × متورم شدن	۲۲/۰۸bc	۶۳/۴۸e	۱۲/۲۹c
طلایی × تلقیح	۱۲/۰۰d	۸۵/۱۱cd	۱۴/۶۲bc
توسرخ × رکود	۲۲/۷۷ab	۶۳/۲۶e	۵/۶۹e
توسرخ × متورم شدن	۲۱/۴۰bc	۵۷/۴۴e	۷/۱۱de
توسرخ × تلقیح	۱۰/۷۲d	۷۶/۷۸d	۱۶/۳۲b

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۷-مقایسه میانگین اثر "سرما × مراحل فنولوژیک" بر صفات مورد آزمایش

سرما × مراحل فنولوژیک	سدیم (میلی اکی والان بر لیتر)	پتاسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	کلسیم (میلی گرم در لیتر)	نشت یونی (μS/cm)	پرولین (میکرومول در گرم وزن تر)
دمای +۴ × رکود	۲۱/۸۱bc	۱۰۷/۳a	۵/۳۲e	۷۲/۱۱bc	۸/۲۴de
دمای +۴ × متورم شدن	۲۳/۰۲ab	۷۶/۰۹de	۵/۸۰de	۷۵/۷۲bc	۴/۰۲e
دمای +۴ × تلقیح	۱۱/۵۶d	۸۱/۸۹cde	۱۵/۹۷b	۹۵/۷۱a	۱۳/۹۸d
دمای -۶ × رکود	۲۴/۳۱a	۸۷/۱۸bcd	۱۴/۲۲b	۸۴/۴۲ab	۲/۱۹e
دمای -۶ × متورم شدن	۲۳/۰۸ab	۷۵/۲۰e	۱۰/۲۲c	۶۱/۱۷c	۴/۶۷e
دمای -۶ × تلقیح	۱۲/۰۰d	۸۹/۵۶bc	۲۰/۳۷a	۹۴/۶۸a	۴۲/۲۳a
دمای -۱۶ × رکود	۲۱/۴۳bc	۹۷/۶۶ab	۹/۳۸cd	۷۵/۷۷bc	۲۳/۴۱c
دمای -۱۶ × متورم شدن	۲۰/۲۰c	۷۱/۲۰e	۸/۴۹cde	۵۵/۰۷c	۱/۷۸e
دمای -۱۶ × تلقیح	۱۰/۵۰d	۸۶/۶۷bcd	۱۷/۰۳ab	۹۸/۹۳a	۳۳/۶۸b

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD است.

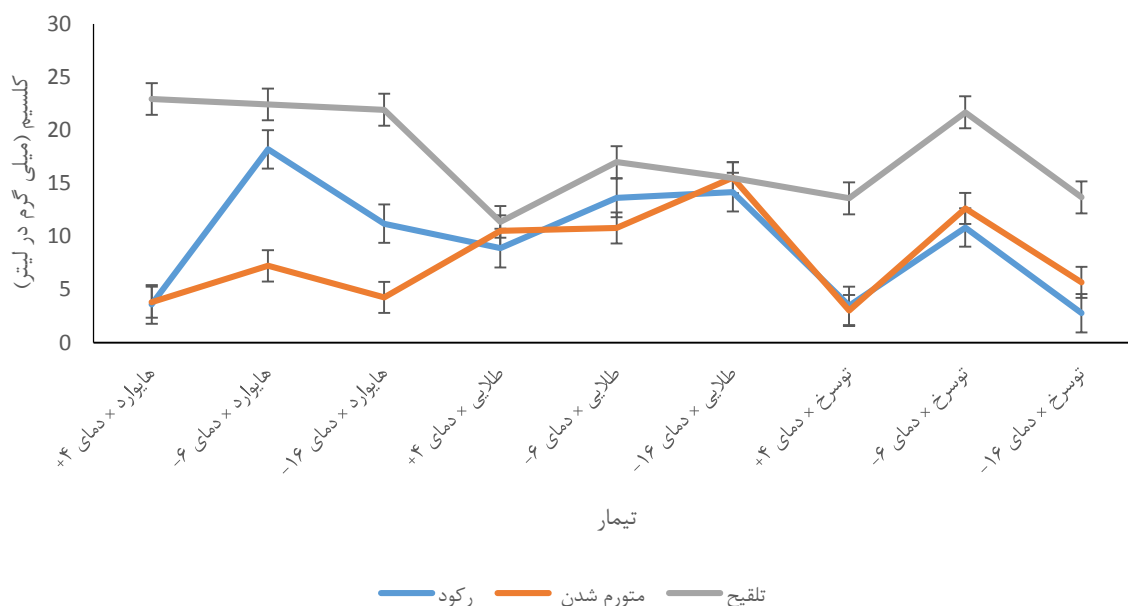


شکل ۱- اثر متقابل "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" بر میزان پتاسیم

کلسیم

نتایج تجزیه واریانس اثر فاکتورهای آزمایشی بر میزان کلسیم نشان می‌دهد که، اثر رقم، اثر سطوح مختلف سرما، اثر ساده مرحله فنولوژیک (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و باز شدن گل‌ها)، اثرات متقابل "رقم × سرما"، "رقم × مرحله فنولوژیک" و اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل "سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان کلسیم معنی‌دار بوده است (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲)، بیشترین میزان کلسیم مربوط به هایوارد و طلایی و کمترین میزان کلسیم هم مربوط به توسرخ بود. بیشترین میزان کلسیم در دمای -۶ درجه سانتی‌گراد بدست آمد و کمترین میزان کلسیم هم مربوط به +۴ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۳). بیشترین میزان کلسیم در مرحله میوه‌های تلقیح شده و کمترین میزان کلسیم هم از مراحل رکود و متورم شدن جوانه‌ها بدست آمد (جدول ۴). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × سرما"، بیشترین میزان کلسیم متعلق به "هایوارد × دمای -۶ درجه سانتی‌گراد"، "طلایی × دمای -۱۶ درجه سانتی‌گراد" و "توسرخ × دمای -۶ درجه سانتی‌گراد" بود و کمترین میزان کلسیم هم مربوط به "توسرخ × دمای +۴ درجه سانتی‌گراد" و "توسرخ × دمای -۱۶ درجه سانتی‌گراد" بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × مرحله فنولوژیک" بر میزان کلسیم (جدول ۶) نشان می‌دهد که بیشترین میزان کلسیم مربوط به "هایوارد × میوه‌های تلقیح شده" بود و کمترین میزان کلسیم هم مربوط به "هایوارد × متورم شدن جوانه‌ها" بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به "سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان کلسیم مربوط به "دمای -۶ درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" و کمترین میزان کلسیم هم تحت ترکیب تیماری "دمای +۴ درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها" بدست آمد (جدول ۷). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک"، بیشترین میزان کلسیم تحت ترکیب تیماری "هایوارد × دمای +۴ درجه سانتی‌گراد × مرحله فنولوژیک" بدست آمد (جدول ۸).

سانتی گراد × میوه‌های تلقیح شده " بدست آمد و کمترین میزان کلسیم هم مربوط به ترکیب تیماری "توسرخ × ۱۶- درجه سانتی گراد × رکود جوانه‌ها" بود (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل "رقم × سرما × مرحله‌ی فنولوژیک" بر میزان کلسیم

منیزیم

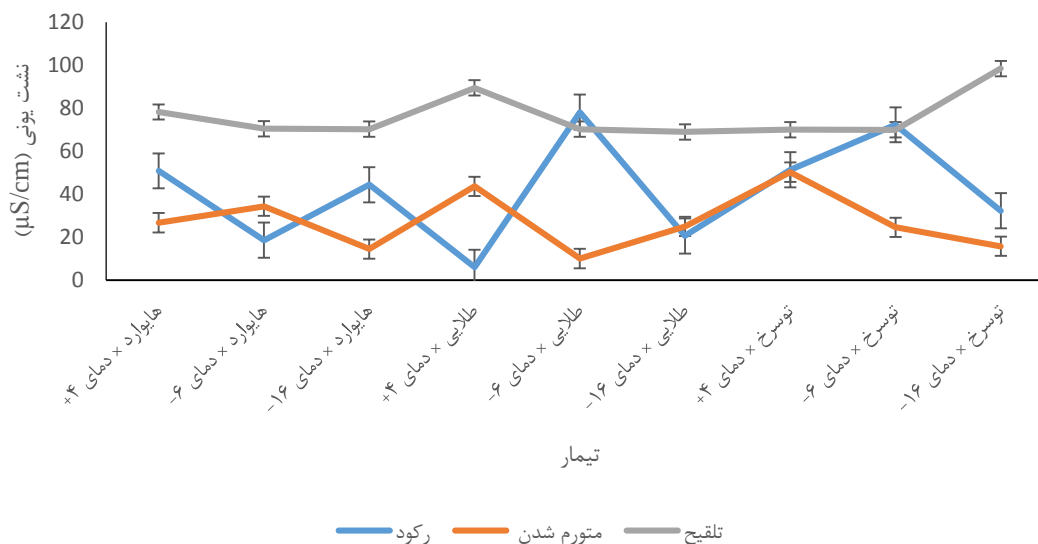
بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده اثر ساده سه مرحله‌ی فنولوژیک (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و میوه‌های تلقیح شده) بر میزان منیزیم در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بوده است. اما اثر سایر فاکتورهای آزمایشی بر روی این شاخص معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین میزان منیزیم متعلق به مرحله میوه‌های تلقیح شده بود و کمترین میزان آن هم مربوط به مراحل رکود و متورم شدن جوانه‌ها بود.

مرحله فنولوژیکی می‌تواند در رابطه با آسیب‌های سرمای اهمیت زیادی داشته باشد. درختان در مرحله گلدهی و ریزش گلبرگ بیشتر تحت تأثیر دماهای پایین قرار گرفته و حساس‌تر هستند (Pakkish *et al.*, 2011). طبق نتایج گزارش Miranda و همکاران (۲۰۰۵) گونه‌های جنس پرونوس از جمله بادام، قبل از گلدهی به سرما مقاوم هستند اما در مرحله تمام گل و مراحل بعدی نسبت به مراحل قبل از گلدهی (مرحله خواب عمیق جوانه گل) حساس به سرما هستند ولی در شرایط یکسان فنولوژیکی نوع ژنوتیپ تعیین کننده است. غلظت‌های بالای سدیم در گیاهان سبب بهم ریختگی غشا می‌شود و نش‌یون‌ها در برگ‌های گیاهان تحت تنش رو به افزایش گزارش شده است (Karlidag *et al.*, 2009). مقاومت به سرمازدگی در گیاهان عمدتاً با وضعیت تغذیه آنها ارتباط دارد (Nagy *et al.*, 2008). از طرف دیگر درصد آسیب ناشی از تنش سرما بر مبنای آزمایش نش‌یونی نیز مشخص نموده‌است که عمده‌ترین عنصر آزاد شده در سلول‌های صدمه دیده پتاسیم است که یکی از عناصر غذایی است (میرمحمدی میبیدی و ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴). در آزمایش حاضر بیشترین پتاسیم آزاد شده در عصاره مربوط به رقم هیوارد در دمای ۱۶- درجه سانتی گراد بوده است و همچنین

رقم هایوارد دارای پتاسیم بیشتری از رقم طلایی و آن هم بیشتر از رقم توسرخ است. با افزایش انباشت پتاسیم میزان نشت یونی کمتر شده و با کاهش نشت یونی گیاه به تنش سرما متحمل تر خواهد شد (Yamada et al., 2004). مطالعات Nagy و همکاران در رابطه با تأثیر سرمازدگی روی وضعیت عناصر پرمصرف برگ هشت رقم سیب در شرق مجارستان نشان داد میزان سرمازدگی به طور معنی داری تحت تأثیر جذب عناصر و فرایند ذخیره‌ای آنها قرار می‌گیرد. بنابراین نشان داده شده است که در فصول سرمازدگی، مدیریت تغذیه درختان میوه در کنترل سرمازدگی خیلی مهم است (Nagyné Demeter et al., 2010؛ Nagy et al., 2008). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که در میان تنش‌های زنده و غیرزنده درجه حرارت پایین اثرات محدودکننده‌ای روی سیستم گیاهی دارد (Adams et al., 2002). این اثر به طور معمول از طریق کاهش فتوسنتز، جذب آب و مواد مغذی و در نهایت کاهش تولید محصول بروز می‌نماید (Fortunato et al., 2010؛ Chinnusamy et al., 2007).

نشت یونی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نشت یونی، اثر ساده رقم در سطح احتمال ۵٪ و اثر ساده سه مرحله‌ی فنولوژیک (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و میوه‌های تلقیح شده)، اثر متقابل "سرما × مرحله فنولوژیک" و اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" بر میزان نشت یونی نمونه‌ها اثر معنی داری در سطح احتمال ۱٪ داشته است و سایر تیمارهای آزمایشی بر این صفت معنی دار نبوده است (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین نشت یونی مربوط به رقم توسرخ و کمترین میزان نشت یونی هم متعلق به رقم‌های طلایی و هایوارد بوده است (جدول ۲). در این مطالعه مشخص شد که بیشترین نشت یونی در مرحله میوه‌های تلقیح شده و کمترین میزان نشت یونی هم در مرحله متورم شدن جوانه‌ها بوده است (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های اثر "سرما × مرحله فنولوژیک" بر میزان نشت یونی نمونه‌ها نشان می‌دهد که ترکیب تیماری "۱۶- درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده"، "۴+ درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" و "۶- درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" بیشترین میزان نشت یونی را داشت و کمترین میزان نشت یونی هم مربوط به "۱۶- درجه سانتی‌گراد × متورم شدن جوانه‌ها" بود (جدول ۴-۷). نتایج داده‌های حاصل از اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" (شکل ۳) نشان می‌دهد که بیشترین میزان نشت یونی تحت ترکیب تیماری "توسرخ × ۱۶- درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" بدست آمده است و کمترین میزان نشت یونی هم مربوط به ترکیب تیماری "طلایی × ۴+ درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها" و "طلایی × ۶- درجه سانتی‌گراد × متورم شدن جوانه‌ها" بود.



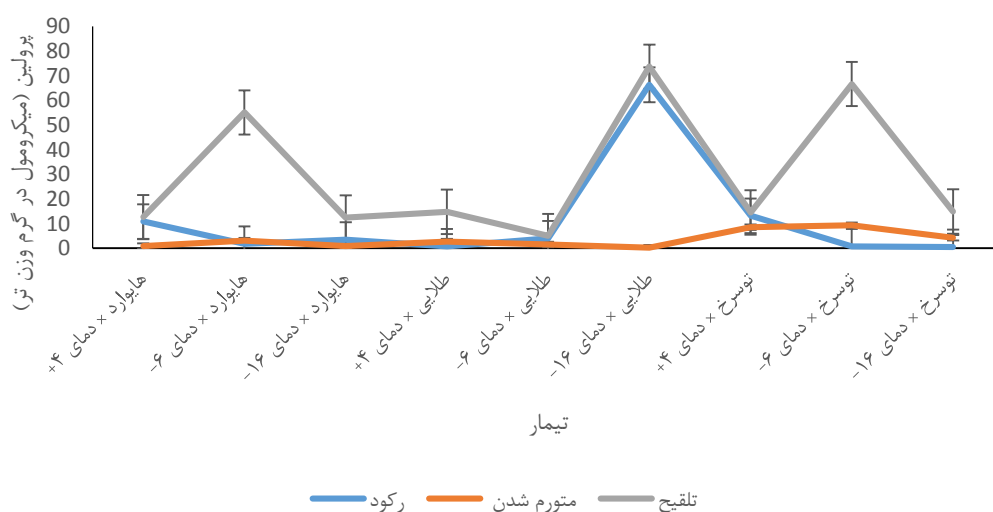
شکل ۳- اثر "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" بر نشت یونی

هر چه میزان نشت یونی بیشتر باشد، حساسیت به تنش سرما بیشتر می‌شود (جوانی و همکاران، ۱۳۹۰). ایمانی و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه روی ۶۰ ژنوتیپ بادام دریافتند که بین میزان نشت یونی و میزان خسارت حاصل از سرمازدگی ارتباط وجود دارد و ارقامی که دارای نشت یونی پایین‌تری هستند به تنش سرما مقاوم‌تر می‌باشند. طبق نتایج بدست آمده از این آزمایش، مقدار نشت یونی در رقم هایوارد و طلایی کمتر از رقم توسرخ بوده است. لذا رقم توسرخ نسبت به سایر ارقام به سرما حساس‌تر است. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان نشت یونی در مرحله میوه‌های تلقیح شده و کمترین میزان نشت یونی هم در مرحله متورم شدن جوانه‌ها است. از آنجایی که شاخص نشت یونی بر اساس آسیب به غشاهای سلولی ابداع شده است و این آسیب دیدگی غشا منجر به نشت یون‌ها (به خصوص K^+) از سلول می‌شود (Lindén, 2002)، لذا می‌توان استنتاج نمود که میزان آسیب دیدگی بافت‌های کیوی در مرحله میوه‌های تلقیح شده بیشتر از آسیب دیدگی آنها در مرحله متورم شدن جوانه‌ها است.

پرولین

بر اساس تجزیه واریانس اثر فاکتورهای آزمایشی بر میزان پرولین، اثر ساده رقم، سرما، مرحله فنولوژیک، اثرات متقابل "رقم × سرما"، "رقم × مرحله فنولوژیک"، "سرما × مرحله فنولوژیک" و اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان پرولین معنی‌دار بوده است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که بیشترین میزان پرولین مربوط به رقم طلایی بود و کمترین میزان آن هم مربوط به هایوارد بود. همچنین نتایج میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که بیشترین میزان پرولین در دماهایی ۱۶- و ۶- درجه سانتی‌گراد بدست آمد و کمترین میزان پرولین هم در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. بیشترین میزان پرولین در مرحله میوه‌های تلقیح شده و کمترین میزان پرولین هم در زمان متورم شدن جوانه‌ها بدست

آمد (جدول ۴). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × سرما"، بیشترین میزان پرولین متعلق به "طلایی × دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد" بود و کمترین میزان پرولین هم مربوط به "طلایی × دمای ۶- درجه سانتی‌گراد" بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل "رقم × مرحله فنولوژیک" بر میزان پرولین (جدول ۶) نشان می‌دهد که بیشترین میزان پرولین مربوط به "توسرخ × میوه‌های تلقیح شده" بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با ترکیب تیماری "طلایی × میوه‌های تلقیح شده"، "هایوارد × میوه‌های تلقیح شده" و "طلایی × رکود جوانه‌ها" نداشت و کمترین میزان پرولین هم مربوط به "طلایی × متورم شدن جوانه‌ها" بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر دوگانه "سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان پرولین مربوط به "دمای ۶- درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" بود و کمترین میزان پرولین هم تحت ترکیب تیماری "دمای ۶- درجه سانتی‌گراد × رکود جوانه‌ها" بدست آمد (جدول ۷). همچنین نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" نشان می‌دهد که بیشترین میزان پرولین مربوط به "طلایی × ۱۶- درجه سانتی‌گراد × میوه‌های تلقیح شده" بود و کمترین میزان پرولین هم مربوط به "هایوارد × ۴+ درجه سانتی‌گراد × متورم شدن جوانه‌ها" بود (شکل ۴).



شکل ۴- اثر متقابل "رقم × سرما × مرحله فنولوژیک" بر میزان پرولین

انباشت پرولین به عنوان یک نشانگر برای شرایط تنش‌زای محیطی محسوب می‌شود و نقش حیاتی و مهمی در این زمینه دارد. پرولین در تنش‌های محیطی در سلول‌ها تجمع می‌یابد و نقش حفاظتی و تنظیم اسمزی را دارد (Munns, 2002). در بررسی میزان خسارت و تغییرات سطوح پرولین در جوانه‌های گل چند رقم زردآلوی تجاری در مراحل مختلف فنولوژیکی عنوان شد که بیشترین میزان پرولین در مرحله جوانه متورم و کمترین آن در مرحله گلدهی وجود داشت (روحانی‌نیا و همکاران، ۱۳۸۶). در پژوهش حاضر بیشترین میزان پرولین در زمان تلقیح میوه‌ها و کمترین میزان آن در مرحله متورم شدن جوانه بدست آمد که می‌توان چنین بیان نمود که تجمع پرولین از گیاهی به گیاهی دیگر و در شرایط مختلف محیطی ممکن است متغیر باشد.

نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان کلسیم، منیزیم، شاخص نشت یونی و پرولین نمونه‌ها در میوه‌های تلقیح شده دارای بیشترین میزان است و در زمان رکود و متورم شدن جوانه‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر آماری با هم نداشتند. از آنجایی که مرحله فنولوژیکی می‌تواند در رابطه با آسیب سرمایی اهمیت زیادی داشته باشد، بنابراین شناخت مراحل فنولوژیکی مبنی به اینکه درختان در چه مرحله‌ای مقاوم به سرما هستند، می‌تواند کمک شایانی به جلوگیری از آسیب سرمایی کند. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان کلسیم و پرولین در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد بود. بر اساس نتایج این آزمایش بیشترین میزان پرولین و کمترین میزان نشت یونی مربوط به رقم طلایی بود و از آنجایی که با افزایش نشت یونی حساسیت به سرما بیشتر می‌شود، لذا می‌توان نتیجه گرفت که رقم طلایی مقاومت بیشتری به سرما دارد.

منابع

- افشار محمدیان، م. ا. و اسحاقی تیموری، ر. (۱۳۷۸). کشت و پرورش و ارزش غذایی کیوی. شرکت چاپ بانک ملی ایران. ۱۱۸ ص.
- امامی، ع. (۱۳۷۵). روش تجزیه گیاه. جلد دوم. نشریه فنی شماره ۹۸۲، موسسه تحقیقات خاک و آب. تهران.
- جوانی، م.، تاج‌بخش، م.، عیوضی، ع. و رشدی، م. (۱۳۹۰). ارزیابی تحمل به تنش سرما در ژنوتیپ‌های گندم. اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی. دوره ۳. شماره ۴. ۳۳۶-۳۴۹.
- روحانی‌نیا، م.، گریگوریان، و.، مطلبی‌آذر، ع. ر. و دژم‌ور، ج. (۱۳۸۶). بررسی میزان خسارت و تغییرات سطوح رولین در جوانه‌های گل چند رقم زردآلوی تجاری در مراحل مختلف فنولوژیکی. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. جلد ۸، شماره ۲. ۱۱۲-۱۰۳.
- شیخی، ا. (۱۳۸۴). کشاورزی گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری. انتشارات ثامن الحجج، ۵۱۱ صفحه.
- طلایی، ع. (۱۳۷۷). فیزیولوژی درختان میوه. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۲۳ ص.
- کافی، م. و مهدوی دامغانی، ع. (۱۳۸۶). مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۶۷ ص.
- محمدی، ج. و عبدی سنه کوهی، م. (۱۳۷۲). کیوی و پرورش آن. انتشارات فرهنگ جامع، ۱۶۰ ص.
- میرمحمدی میبدی، س. و ترکش اصفهانی، س. (۱۳۸۴). جنبه‌های فیزیولوژیک و بهنژادی تنش‌های سرما و یخ زدگی گیاهان زراعی. انتشارات گلبن. ۳۳۶ ص.
- Adams, W.W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., Brightwell, A.K. and Ebbert, V. (2002). Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology* 4: 545-557.
- Antunes, M.D.C. and Sfakiotakis, E.M. (2002). Chilling induced ethylene biosynthesis in 'Hayward' kiwifruit following storage. *Scientia Horticulturae* 92: 29-39.
- Barranco, D. and Ruiz, N. (2005). Frost tolerance of eight olive cultivars. *Hortscience* 40 (3): 558-560.
- Bates, L.S., Waldron, R. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-208.

- Chat, J., 1995. Cold hardiness within the genus *Actinidia*. *Horticultural Science*. 30, 329-332.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12: 444-51.
- Fortunato, A.S., Lidon, F.C., Batista-Santos, P., Leitao, A.E., Pais, I.P., Ribeiro, A.I. and Ramalho, J.C. (2010). Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. Under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology* 167: 33-342.
- Imani, A., barzegar, K. and Piripireivatlou, S. (2011). Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2(1): 22-26.
- Karlıdag, H., Yildirim, E. and Turan, M. (2009). Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Science Agriculture* 66 (2): 180- 187.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd ed. 497 pp. New York, Academic Press.
- Lindén, L. (2002). Measuring cold hardiness in woody plants. Department of Applied Biology, Horticulture, Academic dissertation. University of Helsinki. Finland. pp 57.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Miranda, C., Santesteban, L.G. and Royo, J.B. (2005). Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated *Prunus* species. *HortScience* 4(2): 357-361.
- Nagy, P.T., Katai, J., Nyeki, J. and Szabo, Z. (2008). Effect of frost on leaf macronutrient Status of eight apple cultivars in integrated apple orchard in Eastern Hungary. *International Journal Horticultural Science* 14(1-2):37-40
- Nagyné Demeter, D., Nyéki, J., Soltész, M. and Szabó, Z. (2010). Examination of the apricot variety use and the factors affecting variety use in the Gönc production area. *International Journal of Horticultural Science* 16(3): 111-113.
- Pakkish, Z., Rahemi, M. and Panahi, B. (2011). Low temperature resistance of developing flower buds of pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Journal Biology Environmental Science* 5(15): 153-157.
- Weiser, C. J. (1970). Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 169: 1269-1278.
- Wilson, J. M. (2001). The mechanism of chill and drought hardiness. *New Physiologist* 97: 257-270.
- Yamada, T., Jones, E.S., Cogan, N.O.I., Vecchies, A.C., Nomura, T., Hisano, H., Shimamoto, Y., Smith, K.F., Hayward, M.D. and Forster, J.W. (2004). QTL analysis of morphological, developmental, and winter hardiness-associated traits in perennial ryegrass. *Crop Science* 44: 925-935.

Effect of chilling stress on three commercial kiwifruit cultivars (Hayward, Golden and Red)

Sh. Sedaghathoor^{1*}, S. Kh. Abbasnia Zare², S. A. Sajjadi³

Received:2021.10.28

Accepted:2021.12.4

Abstract:

To evaluate the chilling tolerance of three commercial kiwifruit cultivars (Hayward, Golden and Red) this study carried out as three factor experiment using randomized block design with three replications from January to April, 2019. The first factor was kiwifruit cultivars that included three cultivars of Hayward, Golden and Red; the second factor was three levels of chilling [including: b1) 4 °C, b2) -6 °C and b3) -16 °C] and the third factor was three phenological stages of kiwifruit cultivars including: dormancy of buds, swelling of buds and fruit-set stages. The evaluated traits included Na, K, Ca, Mg, electrolyte leakage and proline. The results revealed that the highest Ca, Mg, electrolyte leakage index and proline content were in fruit-set stage and there was no significant meaning in dormant buds and the swelling bud stage. According to the results, the highest amounts of Ca and proline content were obtained at -6 °C. The results also showed that the highest proline content and the lowest electrolyte leakage were related to Golden cultivar. Since increasing the electrolyte leakage shows the sensitivity to cold stress, so it can be concluded that Golden cultivar is more resistant to cold than the other examined cultivars.

Keywords: *Electrolyte leakage, Fruit-set, Phenological, Proline*

¹ Associate Professor of Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran(*Corresponding author: sedaghathoor@iaurasht.ac.ir)

² PhD of Horticulture, Education and Training Office of Lahijan, Lahijan, Iran

³ Assistance Professor of Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۹

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>



10.22051/JAB.2021.34309.1398

تثبیت کووالانسی آنزیم پراکسیداز نو ترکیب لپیدیوم در/با (LDP) بر روی ساختار آلی-فلزی روی با استفاده از گلو تار آلدئید

سودابه فرهادی^۱، علی ریاحی مدوار^{۲*}، مجتبی مرتضوی^۳، قاسم سرگزئی^۴

چکیده

مقدمه: پراکسیداز لپیدیوم در/با (LDP) آنزیمی از کلاس III پراکسیدازهای گیاهی است که توانایی اسید آمینه‌ای آن با پراکسیداز ترب کوهی (HRP) بیش از ۹۰ درصد تشابه دارد. روش‌ها: در این پژوهش، به منظور اتصال محکم LDP به چارچوب آلی-فلزی روی (Zn-MOF)، بعد از بیان و تخلیص آنزیم، شرایط تثبیت با استفاده از لینکر گلو تار آلدئید بهینه‌سازی شد و سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، سینتیکی و پایداری آن با آنزیم آزاد مقایسه شدند.

نتایج و بحث: بهترین شرایط تثبیت با بازده ۶۷٪، در غلظت‌های Zn-MOF ۰/۰۲ گرم، آنزیم ۰/۷۵ mg/ml و گلو تار آلدئید ۱/۲ دسی‌مولار به مدت سه ساعت انکوبه‌شدن بدست آمد. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده بیش از دو برابر آنزیم آزاد افزایش یافته است و K_m آن به سوسترای TMB نسبت به آنزیم آزاد، ۴۹ درصد کاهش یافته است. همچنین پایداری سینتیکی آنزیم تثبیت شده در برابر pH و دما نسبت به آنزیم آزاد کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، پایداری، سینتیکی، فعالیت ویژه

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد، بجنورد، ایران. (* نویسنده مسؤول: Riahi.ali@gmail.com)
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیردار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی، بم، ایران

مقدمه

توانایی آنزیم‌ها در کاتالیز واکنش‌ها بی‌نظیر است و باعث می‌شود واکنشی که تحت شرایط عادی به‌سادگی اتفاق نمی‌افتد، با سرعت بالا رخ دهد. علاوه بر این، آنزیم‌ها واکنش‌ها را به‌صورت اختصاصی انجام می‌دهند و در شرایطی همچون دما، فشار و pH خاصی فعالیت می‌کنند و با توجه به این خصوصیات، آنزیم‌ها ابزاری قدرتمند برای کاربرد در صنعت و پزشکی به‌عنوان حسگرهای زیستی هستند (Radzicka & Wolfenden, 1995). با پیشرفت در تکنیک‌های تشخیصی و بالینی، واکنش‌های اکسیداسیون-احیا از اهمیت بالایی برخوردار هستند. از این‌رو، پراکسیدازها نقش اساسی در سنجش‌های بالینی مانند کراتینین، گلوکز، اسید اوریک اسید و تعیین پراکسید هیدروژن دارند (Yujun et al., 2010; Dhruvaraj, 2017). پراکسیداز ترب کوهی (HRP) به‌عنوان یک آنزیم پرکاربرد، کاتالیزوری فعال، انعطاف‌پذیر در آزمایش، پایدار و حساس در تشخیص است (Sanz et al., 2005). اخیراً ژن یک آنزیم پراکسیداز از گیاه *Lepidium draba* (LDP) از یک گیاه بومی ایران شناسایی و کلون شده است (Fattahian et al., 2017). گیاه *Lepidium draba* از خانواده‌ی براسیکا است که ترب کوهی نیز از همین خانواده است. مطالعات بیوانفورماتیک نشان‌دهنده‌ی تشابه بالایی این آنزیم با آنزیم HRP است به‌طوری‌که توالی پروتئینی آن با HRP بیش از ۸۷ درصد همسانی (Identity) و ۹۳ درصد تشابه (Similarity) دارد (Fattahian et al., 2017). با توجه به فعالیت کاتالیتیکی و بازدهی عملکرد این آنزیم، به‌عنوان یک همولوگ پراکسیداز HRP برای کاربردهای پزشکی و بیوتکنولوژی معرفی شده است (Fattahian et al., 2017).

آنزیم‌ها علیرغم قدرت کاتالیزوری، برای استفاده در محیط‌های صنعتی و پزشکی محدودیت دارند. اگرچه ذاتاً قابلیت استفاده مجدد دارند؛ اما استفاده‌ی مجدد آنزیم‌ها در محیط‌های آبی غیرممکن است و همچنین به دلیل سخت بودن مراحل خالص‌سازی، از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیست. همچنین محصولات واکنش و مهارکننده‌ها می‌توانند توانایی آن‌ها را محدود کند. یکی از روش‌هایی که کمک می‌کند بر این محدودیت‌ها غلبه شود، تثبیت آنزیم بر روی یک بستر جامد است (Radzicka & Wolfenden, 1995). موارد مهم در تثبیت آنزیم، شامل نوع آنزیم، نوع ماتریکس و نحوه‌ی اتصال است. سطحی که آنزیم روی آن تثبیت می‌شود چند نقش اساسی دارد از قبیل حفظ ساختار سوم آنزیم با تشکیل کمپلکس انتقال الکترون و یا با ایجاد پیوند هیدروژنی یا کوالان با ماتریکس (Mohamad et al., 2015). از این‌رو زمانی که تثبیت آنزیم بر روی یک سطح انجام می‌شود مهم است که روشی مناسب برای برقراری اتصال بین گروه فعال ماتریکس و آنزیم انتخاب شود (Tischer & Wedekind, 1999). حفظ ساختار سوم فعال کاتالیتیکی آنزیم یک عامل ضروری در به حداکثر رساندن پایداری و واکنش‌پذیری آنزیم در حالت تثبیت‌شده‌ی آن است (Nourouzian, 2003). روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌ها بر روی سطوح جامد وجود دارد که به سه دسته‌ی کلی جذب، محبوس‌سازی و اتصال کوالان تقسیم می‌شوند (Barragán et al., 2016). استفاده از گلو تار آلدئید به‌عنوان عامل پیونددهنده، یکی از روش‌های متداول برای تثبیت کوالان آنزیم است (Zhou & Chen, 2001; Magnan et al., 2004; Tukul & Alptekin, 2004).

همان‌گونه که گفته شد انتخاب یک حامل مناسب نقش مهمی در تکنیک‌های تثبیت آنزیم ایفا می‌کند که می‌تواند علاوه بر تسهیل فرایند تثبیت، پایداری و عملکرد کاتالیزوری را افزایش دهد (Stephens et al., 2012; Cao et al., 2016). نانومواد از جمله نانوذرات، نانولوله‌ها، نانوصفحات و ساختارهای آلی-فلزی (Metal-organic framework) از بسترهای مدرن مورد استفاده در تثبیت مولکول‌های پروتئینی از جمله آنزیم‌ها هستند (Ansari & Husain, 2012; Mohamed et al., 2017; Sargazi et al., 2018).

چارچوب های آلی-فلزی (MOFs)، ترکیبات منفذدار متشکل از یون های فلزی یا خوشه هایی هستند که با مولکول های آلی همراه شده اند تا ساختار یک، دو و سه بعدی را تشکیل دهند (Magnan *et al.*, 2004). آن ها از دو جزء اصلی شامل یک یون فلزی و یک لیگاند آلی به نام اتصال دهنده تشکیل شده اند (Zhou, 2012). چنین نانو ساختارهایی به دلیل اندازه منافذ، سطح زیاد، سهولت در تنظیم اندازه منافذ و پایداری حرارتی و شیمیایی بالا گزینه ای مناسب برای تثبیت آنزیم ها هستند (Ali *et al.*, 2010; Getman *et al.*, 2018). اخیرا در یک مطالعه تثبیت این آنزیم بر روی چارچوب آلی-فلزی روی با استفاده از روش جذب فیزیکی انجام شد. نتایج حاصله بیانگر افزایش فعالیت، افزایش تمایل به سوبسترا و افزایش پایداری در pH های بازی آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد بود. در حالی که پایداری حرارتی در دمای بالا نسبت به آنزیم آزاد کاهش نشان داد (Farhadi *et al.*, 2021). در این پژوهش، به منظور ایجاد پیوند کووالان بین Zn-MOF و LDP، بعد از بیان و تخلیص آنزیم، شرایط تثبیت به واسطه ی گلوآلآلدئید بهینه سازی شد و سپس اثر تثبیت بر روی خصوصیات فیزیکی شیمیایی، سینتیکی و پایداری آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

بسیاری از مواد شامل پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، اسید فسفریک، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و گلوآلآلدئید از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. مارکر وزن مولکولی پروتئین از شرکت Bio Basic، آنتی بیوتیک کانامایسین، سوبسترای 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)، hemin، ۴-آمینوآنتی پیرین و آمونیوم هیدروکسید از شرکت سیگما خریداری شدند. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose خریداری شده از شرکت Invitrogene استفاده شد. سویه ی استفاده شده در این مطالعه برای بیان آنزیم LDP، *E.coli* BL21 (DE3) موجود در دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان بود و Zn-MOF با ابعاد نانو، حفرات منظم و دارای درصد کریستالی بالای ۵۰ درصد به عنوان بستر تثبیت مورد استفاده قرار گرفت (Farhadi *et al.*, 2021).

بیان و تخلیص آنزیم

بیان، تخلیص و فعال سازی آنزیم پراکسیداز نوترکیب LDP در *E.coli* BL21 با سیستم بیان pET 28a(+) مطابق با شرایط بیان شده در مقاله Farhadi و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد (Farhadi *et al.*, 2021). به طور خلاصه، سلول های *E. coli* BL21 در محیط کشت لوریا برتانی (LB) در حضور کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا زمانی که جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ برسد، رشد کردند. سپس با افزودن ۱ میلی مولار IPTG، عمل القا به مدت ۷ ساعت در دمای ۱۸ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام می شود و در ادامه سلول ها با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شدند. لیز سلول ها با استفاده از سونیکاتور در بافر لیز حاوی ایمیدازول (۱۰ میلی مولار)، سدیم کلرید (۳۲۰ میلی مولار) و سدیم دی هیدروژن فسفات (۶۵ میلی مولار) انجام شد. جهت جدا نمودن پروتئین محلول از باقی مانده های سلولی از سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در

دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد استفاده شد. سپس محلول حاوی پروتئین LDP با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA، تخلیص شد (Fattahian et al., 2017) و برای تأیید خلوص پروتئین از ژل SDS-PAGE و برای تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم، مخلوط واکنش شامل H_2O_2 (۱ میلی مولار) و TMB (۰/۶ میلی مولار) به عنوان سوبستراهای آنزیم، ۷۰ میکرولیتر (حدود ۰/۵ میلی گرم) آنزیم LDP و در حجم نهایی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH: ۶/۵) تهیه شد و با روش Krainer و همکاران فعالیت آنزیم سنجیده شد (Krainer et al., 2014). افزایش جذب در طول موج ۶۵۳ نانومتر و در فواصل ۳۰ ثانیه ای بررسی شد (ضریب خاموشی TMB اکسید شده در طول موج ۶۵۳ نانومتر: $3/9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

بهینه سازی تثبیت آنزیم LDP بر روی Zn-MOF با گلو تار آلدئید

بهینه سازی مقدار MOF: آنزیم با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml با مقادیر مختلفی از Zn-MOF (۰/۱۵ تا ۰/۰۵ گرم) و ۱ دسی مولار گلو تار آلدئید در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵ و دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در ادامه برای جدا کردن آنزیم تثبیت شده، دو مرتبه شستشو با استفاده از بافر فسفات، سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس فعالیت ویژه ی آن و میزان بارگذاری (Loading) بر روی بستر اندازه گیری شد (Xia et al., 2017).

$$\text{Enzyme loading} = \frac{A_1 - A_2}{B}$$

A_1 مقدار اولیه پروتئین، A_2 مقدار نهایی پروتئین بعد از تثبیت بر حسب میلی گرم و B مقدار بستر بر حسب گرم است.

بهینه سازی زمان تثبیت: آنزیم LDP با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml، Zn-MOF با مقدار مشخص شده در بخش ۲-۳-۱ و ۱ دسی مولار گلو تار آلدئید در زمان های متفاوت در بازه ی نیم ساعت الی ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و بعد از شستشو با بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵)، فعالیت ویژه ی آن اندازه گیری شد.

بهینه سازی غلظت گلو تار آلدئید: برای بهینه سازی غلظت گلو تار آلدئید، غلظت های متفاوتی از آن (۰/۶ تا ۲ دسی مولار) به Zn-MOF با مقدار مشخص شده در ۲-۳-۱ و آنزیم با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml در دمای ۴ درجه سانتی گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵) افزوده شد و پس از دو مرتبه شستشو با استفاده از بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵)، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، آنزیم تثبیت شده جدا و فعالیت ویژه ی آن محاسبه شد.

درصد بازدهی تثبیت (Immobilization Yield) در شرایط بهینه: درصد بازدهی تثبیت با رابطه ی زیر به دست آمد که در آن C_1 مقدار پروتئین اولیه و C_2 مقدار پروتئین از دست رفته در طی شستشو است (Zhang et al., 2011).

$$\text{Immobilization Yield (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

تأثیر تثبیت بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنزیم تثبیت شده و آزاد

دمای بهینه

برای تعیین دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، واکنش با هر یک از آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای ۱۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵) انجام شد. فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد و تثبیت شده محاسبه و با هم مقایسه شد.

pH بهینه

برای تعیین pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، فعالیت آن‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pHهای مختلف ۶ تا ۸، سنجیده شد.

مقایسه فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت شده با آنزیم آزاد

فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت شده در حضور سوبستراهای آن اندازه‌گیری شد و با فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد مقایسه شد.

تعیین پارامترهای سینتیکی

برای بررسی اثر تثبیت بر پارامترهای سینتیکی، سنجش فعالیت در حضور مقادیر مختلف TMB (۰/۰۲ تا ۱ میلی مولار) و H_2O_2 (۰/۲۵ تا ۶ میلی مولار) در شرایط بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، انجام شد. سپس با استفاده از رسم نمودار Hanes-Woolf و با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸، برای هر کدام از سوبستراها K_m و V_m محاسبه شد.

مطالعه پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده

در برابر حرارت

به منظور مقایسه پایداری حرارتی، آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و بعد از ۵ دقیقه نگهداری بر روی یخ، فعالیت آن‌ها در شرایط بهینه سنجیده شد. فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده قبل از انکوباسیون ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و برای مقایسه‌ی پایداری آن‌ها در برابر تغییرات دما، فعالیت باقی‌مانده به صورت نسبی محاسبه شد.

در برابر تغییرات pH

آنزیم های آزاد و تثبیت شده به مدت ۱۰ دقیقه در محدوده pH های ۶ تا ۸ در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار انکوبه شدند. پس از آن فعالیت آن ها در دمای بهینه سنجیده شد. فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده قبل از انکوباسیون ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و برای مقایسه ی پایداری در برابر pH، فعالیت باقی مانده به صورت نسبی محاسبه شد.

حذف فنل

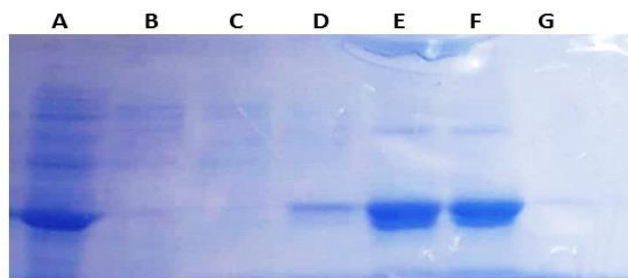
به منظور بررسی عملکرد آنزیم تثبیت شده، توانایی آن در حذف فنل مورد ارزیابی قرار گرفت. آنزیم تثبیت شده (۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر)، با ۵ میلی مولار H_2O_2 و ۵۰ میلی مولار فنل در حجم نهایی یک میلی لیتر بافر فسفات، به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه، در دمای محیط انکوبه شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر ثانیه، مقدار فنل باقی مانده با روش ۴-آمینوآنتی پیرین سنجش شد (Kinsley & Nicell, 2000). بدین صورت که ۵ میکرولیتر از ۴-آمینوآنتی پیرین ۲ درصد، ۱۰ میکرولیتر پتاسیم فروسیانید ۸ درصد، ۵ میکرولیتر از اسید و ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ را ۵ دقیقه انکوبه و جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر سنجیده شد. بازده حذف فنل از رابطه ی زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{غلظت ثانویه فنل} - \text{غلظت اولیه فنل}}{\text{غلظت اولیه فنل}} = \text{بازدهی حذف فنل}$$

نتایج

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب LDP

همان طور که در شکل ۱، مشاهده می شود فرکشن های E و F از خلوص بالایی برخوردارند که برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

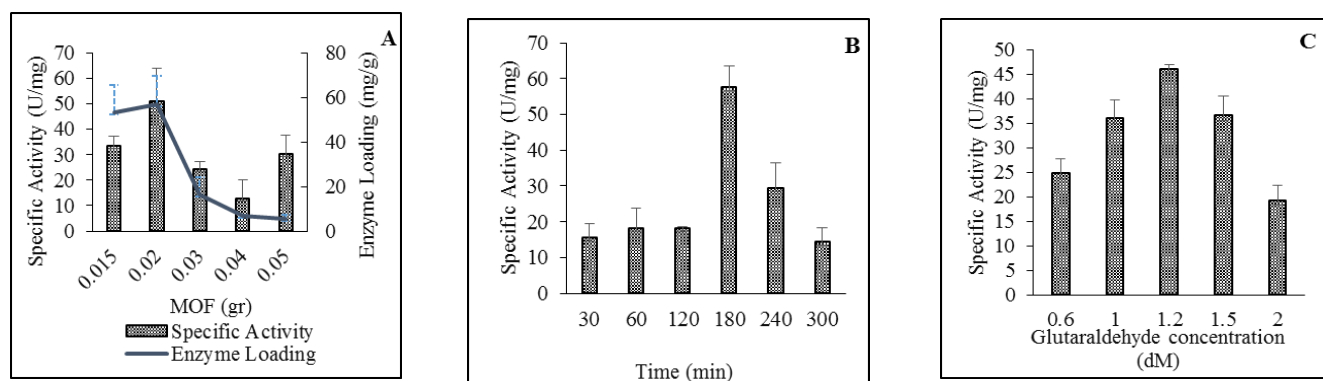


شکل ۱- تخلیص پروتئین نو ترکیب با غلظت های مختلف ایمیدازول. ردیف A نمونه قبل از ستون، ردیف B نمونه خارج شده با بافر شستشو و شماره های C تا G به ترتیب مربوط به غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول است

Figure 1. Purification of recombinant protein with different concentrations of imidazole. Lane A is the protein ladder, lane B is the sample passed from the column with wash buffer and lane numbers C-G are related to the imidazole concentrations of 50, 100, 200, 250 and 300 mM respectively

شرایط بهینه سازی تثبیت آنزیم بر روی MOF

همان گونه که در شکل ۲، A قابل مشاهده است برای تثبیت ۰/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر از آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵)، مقدار بهینه ی Zn-MOF، ۰/۰۲ گرم (شکل ۲، A) و برای تثبیت در این شرایط، بهترین غلظت گلو تار آل دئید ۱/۲ دسی مولار (شکل ۲، C) و زمان بهینه ی ۳ ساعت (شکل ۲، B) است. نتایج بارگذاری آنزیم بر روی Zn-MOF برای مقدار ۰/۰۲ گرم MOF، ۵۷mg/g محاسبه شد. بازدهی تثبیت در شرایط بهینه یعنی ۰/۰۲ گرم MOF، ۱/۲ دسی مولار گلو تار آل دئید و به مدت سه ساعت برابر ۶۷/۳±۱۶/۷ درصد محاسبه شد.

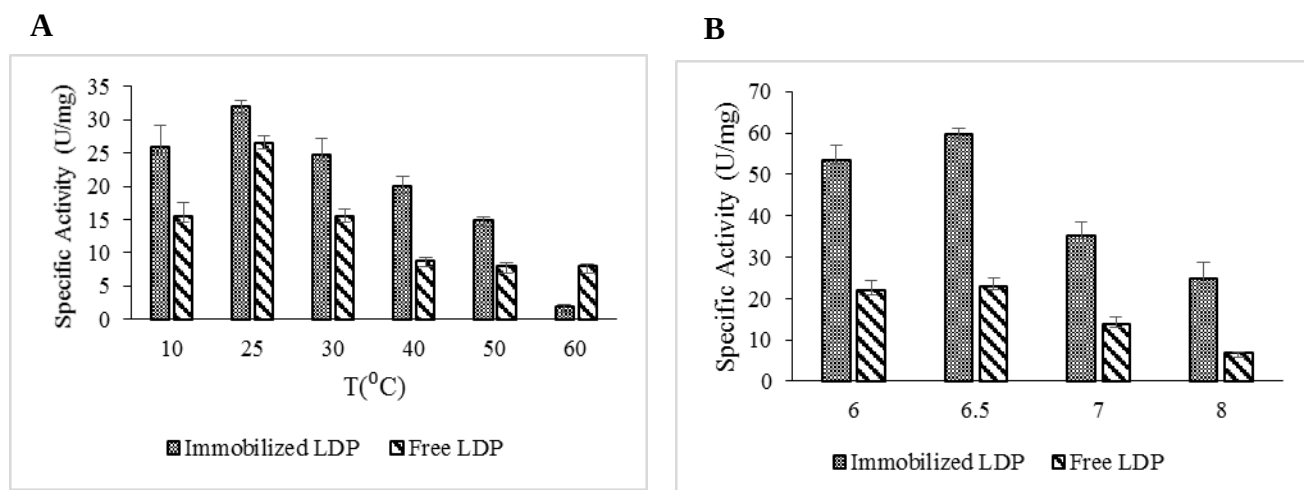


شکل ۱- بهینه سازی تثبیت آنزیم بر روی Zn-MOF با گلو تار آل دئید شامل مقدار (A) MOF، زمان برهمکنش (B) و غلظت گلو تار آل دئید (C)

Figure 2. Optimization of enzyme immobilization on Zn-MOF by glutaraldehyde including amount of MOF (A), time of interaction (B) and glutaraldehyde doses (C)

تأثیر تثبیت بر دما و pH بهینه ی فعالیت آنزیم

طبق شکل ۳، A دمای بهینه ی فعالیت آنزیم تثبیت شده مشابه آنزیم آزاد ۲۵ درجه سانتی گراد به دست آمد. همان طور که در شکل قابل مشاهده است، در تمام دماها فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده بیشتر از آنزیم آزاد است به جزء دمای ۶۰ درجه سانتی گراد که برعکس شده است. اگرچه در تمامی pH های مورد آزمایش، فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده بیشتر از آنزیم آزاد است ولی pH بهینه ی فعالیت آن مشابه آنزیم آزاد برابر ۶/۵ است.

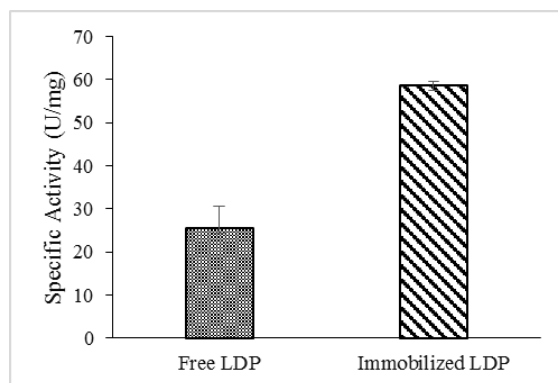


شکل ۲- تاثیر تثبیت در دمای بهینه (A) و pH بهینه (B) بر روی فعالیت آنزیم

Figure 3. Immobilization effects on enzyme activity at optimum temperature (A) and optimum pH (B)

مقایسه‌ی فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت‌شده و آزاد

در شرایط بهینه، فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده با گلوئارآلدئید محاسبه شد و مشخص گردید که فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت‌شده بیش از دو برابر آنزیم آزاد است (شکل ۴).



شکل ۳- مقایسه فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در شرایط بهینه

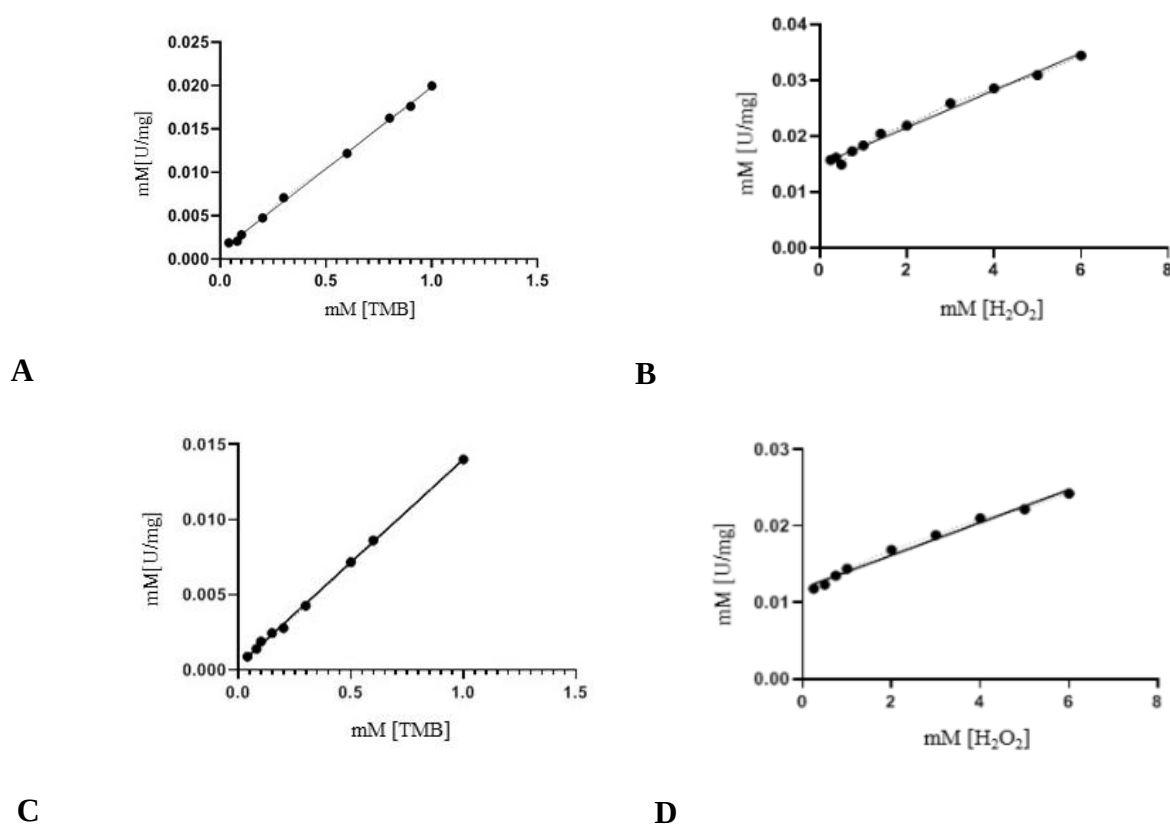
Figure 4. Comparison of specific activity for free and immobilized enzymes under optimum condition

تعیین پارامترهای سینتیکی

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، برای سوبسترای TMB، K_m آنزیم تثبیت‌شده نسبت به آنزیم آزاد تا ۴۹ درصد کاهش پیدا کرده است (K_m آنزیم تثبیت‌شده و آنزیم آزاد به ترتیب 0.26×10^{-4} و 0.51×10^{-4} مولار است) همچنین V_m آنزیم تثبیت‌شده

نسبت به آنزیم آزاد بیش از ۳۸ درصد افزایش یافته است (V_m آنزیم تثبیت شده برابر با $73/46 \times 10^{-3}$ و آنزیم آزاد 53×10^{-3} مولار بر دقیقه است).

برای سوبسترای H_2O_2 ، K_m آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد تا ۲۶ درصد افزایش پیدا کرده است (K_m آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد به ترتیب $5/66 \times 10^{-3}$ و $4/49 \times 10^{-3}$ مولار است)؛ در حالی که V_m آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد بیش از ۳۶ درصد افزایش یافته است (V_m آنزیم تثبیت شده $474/4 \times 10^{-3}$ و آنزیم آزاد $300/2 \times 10^{-3}$ مولار بر دقیقه است). نمودار Hanes-Woolf مربوط به هر یک از سوبسترهای TMB و H_2O_2 برای آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده با گلو تار آل دئید در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- نمودار Hanes-Woolf مربوط به TMB (A) و H_2O_2 (B) برای آنزیم آزاد و TMB (C) و H_2O_2 (D) برای آنزیم تثبیت شده

Figure 5. Hanes-Woolf plate related to TMB (A) and H_2O_2 (B) for free enzyme and TMB (C) and H_2O_2 (D) for immobilized enzyme

جدول ۱- K_m و V_m آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده

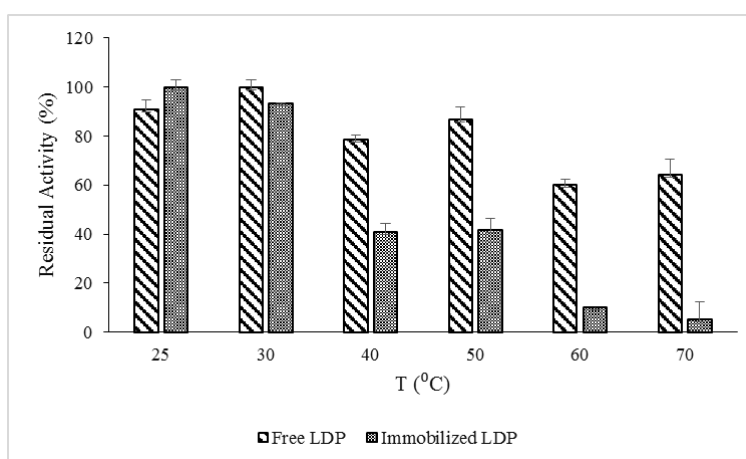
Table 1. K_m and V_m for free and immobilized enzymes

Substrates		TMB		H_2O_2	
Parameters	$K_m (M)$	$V_m (M.min^{-1})$	$K_m (M)$	$V_m (M.min^{-1})$	
Free LDP	0.51×10^{-4}	53×10^{-3}	4.49×10^{-3}	300.2×10^{-3}	
Immobilized LDP	0.26×10^{-4}	73.46×10^{-3}	5.66×10^{-3}	474.4×10^{-3}	

بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

در برابر تغییرات دما

بر اساس شکل ۶، فعالیت باقی‌مانده دو آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند. در تمامی دماها به جز ۲۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت باقی‌مانده‌ی آنزیم آزاد بیشتر از آنزیم تثبیت‌شده است.

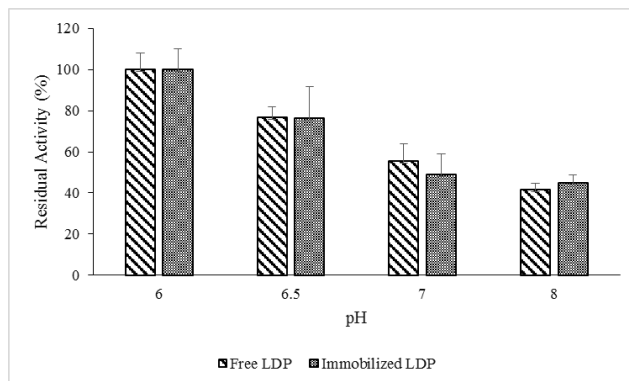


شکل ۶- پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده با گلو تار آلدئید: فعالیت باقی‌مانده‌ی آنزیم‌ها در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 6. Thermal stability of free and immobilized enzymes: removal activity in 25-70 °C ranges

در برابر تغییرات pH

بر اساس شکل ۷، فعالیت باقی‌مانده آنزیم تثبیت‌شده و آنزیم آزاد در pH ۶، بیشترین مقدار و با افزایش pH فعالیت باقی‌مانده‌ی هر دو آنزیم کاهش می‌یابد. اگر چه فعالیت باقی‌مانده آنزیم آزاد در pH ۷ بیشتر از آنزیم تثبیت‌شده است ولی با افزایش pH، فعالیت باقی‌مانده آنزیم تثبیت‌شده بیشتر از آنزیم آزاد می‌شود.



شکل ۷- پایداری در برابر تغییرات pH آنزیم آزاد و تثبیت شده: فعالیت باقی مانده آنزیم ها در محدوده pH ۶ تا ۸

Figure 7. Stability of free and immobilized enzymes against pH alteration: enzymes removal activity in 6-8 pH ranges

حذف فنل

توانایی آنزیم تثبیت شده برای حذف فنل، در زمان کوتاه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این آنزیم قادر است بعد از ۱۰ دقیقه ۱۵ درصد و بعد از ۳۰ دقیقه ۴۳/۶۸ درصد فنل را حذف کند (جدول ۲).

جدول ۲- بازدهی حذف فنل آنزیم تثبیت شده در دو زمان ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه

Table 2. Phenol removal potential of the immobilized enzyme at 10 min and 30 min

زمان	بازده حذف فنل
۱۰ دقیقه	٪۱۵
۳۰ دقیقه	۴۳/۶۸٪

بحث و نتیجه گیری

مسئله اساسی در استفاده صنعتی آنزیم ها، مشکل جداسازی آن ها از محیط واکنش و غیرفعال شدن در محلول های آلی، دما و pH های غیرمتعارف است. تثبیت یکی از روش های افزایش کارایی آنزیم ها برای به کارگیری آن ها در فرایندهای گوناگون بیوتکنولوژی است که سبب می شود آنزیم راحت تر از محصول جدا شود و در نتیجه آلودگی محصول به آنزیم کاهش پیدا کند (Sheldon, 2007; Tosa et al., 1966). نانوساختارها به دلیل سطح مقطع زیاد یکی از بسترهای مناسب جهت تثبیت معرفی شده است (Cipolatti et al., 2016; Klivanov, 2001). مطالعات Xie و همکاران نشان داده است که مساحت سطح MOF های معمولی از ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ مترمربع بر گرم است که می تواند از سطح مواد متخلخل معمولی مانند زئولیت ها و کربن ها بیشتر باشد. منافذ MOF ها به دلیل ساختار کریستالی خود بسیار منظم هستند (Xie et al., 2019). تصاویر SEM مطالعات ما نیز نشان دهنده ی منافذ همگن در Zn-MOF است (Farhadi et al., 2021). همچنین مطالعات Bilal و همکاران نشان داده سطح بیشتر MOF ها بازده بارگذاری بالاتری از مولکول های آنزیم را ارائه می دهد (Bilal et al., 2019).

از آنجا که با پیشرفت در روش‌های بالینی و تکنیک‌های تشخیصی، واکنش‌های بر پایه‌ی احیا مورد توجه قرار گرفته‌اند، پراکسیدازها نقش‌های مهمی در تشخیص‌های کلینیکی ایفا می‌کنند. با توجه به کاربردهای زیاد پراکسیدازها، در این پژوهش پراکسیداز/لپیدیوم در/با (LDP) بر روی ساختارهای نانویی آلی-فلزی روی با استفاده از گلوئارآلدئید به‌عنوان عامل پیونددهنده، تثبیت شد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری آن مورد مطالعه قرار گرفت.

از مزایای اصلی تثبیت کوالانسی محکم بودن این اتصال است و همچنین آنزیم تثبیت‌شده پایداری لازم را در شرایط متفاوت دارد (Sakai-Kato *et al.*, 2004). استفاده از اتصال‌دهنده در این روش با ایجاد فضا نه تنها احتمال دنا توره شدن را کاهش می‌دهد بلکه باعث افزایش امکان تحرک آنزیم-سوبسترا می‌شود (Cano *et al.*, 2006). فعالیت آنزیم متصل شده با روش کوالان به شکل، اندازه و مواد تشکیل‌دهنده‌ی بستر و همچنین شرایط اعمال شده در حین اتصال آنزیم به بستر نیز بستگی دارد (Chakraborty *et al.*, 2016). تثبیت از طریق تغییر شیمیایی احتمالی، بر فعالیت آنزیم اثر می‌گذارد به‌ویژه زمانی که محل اتصال نزدیک جایگاه فعال آنزیم باشد به همین دلیل مقدار عامل پیونددهنده بهینه می‌شود (Chang, 1971). تأثیر زمان در فرایند تثبیت آنزیم از عوامل مهم دیگر است که توسط بسیاری از محققین گزارش شده و این مقدار بر اساس بستر انتخابی از یک ساعت تا ۲۴ ساعت متفاوت است (Hirsh *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2012, Dong *et al.*, 2014). Sahin و همکاران، زمان بهینه تثبیت کوالان تریپسین بر روی نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با پلی وینیل را یک ساعت در نظر گرفتند (Sahin & Ozmen, 2020).

در این مطالعه، به‌منظور افزایش کارایی تثبیت برخی از پارامترها از جمله غلظت Zn-MOF، غلظت گلوئارآلدئید و زمان برهمکنش نانوساختارها، آنزیم و گلوئارآلدئید بهینه شدند. طبق نتایج، مقدار ۰/۰۲ گرم Zn-MOF، با غلظت ۱/۲ دسی مولار گلوئارآلدئید و به مدت ۳ ساعت انکوبه کردن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد شرایط بهینه‌ی برای تثبیت در نظر گرفته شد که برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در این شرایط میزان بارگذاری آنزیم ۵۷mg/g و بازدهی تثبیت ۶۷/۳ درصد محاسبه شد. اگر چه در حضور گلوئار آلدئید، احتمال اتصال آنزیم ها به یکدیگر وجود دارد ولی به دلیل حضور MOF و غلظت بالای آن (تقریباً ۲۵ برابر غلظت آنزیم)، احتمال اتصال آنزیم به بستر و در نتیجه تثبیت آنزیم بر روی MOF زیاد است. از طرف دیگر انتظار می رود در صورت اتصال تعداد محدودی از آنزیم ها به هم با شستشو های متوالی بعد از فرایند تثبیت و حذف محصول رویی، تنها نمونه های تثبیت شده باقی بمانند. نکته قابل توجه اینکه، تثبیت این آنزیم از طریق اتصال فیزیکی با بارگذاری ۱۰۹/۹mg/g و بازدهی تثبیت ۹۳/۳ درصد انجام شد (Farhadi *et al.*, 2021). تثبیت آنزیم هیدرولاز با این اتصال‌دهنده با بارگذاری ۸۷mg/g انجام شده است (Cao *et al.*, 2016a) و بازدهی تثبیت آنزیم HRP با این اتصال‌دهنده ۸۳٪ گزارش شده است (Altikatoglu Yapaoz & Attar, 2020). در تثبیت کوالانسی احتمال ممانعت فضایی و همچنین تغییر در ساختار آنزیم وجود دارد (Zucca & Sanjust, 2014).

بر اساس نتایج مطالعات فیزیکوشیمیایی مشخص شد که تثبیت آنزیم LDP، بر دمای بهینه و pH بهینه آنزیم تأثیر ندارد. نتایج نشان داد که تمایل آنزیم پس از تثبیت نسبت به آنزیم آزاد به سوبسترا TMB و H₂O₂ تغییر کرده است و به ترتیب افزایش و کاهش یافته است. تغییر در پارامترهای سینتیکی یک آنزیم بعد از تثبیت توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. Chang و همکاران گزارش کردند که پس از تثبیت HRP بر روی core-shell های مغناطیسی ساخته‌شده از نانوذرات اکسید آهن، با استفاده از گلوئارآلدئید، K_m آنزیم افزایش یافته که دلیل آن را ایجاد ممانعت فضایی توسط بستر دانسته‌اند (Chae *et al.*, 1998). همچنین Cao

و همکاران، آنزیم اپوکسید هیدرولاز سویا (Soybean epoxide hydrolase) را بر روی UiO-66-NH₂ MOF با ۱/۳ دسی مولار گلو تار آل دئید تثبیت کردند و گزارش کرده اند که تمایل آنزیم به سوبسترا بعد از تثبیت افزایش یافته است که دلیل آن را تغییر در ساختار سوم آنزیم دانسته اند (Cao *et al.*, 2016a).

چنین به نظر می رسد که افزایش تمایل آنزیم تثبیت شده به TMB ممکن است به یکی از دلایل زیر باشد: تغییر ساختار آنزیم پس از تثبیت باعث شود سوبسترا به صورت بهتری با جایگاه فعال آنزیم واکنش دهد (Danson & Hough, 1998) و یا این که چون Zn-MOF سطح مقطع زیادی دارد، در نتیجه دسترسی سوبسترا به آنزیم را بهبود می بخشد (Klibanov, 2001). همچنین کاهش تمایل آنزیم به H₂O₂ می تواند به دلیل تغییر ساختار آنزیم بعد از تثبیت باشد (Cao *et al.*, 2016, Xia *et al.*, 2017, Farhadi *et al.*, 2021).

از آنجا که تثبیت آنزیم بر روی بستر از هر سمتی می تواند صورت گیرد، فعالیت ویژه ی آنزیم تثبیت شده می تواند نسبت به آنزیم آزاد تغییر کند (Rodrigues *et al.*, 2013). همان گونه که در نتایج نشان داده شد، فعالیت ویژه ی آنزیم تثبیت شده حدود ۲ برابر نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافته است؛ که با نتایج به دست آمده از تثبیت فیزیکی این آنزیم روی Zn-MOF مطابقت دارد (Farhadi *et al.*, 2021). همچنین Nadar & Rathod شاهد افزایش فعالیت آنزیم لیپاز پس از تثبیت آن بر روی ساختارهای آلی-فلزی زئولیت بودند (Nadar & Rathod, 2020). تثبیت آنزیم ها بر روی بسترها می تواند تأثیرات مثبت و با منفی بر روی فعالیت آنزیم داشته باشد که این تغییرات در خواص آنزیم ها با شدت های متفاوت می تواند همراه با تغییر در ساختمان آنزیم باشد (Rodrigues *et al.*, 2013).

علاوه بر مطالعات خصوصیات فیزیکوشیمیایی و سینتیکی آنزیم، پایداری آنزیم تثبیت شده با استفاده از گلو تار آل دئید در برابر حرارت و pH نیز بررسی شد. نتایج حاکی از آن است فعالیت باقی مانده ی آنزیم تثبیت شده با گلو تار آل دئید در دماهای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی گراد کمتر از آنزیم آزاد است. همچنین پایداری آنزیم در pH های اسیدی نسبت به آنزیم آزاد کمتر ولی در pH های بازی بیشتر از آنزیم آزاد است. تثبیت فیزیکی این آنزیم بر روی نانوساختار روی سبب افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد در برابر pH های بازی و پایداری ساختاری آن در برابر حرارت شده بود (Farhadi *et al.*, 2021). بعضی از مطالعات نشان دهنده ی این هستند که استفاده از مواد احیا کننده جهت تثبیت پروتئین ها باعث افزایش پایداری آن ها نمی شود (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995). Cao با تثبیت Soybean epoxide hydrolase بر روی UiO-66-NH₂ MOF با استفاده از گلو تار آل دئید گزارش کرده اند که پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده در بازه ی دمایی ۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد بیشتر از آنزیم آزاد بوده و همچنین پایداری در تغییرات pH آنزیم تثبیت شده در بازه ۶ تا ۸ بیشتر از آنزیم آزاد بوده است (Cao *et al.*, 2016a).

گزارش متعددی در مورد استفاده از پراکسیدازهای تثبیت شده برای حذف فنل وجود دارد (Tatsumi *et al.*, 1996, Alemzadeh & Nejadi, 2009, Ai *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2019, Pantić *et al.*, 2021). به همین منظور، پتانسیل حذف فنل که یک آلودگی خطرناک صنعتی تلقی می شود (Michałowicz & Duda, 2007)، برای دو زمان بسیار کوتاه ده دقیقه ای و سی دقیقه ای سنجیده شد. بازدهی حذف فنل به ترتیب در این زمان ها ۱۵٪ و ۴۳/۶۸٪ بود. قابل ذکر است که LDP تثبیت شده به راحتی با سانتریفیوژ شدن، از

محلول واکنش کاملاً جداسازی می‌شد. Bayramoglu و همکاران حداکثر حذف فنل توسط HRP تثبیت‌شده را ۸۶ درصد در دو ساعت گزارش کردند (Bayramoğlu & Arica, 2008).

به‌طور کلی، تثبیت در بیشتر موارد تغییر جزئی در ساختار آنزیم‌ها ایجاد می‌کند و این ممکن است خصوصیات آنزیم را تغییر دهد (Hanefeld *et al.*, 2009). این موضوع می‌تواند به دلیل برهم‌کنش غیراختصاصی میان بستر و آنزیم و یا همان برهم‌کنش‌هایی باشد باعث تثبیت می‌شوند، (Mateo *et al.*, 2007, Garcia-Galan *et al.*, 2011, Hernandez & Fernandez-Lafuente, 2011). همچنین در بسیاری از مواقع، تثبیت آنزیم موجب تغییراتی در فعالیت آنزیم می‌شود که ممکن است به دلیل تغییر ساختار آنزیم باشد (Rodrigues *et al.*, 2013). در مجموع، اگرچه تثبیت با گلو تار آلدئید نسبت به روش جذب فیزیکی محکم‌تر می‌باشد ولی در این مطالعه، پایداری آنزیم تثبیت شده در برابر تغییرات pH و دما بهبود نیافت. بنابراین به منظور افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به تغییرات pH و دما، تثبیت کوالان این آنزیم بر بسترهای دیگر و یا استفاده از لینکرها دیگر پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Ai, J., Zhang, W., Liao, G., Xia, H. and Wang, D. (2016). Immobilization of horseradish peroxidase enzymes on hydrous-titanium and application for phenol removal. *RSC advances* 6(44): 38117-38123.
- Alemzadeh, I. and Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials* 166(2-3): 1082-1086.
- Ali, S. M. U., Nur, O., Willander, M. and Danielsson, B. (2010). A fast and sensitive potentiometric glucose microsensor based on glucose oxidase coated ZnO nanowires grown on a thin silver wire. *Sensors and Actuators B: Chemical* 145(2): 869-874.
- Altikatoglu Yapaoz, M. and Attar, A. (2020). An accomplished procedure of horseradish peroxidase immobilization for removal of acid yellow 11 in aqueous solutions. *Water Science and Technology* 81(12): 2664-2673.
- Ansari, S. A. and Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology advances* 30(3): 512-523.
- Barragán, L. P., Buenrostro-Figueroa, J., González, C. A. and Marañón, I. (2016). Production, Stabilization, and Uses of Enzymes From Fruit and Vegetable Byproducts. *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products*, Elsevier: 271-286.
- Bayramoğlu, G. and Arica, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials* 156(1-3): 148-155.
- 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(1-2): 248-254.
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., L., H.M.N. (2019) Multifunctional metal-organic frameworks-based biocatalytic platforms: recent developments and future prospects. *Journal of Materials Research and Technology* 8(2): 2359-2371.
- Cano, À., Minguillón, C. and Palet, C. (2006). Immobilization of endo-1, 4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization. *Journal of membrane science* 383(2-1):280.
- Cao, S.-L., Yue, D.-M., Li, X.-H., Smith, T. J., Li, N., Zong, M.-H., Wu, H., Ma, Y.-Z. and Lou, W.-Y. (2016a). Novel nano-/micro-biocatalyst: soybean epoxide hydrolase immobilized on UiO-66-NH₂ MOF for efficient biosynthesis of enantiopure (R)-1, 2-octanediol in deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(6): 3586-3595.

- Cao, S., Xu, P., Ma, Y., Yao, X., Yao, Y., Zong, M., Li, X. and Lou, W. (2016). Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. *Chinese Journal of Catalysis* 37(11): 1814-1823.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, E. Y. (1998). Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Applied biochemistry and biotechnology* 73(2-3): 195-204.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S. and Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical reviews in biotechnology* 36(1): 43-58.
- Chang, T. (1971). Stabilization of enzyme by microencapsulation with a concentrated protein solution or by crosslinking with glutaraldehyde. *Biochem Biophys Res Com* 44(6): 1531-1533.
- Cipolatti, E. P., Valerio, A., Henriques, R. O., Moritz, D. E., Ninow, J. L., Freire, D. M., Manoel, E. A., Fernandez-Lafuente, R. and de Oliveira, D. (2016). Nanomaterials for biocatalyst immobilization—state of the art and future trends. *RSC Advances* 6(106): 104675-104692.
- Danson, M. J. and Hough, D. W. (1998). Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends in microbiology* 6(8): 307-314.
- Dhruvaraj, M. (2017). Role of peroxidase in clinical assays: A short review. *Journal of Clinical Nutrition* 3(2): 14.
- Dong, L., Ge, C., Qin, P., Chen, Y. and Xu, Q. (2014). Immobilization and catalytic properties of candida lipolytic lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. *Solid State Sciences* 31: 8-15.
- Farhadi, S., Riahi-Madvar, A., Sargazi, G. and Mortazavi, M. (2021). Immobilization of *Lepidium draba* peroxidase on a novel Zn-MOF nanostructure. *International Journal of Biological Macromolecules* 173: 366-378.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Asadikaram, G. and Rahbar, M. R. (2017). In silico locating the immune-reactive segments of *Lepidium draba* peroxidase and designing a less immune-reactive enzyme derivative. *Computational biology and chemistry* 70: 21-30.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G. (2017). Heterologous expression, purification and characterization of a peroxidase isolated from *Lepidium draba*. *The protein journal* 36(6): 461-471.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C., Rodriguez, V. and Guisan, J. (1995). Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme and microbial technology* 17(6): 517-523.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. and Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 3532904-2885:(16).
- Getman, R. B., Bae, Y.-S., Wilmer, C. E. and Snurr, R. Q. (2012). Review and analysis of molecular simulations of methane, hydrogen, and acetylene storage in metal–organic frameworks. *Chemical reviews* 112(2): 703-723.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. and Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* 38(2): 453-468.
- Hassanzadeh, J., Khataee, A. and Eskandari, H. (2018). Encapsulated cholesterol oxidase in metal-organic framework and biomimetic Ag nanocluster decorated MoS2 nanosheets for sensitive detection of cholesterol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 259: 402-410.
- Hernandez, K. and Fernandez-Lafuente, R. (2011). Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and microbial technology* 48(2): 107-122.
- Hirsh, S., Bilek, M., Nosworthy, N., Kondyurin, A., Dos Remedios, C. and McKenzie, D. (2010). A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir* 26(17): 14380-14388.
- Kinsley, C. and Nicell, J. A. (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology* 73(2): 139-146.

- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature* 409(6817): 241.
- Krainer, F. W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A. and Spadiut, O. (2014). Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 95: 104-112.
- Li, J., Chen, X., Xu, D. and Pan, K. (2019). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal. *Ecotoxicology and environmental safety* 170: 716-721.
- Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L. and Belleville, M.-P. (2004). Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *Journal of Membrane Science* 241(1): 161-166.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology* 40(6): 1451-1463.
- Michałowicz, J. and Duda, W. (2007). Phenols--Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies* 16(3).
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. and Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29(2): 205-220.
- Mohamed, S. A., Al-Harbi, M. H., Almulaiky, Y. Q., Ibrahim, I. H. and El-Shishtawy, R. M. (2017). Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology* 27: 84-90.
- Nadar, S. S. and Rathod, V. K. (2020). Immobilization of proline activated lipase within metal organic framework (MOF). *International journal of biological macromolecules* 152: 1108-1112.
- NOUROUZIAN, D. (2003) Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology.
- Pantić, N., Prodanović, R., Đurđić, K. I., Polović, N., Spasojević, M. and Prodanović, O. (2021). Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads. *Environmental Technology & Innovation* 21: 101211.
- Radzicka, A. and Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science* 267(5194): 90-93.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R. and Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* 42(15): 6290-6307.
- Sahin, S. and Ozmen, I. (2020). Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 184: 113195.
- Sakai-Kato, K., Kato, M., Ishihara, K. and Toyo'oka, T. (2004). An enzyme-immobilization method for integration of biofunctions on a microchip using a water-soluble amphiphilic phospholipid polymer having a reacting group. *Lab on a Chip* 4(1): 4-6.
- Sanz, V., De Marcos, S., Castillo, J. R. and Galbán, J. (2005). Application of molecular absorption properties of horseradish peroxidase for self-indicating enzymatic interactions and analytical methods. *Journal of the American Chemical Society* 127(3): 1038-1048.
- Sargazi, G., Afzali, D., Ebrahimi, A. K., Badoei-Dalfard, A., Malekabadi, S. and Karami, Z. (2018). Ultrasound assisted reverse micelle efficient synthesis of new Ta-MOF@ Fe₃O₄ core/shell nanostructures as a novel candidate for lipase immobilization. *Materials Science and Engineering: C* 93: 768-775.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 349(8-9): 1289-1307.
- Silva, J., Macedo, G., Rodrigues, D., Giordano, R. and Gonçalves, L. (2012). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal* 60: 16-24.
- Stephens, I. E., Bondarenko, A. S., Bech, L. and Chorkendorff, I. (2012). Oxygen Electroreduction Activity and X-Ray Photoelectron Spectroscopy of Platinum and Early Transition Metal Alloys. *ChemCatChem* 4(3): 341-349.

- Tatsumi, K., Wada, S. and Ichikawa, H. (1996). (Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 51(1): 126-130.
- Tischer, W. and Wedekind, F. (1999). Immobilized enzymes: methods and applications. *Biocatalysis-from discovery to application*, Springer: 95-126.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I. (1966). Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia* 31(4): 214.
- Tukel, S. S. and Alptekin, O. (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochemistry* 39(12): 2149-2155.
- Xia, G. H., Cao, S. L., Xu, P., Li, X. H., Zhou, J., Zong, M. H. and Lou, W. Y. (2017). Preparation of a nanobiocatalyst by efficiently immobilizing *Aspergillus niger* lipase onto magnetic metal-biomolecule frameworks (BioMOF). *ChemCatChem* 9(10): 1794-1800.
- Xie, Y., Chen, C., Ren, X., Wang, X., Wang, H., Wang, X. (2019) Emerging natural and tailored materials for uranium-contaminated water treatment and environmental remediation. *Progress in Materials Science* 103: 180-234.
- Yujun, S., Konggang, Q., Chao, Z., Jinsong, R. and Xiaogang, Q. (2010). Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Adv. Mater.* 22: 2206-2210.
- Zhang, Y.-W., Tiwari, M. K., Jeya, M. and Lee, J.-K. (2011). Covalent immobilization of recombinant *Rhizobium etli* CFN42 xylitol dehydrogenase onto modified silica nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology* 90(2): 499-507.
- Zhou, H. (2012). J. r. long, OM yaghi. *Chem. Rev* 112: 673.
- Zhou, H. (2014). C.; Kitagawa, S. Metal- Organic Frameworks (MOFs). *Chem. Soc. Rev* 43: 5415-5418.
- Zhou, Q. Z. and Chen, X. D. (2001). Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *Journal of food engineering* 48(1): 69-74.
- Zucca, P. and Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules* 19(9): 14139-14194.

Covalent Immobilization of *Lepidium draba* peroxidase recombinant on zinc metal-organic framework using glutaraldehyde

S. Farhadi¹, A. Riahi-Madvar^{2*}, M. Mortazavi³, G. Sargazi⁴

Received: 2021.11.1

Accepted: 2022.5.9

Abstract

Introduction: *Lepidium draba* peroxidase (LDP) belonging to the class III plant peroxidases that its amino acid sequence shows over 90% similarity with horseradish peroxidase (HRP).

Methods: In this study, after expression and purification of LDP, its immobilization conditions were optimized on the Zinc metal-organic framework (Zn-MOF) using glutaraldehyde as a cross-linking agent for firm binding. Then physicochemical properties, kinetic parameters and stability of the immobilized enzyme were compared with the free one.

Results and discussion: The best conditions for enzyme immobilization with 67% yield were optimized at concentration of 0.02 g of Zn-MOF, 0.75mg/ml and 1.2 dM of glutaraldehyde, after 3h incubation. The results showed that the specific activity of the immobilized enzyme increased more than doubled that of free enzyme and its K_m was reduced by 49% compared to the free one for TMB substrate. Also its kinetic stability reduced against pH and temperature in compared to the free enzyme.

Keywords: Kinetics, Optimization, Specific Activity, Stability

1 MSc Graduate, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

2 Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran (*corresponding author: riahi.ali@gmail.com)

3 Assistance Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

4. Assistance Professor, Noncommunicable Diseases Research Center, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی پلاتین از پساب صنایع دارویی و به‌کارگیری آنان

به‌منظور حذف دارو با استفاده از جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای

سید رضا گراکویی^۱، خسرو عیسی زاد^۲، حجت اله زمانی^۳، روحان رخشایی^۴، مهدی شهریاری نور^۵

چکیده

مقدمه: استفاده از باکتری‌ها، رویکردی نوین در کاهش آلاینده‌های دارویی است. در این مطالعه، باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی پلاتین از پساب دارویی، جداسازی و شناسایی شدند و قابلیت آنان در کاهش دارو در تیمارهای یک و چندگونه‌ای بررسی شد. **روش‌ها:** جداسازی باکتری‌ها به روش فیلتراسیون غشایی انجام پذیرفت و قابلیت کاهش دارو توسط جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای با استفاده از HPLC بررسی گردید. **نتایج و بحث:** پنج گونه با قابلیت کاهش اگزالی پلاتین، شامل *Enterobacter*، *Moraxella* spp و *agglomerans*، *Citrobacter youngae*، *Xenorhabdus* spp، *Bacillus licheniformis*، *B. licheniformis* با کاهش ۵۲ درصدی و *E. agglomerans* با کاهش ۲۱ درصدی، به ترتیب بیشترین و کمترین قابلیت حذف دارو را نشان دادند. جمعیت باکتریایی شامل *B. licheniformis* و *Xenorhabdus* spp و *E. agglomerans* با کاهش ۷۹ درصدی بهترین عملکرد را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. این مطالعه نشان‌دهنده قابلیت استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از پساب دارویی در کاهش آلاینده‌های دارویی است.

واژه‌های کلیدی: تجزیه میکروبی، داروی ضدسرطان، زیست پالایی، کروماتوگرافی با فشار بالا

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران * نویسنده مسئول: issa_kaam@yahoo.com

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴. گروه شیمی، دانشکده علوم دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۵. گروه میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

مقدمه

وجود ترکیبات شیمیایی در پساب صنایع دارویی همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست-محیطی در نظر گرفته می‌شود. از سویی، با توجه به تولید روزافزون محصولات دارویی، آزادسازی این ترکیبات در اکوسیستم‌های مختلف به‌عنوان تهدید جدی زیست-محیطی مطرح می‌گردد (Jureczko & Kalka., 2020). همچنین، افزایش روزافزون تعداد موارد ابتلا به سرطان منجر به افزایش تولید و مصرف داروهای ضد سرطانی شده است. به دلیل ویژگی‌های سمیتی داروهای ضدسرطانی، آزادسازی چنین ترکیباتی می‌تواند سبب اثرات نامطلوب کوتاه‌مدت و بلندمدت بر روی یوکاریوت‌ها شود (Cristóvão *et al.*, 2020). آزادسازی این داروها در اکوسیستم‌های آبی و خاکی به‌طور عمده از طریق پساب‌های خانگی، بیمارستانی و همچنین پساب صنایع دارویی صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه این داروها به‌طور طبیعی دارای عملکرد مهار تکثیر سلولی و القاء مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) هستند، آزادسازی آنان در محیط‌زیست می‌تواند حیات همه موجودات زنده به‌ویژه یوکاریوت‌ها را تهدید نماید (Heath *et al.*, 2016; Jureczko & Kalka., 2020).

ترکیبات ضد سرطان حاوی پلاتینیوم شامل سیس پلاتین (cis-diamminedichloroplatinum II) و اگزالی‌پلاتین ([(1R,2R)-cis-diammine 1,1-cyclobutanedicarboxylato 1,2-cyclohexanediamine-N,NV]oxalate(2-)-O,Ov-platinum) و کربوپلاتین (cis-diammine 1,1-cyclobutanedicarboxylato platinum) به‌طور وسیعی در درمان انواع متعدد سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان، سرطان روده و سرطان خون تجویز می‌شوند (Konate *et al.*, 2011; Ghafuria *et al.*, 2018). این گروه از داروها قابلیت انحلال بالایی در آب دارند و این ویژگی منجر به افزایش خطرات زیست‌محیطی ناشی از آلودگی با آنان می‌گردد (Ghafuria *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای که Fonseca و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام دادند نشان دادند که مقادیر زیادی از داروهای حاوی پلاتینیوم از طریق پساب‌های بیمارستانی، و پسماندهای بیمارستانی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌گردد (Fonseca *et al.* 2017). از سویی، با توجه به افزایش تولیدات این داروها، آلودگی‌های محیطی ناشی از پساب‌های دارویی، بیش‌ازپیش جدی به نظر می‌رسد.

اگرچه روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی برای کاهش ترکیبات آلاینده از پساب در دسترس می‌باشند، وجود معایبی از جمله هزینه بالا، کارایی پایین، پیچیدگی‌های فنی و همچنین تولید ترکیبات جانبی سمی از عوامل محدودکننده در این زمینه به شمار می‌آیند (Zhang *et al.*, 2013). به همین دلیل، استفاده از روش‌های مبتنی بر فرایندهای زیستی در کاهش و حذف ترکیبات سمی از پساب‌ها، به‌عنوان یک رویکرد ساده، ارزان و دوستدار محیط‌زیست، بیش‌ازپیش مورد استقبال و توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، با توجه به اینکه داروهای ضد سرطان فرایندهای تکثیر سلول‌های یوکاریوتی را مورد هدف قرار می‌دهند، به نظر می‌رسد که

استفاده از باکتری‌ها، به‌عنوان موجودات پروکاریوت، می‌تواند رویکرد مناسبی در این زمینه باشد (Westman *et al.*, 2012; Zamani *et al.*, 2018).

مطالعات بسیار محدودی در زمینه کاهش یا حذف داروهای ضد سرطانی توسط میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. اگرچه، در این مطالعات قابلیت آینده‌دار استفاده از جمعیت‌های میکروبی در کاهش آلاینده‌های دارویی نشان داده شده است (Zamani *et al.*, 2018; 2016; Knopp *et al.*, 2017; Kaya *et al.*). بر این اساس، مطالعه حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی پلاتین از پساب صنایع دارویی و همچنین بررسی قابلیت کاهش غلظت داروی اگزالی پلاتین از نمونه‌های حاوی دارو با استفاده از جمعیت‌های یک و چندگونه‌ای باکتری‌های جداسازی شده انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها:

جداسازی گونه‌های باکتریایی از پساب دارویی

در این مطالعه سویه‌های باکتریایی از پساب شرکت داروسازی سبحان انکولوژی، به‌عنوان یک از واحدهای تولیدکننده داروی اگزالی پلاتین، جداسازی شدند. نمونه‌برداری از مخازن پساب دارویی و در مرحله پیش از تصفیه فیزیکی و شیمیایی انجام پذیرفت. نمونه‌های جداسازی شده بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

به‌منظور جداسازی باکتری‌های موجود در پساب دارویی و همچنین افزایش شانس جداسازی بیشتر گونه‌ها، از جمله گونه‌هایی که فراوانی جمعیتی پایین‌تری دارند، از روش فیلتراسیون غشایی استفاده گردید. در ابتدا نمونه‌های برداشته‌شده از فیلترهایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شدند. سپس فیلترها درون محیط‌های کشت TSB و R2A قرار گرفتند و محیط‌های کشت به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۲۲ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در پایان دوران گرماگذاری، باکتری‌های کل موجود در نمونه پساب از طریق کشت چمنی در محیط آگار و پاساژ کلنی‌های تک، جداسازی و خالص‌سازی شدند (Mulamattathil *et al.* 2014).

تعیین غلظت مهار اگزالی پلاتین

به‌منظور ارزیابی اثر مهار اگزالی پلاتین بر روی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، از روش تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا یک شیب غلظت از داروی اگزالی پلاتین (Sigma-Aldrich) با غلظت‌های ۰/۱۵ تا یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط TSB آماده گردید. سپس سویه‌های باکتریایی جداسازی شده با غلظت

به هر لوله تلقیح شدند. بعد از آن پلیت‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند و رشد باکتری‌ها از طریق کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت (Bio-Rad, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

غربالگری و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین

با توجه به نتایج آزمون MIC، سویه‌های باکتریایی که مقاومت مناسبی در برابر غلظت‌های موردنظر اگزالی‌پلاتین داشتند به‌منظور بررسی قابلیت تجزیه‌کنندگی این دارو مورد غربالگری قرار گرفتند. به این منظور، از محیط‌های حداقل نمکی (MSM) حاوی اگزالی‌پلاتین، به‌عنوان تنها منبع کربن، با غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. محیط غربالگری مورد استفاده حاوی ترکیبات ذیل هست: $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; K_2HPO_4 , 0.1; NH_4Cl , 1 (g per L) و همچنین ۰/۱ درصد از عناصر کمیاب هست. محلول عناصر کمیاب شامل: $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 (Zamani *et al.*, 2018).

سویه‌های باکتریایی که قادر به رشد و ایجاد کدورت در محیط MSM بودند به‌عنوان سویه‌های دارای قابلیت تجزیه‌کنندگی اگزالی‌پلاتین در نظر گرفته شده‌اند. به‌منظور شناسایی سویه‌های جداسازی شده، از کیت‌های شناسایی بیوشیمیایی MICROGEN A&B (انگلستان) و مطابق با دستورالعمل‌های سازنده کیت انجام گردید.

بررسی قابلیت کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین

به‌منظور بررسی قابلیت هر یک از سویه‌های غربالگری شده، کشت خالص از هر باکتری تهیه شده و با تراکم جمعیتی نهایی 1×10^6 cfu/mL به $1/5$ میلی‌لیتر محیط MSM و همچنین حاوی داروی اگزالی‌پلاتین با غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر تلقیح شدند. این آزمون در فلاسک‌های شیشه‌ای با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام پذیرفت. فلاسک‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و همچنین تیمار حاوی محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌های هر فلاسک در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمونه‌برداری شدند. نمونه‌های جداسازی شده با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان از محلول رویی نمونه‌برداری شده و از آن برای آزمون تعیین مقدار ماده مؤثره اگزالی‌پلاتین توسط دستگاه کروماتوگرافی با فشار بالا (HPLC) (Waters E2695, USA) استفاده

گردید. حلال مورد استفاده جهت آنالیز HPLC استونیتریل ۱ درصد، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و سرعت تزریق ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. در نهایت کمیت سنجی دارو در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام پذیرفت.

تعیین ترکیب جمعیتی بهینه از گونه‌های جداسازی شده

به‌منظور بررسی اثر استفاده هم‌زمان از چند گونه باکتریایی و بر اساس نتایج آزمون‌های غربالگری، چهار تیمار مختلف طراحی گردید که در هر تیمار به‌طور هم‌زمان سه گونه باکتریایی جداسازی شده استفاده گردید. این آزمون در فلاسک‌های با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر و حاوی محیط MSM (۲۰۰ میلی‌لیتر) حاوی اگزالی‌پلاتین صورت پذیرفت. نسبت جمعیتی باکتری‌های مورد استفاده به‌طور مساوی در نظر گرفته شد و تراکم نهایی جمعیت باکتری به میزان $1/5 \times 10^6$ cfu/mL انتخاب گردید. فلاسک‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و همچنین تیمار حاوی محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت غلظت اگزالی‌پلاتین در نمونه‌های هر فلاسک با استفاده از آنالیز HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام پذیرفت و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با سطح معنی‌داری $P < 0/05$ به‌منظور ارزیابی وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

هرساله تعداد بسیار زیادی از ترکیبات دارویی، شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، داروهای مسکن و محصولات ضد سرطان ساخته شده و به مصرف می‌رسند. به دنبال مصرف این داروها، بسیاری از آنان به‌طور کامل در بدن متابولیزه نمی‌شوند و مقادیر قابل توجهی از آنان از طریق ادرار و مدفوع به پساب‌های شهری و بیمارستانی وارد می‌شوند. همچنین، در محیط‌های بیمارستانی و مراکز درمانی آزادسازی این داروها از طریق پساب بیمارستانی می‌تواند منجر به ورود آنان به محیط‌زیست گردد. از سوی دیگر، ورود این داروها به پساب صنایع داروسازی حین فرایند تولید امری اجتناب‌ناپذیر است. ورود این گونه ترکیبات به محیط‌زیست می‌تواند مخاطرات جدی زیست‌محیطی برای موجودات زنده در پی داشته باشد (Gautam et al., 2007).

اگرچه ترکیبات دارویی متعددی هر ساله وارد اکوسیستم‌های آبی و خاکی می‌گردند، ورود داروهای ضد سرطان به محیط‌زیست از خطر بسیار بالاتری برخوردار است. با توجه به قابلیت این داروها در مهار تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی، ورود آنان به محیط‌زیست نگرانی‌های بسیار جدی در زمینه سلامت موجودات زنده ایجاد می‌کند. این خطر به ویژه در مناطقی که چنین داروهایی تولید می‌گردند از اهمیت دو چندان برخوردار است (Heath et al., 2016; Jureczko & Kalka., 2020)

با توجه به تجربه‌های موفق به کارگیری میکروارگانیسم‌ها در حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی و با توجه به مقاومت ذاتی پروکاریوت‌ها در برابر داروهای ضد سرطان، به نظر می‌رسد استفاده از آنان در کاهش این گونه آلاینده‌ها رویکردی نوین و موفقیت‌آمیز باشد. بر این اساس، در این مطالعه به بررسی امکان جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالی‌پلاتین از پساب شرکت داروسازی سبحان انکولوژی و به کارگیری آنان در سیستم‌های تک و چندگونه‌ای در کاهش غلظت داروی مذکور پرداخته شد.

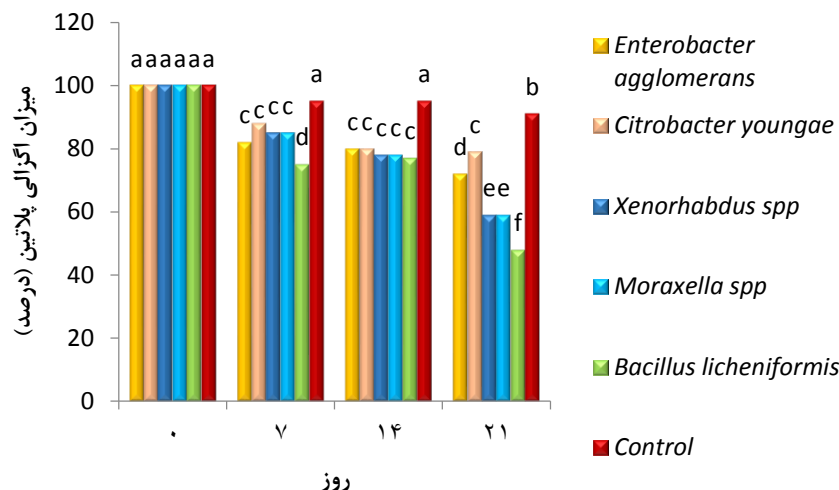
بر اساس نتایج آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و غربالگری تجزیه اگزالی‌پلاتین، در نهایت پنج گونه باکتریایی که دارای مقادیر MIC بالاتر از یک میلی‌لیتر گرم بر میلی‌لیتر بودند و قادر به رشد در محیط MSM حاوی اگزالی‌پلاتین به عنوان تنها منبع کربن بودند، به منظور انجام آزمایش‌های بعدی، خالص‌سازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، گونه‌های جداسازی شده شامل *Enterobacter agglomerans*، *Citrobacter youngae*، *Xenorhabdus spp*، *Bacillus licheniformis* و *Moraxella spp* بودند. ویژگی‌های بیوشیمیایی گونه‌های شناسایی شده در جدول شماره یک نمایش داده شده است.

نتایج این مطالعه در پایان دوره آزمایش نشان داد که تمامی گونه‌های شناسایی شده منجر به کاهش معنی‌دار غلظت دارو در مقایسه با تیمار کنترل شدند. در بین گونه‌های شناسایی شده، باکتری *B. licheniformis* دارای بالاترین قابلیت در کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین را داشت. به بیان دیگر، در پایان دوران آزمایش، این باکتری منجر به کاهش غلظت دارو تا ۵۲ درصد مقدار اولیه گردید که از این منظر اختلاف معنی‌داری را با سایر سویه‌ها نشان داد. همچنین گونه‌های *Xenorhabdus* و *Moraxella* با کاهش ۴۱ درصدی دارو عملکرد بهتری نسبت به دو باکتری دیگر داشتند. از سوی دیگر، باکتری *E. agglomerans* با کاهش ۲۱ درصدی دارو کمترین قابلیت تجزیه اگزالی‌پلاتین را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان داد. تصویر شماره یک قابلیت گونه‌های شناسایی شده در کاهش غلظت اگزالی‌پلاتین را نمایش می‌دهد.

جدول ۱. ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از پساب صنایع داروسازی

گونه باکتری	<i>E. agglomerans</i>	<i>C. youngae</i>	<i>Xenorhabdus spp</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>Moraxella spp</i>
لایزین دکربوکسیلاز	-	-	-	+	+
مصرف گلوکز	+	+	+	+	-
ONPG	+	+	-	+	-
VP	-	-	-	-	-
تجزیه ژلاتین	+	-	+	+	-
مصرف سوربیتول	+	+	-	+	-
مصرف رافینوز	-	-	-	+	-
مصرف لاکتوز	-	-	-	nd	-
اورنیتین دکربوکسیلاز	-	-	-	nd	+
مصرف مانیتول	+	+	-	+	-
ایندول	+	-	-	-	-
مصرف سیترات	-	+	-	+	-
مصرف مالونات	+	-	-	nd	-
مصرف رامنوز	+	+	-	+	-
مصرف آرابینوز	-	+	-	+	-
مصرف سالیسین	-	-	-	+	-
تولید H ₂ S	-	+	-	nd	-
مصرف زایلوز	+	+	-	+	-
هیدرولیز اوره	+	+	-	nd	+
تریپتوفان دامیناز	+	-	+	nd	+
مصرف اینوزیتول	+	-	-	+	-
مصرف سوکروز	-	+	-	+	-
مصرف آدونیتول	-	-	-	-	-
آرزنین دهیدرولاز	-	+	-	+	+
حرکت	+	+	+	-	+
اکسیداز	-	-	-	+	+
احیاء نیترات	nd	nd	nd	+	+

nd: تعیین نشده



شکل ۱. تغییرات غلظت داروی اگزالی پلاتین با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده در مدت ۲۱ روز. حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار است ($p < 0.05$).

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *B. licheniformis* جداسازی شده از پساب دارویی قابلیت مناسبی در کاهش غلظت داروی اگزالی پلاتین دارد و منجر به کاهش غلظت دارو به میزان ۵۲ درصد شد. توانایی گونه‌های مختلف باسیلوس در کاهش یا حذف ترکیبات دارویی از پساب در مطالعات پیشین گزارش شده است. *Grandclément* و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که گونه *B. subtilis* در کشت هم‌زمان با *Brevibacillus Laterosporus* منجر به حذف کامل داروی دیکلوفناک شدند (*Grandclément et al.* 2020). علاوه بر این، شواهدی مبنی بر استفاده از گونه‌های باکتریایی در حذف داروهای ضد سرطان نیز موجود است. *Westman* و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که گونه‌های اکتینوماست به طرز چشمگیری قادر به تجزیه داروی ضد سرطانی دوکسوروبیسین شدند. آنان پیشنهاد کردند که فرایند تجزیه میکروبی دارو از طریق مکانیسم گلیکوزیلاسیون اولیه رخ می‌دهد (*Westman et al.* 2012). در مطالعه حاضر، باکتری *B. licheniformis* به‌طور چشمگیری منجر به کاهش غلظت داروی اگزالی پلاتین گردید. به نظر می‌رسد که گونه‌های باسیلوس به دلیل مقاومت و پایداری بالا و همچنین فعالیت آنزیمی قوی می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت حذف بیولوژیک آلاینده‌های ضد سرطانی در نظر گرفته شوند. اگرچه انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. بر اساس نتایج آزمایش قابلیت تجزیه اگزالی پلاتین توسط هر سویه، در نهایت چهار تیمار ترکیبی متشکل از سه گونه مختلف مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل،

تیمار یک (*B. licheniformis* + *Moraxella spp* + *Xenorhabdus spp*)

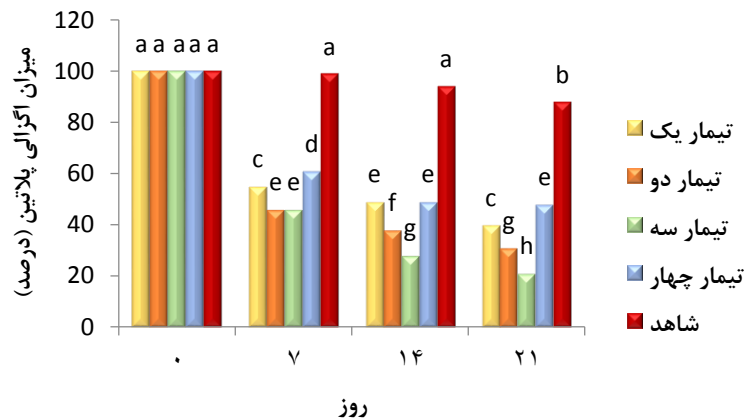
تیمار دو (*B. licheniformis* + *Moraxella spp* + *E. agglomerans*)

تیمار سه (*B. licheniformis* + *Xenorhabdus spp* + *E. agglomerans*)

تیمار چهار (*B. licheniformis* + *C. youngae* + *E. agglomerans*)

تیمار پنج (شاهد فاقد باکتری) بودند.

بر اساس نتایج، بیشترین میزان کاهش دارو در تیمار شماره سه مشاهده گردید. غلظت دارو در یک هفته نخست با کاهشی ۵۴ درصدی مواجه گردید و سپس روند کاهشی با شیب ملایم‌تری ادامه یافت و در پایان دوران مطالعه غلظت نهایی اگزالی پلاتین به میزان ۷۹ درصد کاهش یافت. همچنین، تیمارهای شماره دو و یک با کاهش به ترتیب ۶۹ و ۶۰ درصدی نسبت به تیمار شماره چهار عملکرد بهتری را نشان دادند. لازم به ذکر است که بیشترین میزان کاهش غلظت دارو در همه تیمارهای مورد مطالعه در هفت روز نخست مشاهده شد و تیمارهای شماره دو و سه با کاهش ۵۴ درصدی در یک هفته، بهترین عملکرد را نشان دادند. بررسی تغییرات غلظت دارو در تیمار کنترل نیز نشان‌دهنده تغییرات جزئی به میزان ۱۲ درصد در پایان زمان مطالعه داشت که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. نتایج تغییرات غلظت دارو در تیمارهای مورد مطالعه در تصویر شماره ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲. تغییرات غلظت داروی اگزالی پلاتین در تیمارهای حاوی ترکیب جمعیتی چندگونه‌ای از باکتری‌های جداسازی شده در

مدت ۲۱ روز. تیمار یک: *B. licheniformis* + *Moraxella spp* + *Xenorhabdus spp*; تیمار دو: *B. licheniformis* + *Moraxella spp* + *E. agglomerans*

E. agglomerans; تیمار سه: *B. licheniformis* + *Xenorhabdus spp* + *E. agglomerans* و تیمار چهار: *B. licheniformis* + *C. youngae* + *E. agglomerans*

E. agglomerans حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار است ($p < 0.05$).

نتایج این مطالعه نشان داد که به‌کارگیری گونه‌های جداسازی شده در قالب یک جمعیت چندگونه‌ای منجر به بهبود راندمان حذف دارو گردید. به نظر می‌رسد که طی فرایند کشت هم‌زمان فرایندهای ترانسفورماسیون و فعال‌سازی دارو و به دنبال آن شکسته شدن پیوندهای اولیه به طرز مؤثرتری صورت پذیرد و این امر منجر به قرارگیری سایت‌های هدف دارو در برابر آنزیم‌های تولیدشده توسط تمامی گونه‌ها گردد. مطابق با این فرضیه، Yan و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای در زمینه غیرفعال‌سازی دوروکسوبیسین نشان دادند که باکتری *Raoultella planticola* در گام نخست از طریق یک مسیر گلیکوزیلاسیون احیایی منجر به گلیکوزیلاسیون دارو و تبدیل آن به 7-deoxydoxorubicinol و 7-deoxydoxorubicinolone شد و متابولیت‌های حاصله نیز توسط باکتری‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* به طریق آنزیمی حذف گردیدند (Yan et al. 2018). با توجه به نتایج حاضر، به نظر می‌رسد فرایند حذف داروی اگزالی‌پلاتین توسط جمعیت‌های چندگونه‌ای در چند مرحله و با به‌کارگیری آنزیم‌های متعدد میکروبی صورت می‌پذیرد. اگرچه، انجام مطالعات بیشتر در آینده به‌منظور ردیابی و شناسایی متابولیت‌های حاصله، آنزیم‌های مؤثر و پیش‌بینی مسیر متابولیکی تجزیه دارو ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه برای اولین بار جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده داروی اگزالی‌پلاتین از پساب دارویی، و قابلیت آنان در قالب سیستم‌های تک و چندگونه‌ای در جهت حذف داروی اگزالی‌پلاتین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از مخلوط جمعیتی شامل *E. Agglomerans* و *B. licheniformis*, *Xenorhabdus spp* می‌تواند منجر به کاهش غلظت دارو تا ۷۹ درصد شود. بر اساس این نتایج، استفاده از گونه‌های باکتریایی جداسازی شده می‌تواند به‌عنوان رویکرد نوین و آینده‌داری در زمینه حذف آلاینده اگزالی‌پلاتین از پساب دارویی و بیمارستانی مدنظر قرار گیرد. اگرچه انجام مطالعات تکمیلی و شناسایی مسیرهای متابولیکی تجزیه دارو ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

- Cristóvão. M.B., Janssens. R., Yadav. A., Pandey. S., Luis. P., Van der Bruggen. B., Dubey. K.K., Mandal. M.K., Crespo. J.G. and Pereira. V.J. (2020). Predicted concentrations of anticancer drugs in the aquatic environment: What should we monitor and where should we treat? *Journal of hazardous materials* 392 (122330). Doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122330

- Fonseca. T.G., Morais. M.B., Rocha. T., Abessa. D.M.S., Aureliano. M. and Bebianno. M.J. (2017). Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Science of the Total Environment* 575:162-172. Doi: [10.1016/j.scitotenv.2016.09.185](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.185)
- Gautam. A.K., Kumar. S., Sabumon. P. (2007). Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environment Managment* 83(3):672 298-306. Doi: [10.1016/j.jenvman.2006.03.009](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.009)
- Ghafuria. Y., Yunesian. M., Nabizadeh. R., Mesdaghinia. A., Dehghani. M.H. and Alimohammadi. M. (2018). Environmental risk assessment of platinum cytotoxic drugs: a focus on toxicity characterization of hospital effluents. *International Journal of Environmental Science and Technology* 15(9):1983-1990. Doi: [10.1007/s13762-017-1517-6](https://doi.org/10.1007/s13762-017-1517-6)
- Grandclément. C., Piram. A., Petit. M. E., Seyssiecq. I., Laffont-Schwob. I., Vanot. G., ... and Doumenq. P. (2020). Biological removal and fate assessment of diclofenac using *Bacillus subtilis* and *brevibacillus laterosporus* strains and ecotoxicological effects of diclofenac and 4'-Hydroxy-diclofenac. *Journal of Chemistry*, 2020.
- Heath. E., Filipič. M., Kosjek. T. and Isidori. M. (2016). Fate and effects of the residues of anticancer drugs in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 14687–14691. Doi: [10.1007/s11356-016-7069-3](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7069-3)
- Jureczko. M., and Kalka. J. (2020). Cytostatic pharmaceuticals as water contaminants. *European journal of pharmacology* 866:172816. Doi: [10.1016/j.ejphar.2019.172816](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172816)
- Kaya. Y., Bacaksiz. A.M., Bayrak. H., Gönder. Z.B., Vergili. I., Hasar. H. and Yilmaz. G. (2017). Treatment of chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in an ozonation-anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) system. *Chemical Engineering Journal* 322:293-301. Doi: [10.1016/j.cej.2017.03.154](https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.154)
- Knopp. G., Prasse. C., Ternes. T.A. and Cornel. P. (2016). Elimination of micropollutants and transformation products from a wastewater treatment plant effluent through pilot scale ozonation followed by various activated carbon and biological filters. *Water Resource* 100:580-592. Doi: [10.1016/j.watres.2016.04.069](https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.069)
- Konate. A., Poupon. J., Villa. A., Garnier. R., Hasni-Pichard. H., Mezzaroba. D., Fernandez. G. and Pocard. M. (2011). Evaluation of environmental contamination by platinum and exposure risks for healthcare workers during a heated intraperitoneal perioperative chemotherapy (HIPEC) procedure. *Journal of Surgical Oncology* 103(1):6-9. Doi: [10.1002/jso.21740](https://doi.org/10.1002/jso.21740)
- Mulamattathil. S. G., Bezuidenhout. C., Mbewe, M., and Ateba, C. N. (2014). Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in Mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. *Journal of pathogens*, 2014.
- Westman. E.L., Canova. M.J., Radhi. I.J., Koteva. K., Kireeva. I., Waglechner. N., and Wright. G.D. (2012). Bacterial inactivation of the anticancer drug doxorubicin. *Chemical Biology* 19(10):1255-1264. Doi: [10.1016/j.chembiol.2012.08.011](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.08.011)
- Yan, A., Culp, E., Perry, J., Lau, J. T., MacNeil, L. T., Surette, M. G., & Wright, G. D. (2018). Transformation of the anticancer drug doxorubicin in the human gut microbiome. *ACS infectious diseases*, 4(1), 68-76.

- Zamani. H., Rakhshae. R., and Garakoui. S.R. (2018). Two contrary roles of Fe₃O₄ nanoparticles on kinetic and thermodynamic of Paclitaxel degradation by *Citrobacter amalonaticus* Rashtia immobilized on sodium alginate gel beads. *Journal of Hazardous Materials* 344:566-575. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.061
- Zhang. L., Hu. J., Zhu. R., Zhou. Q., and Chen. J. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(8):3687-3698. Doi: 10.1007/s00253-012-4170-5

Isolation of oxaliplatin degrading bacteria from pharmaceutical wastewater and using them in drug removal by single and multi-species bacterial population

S. R. Garakoui,*Kh. Issazade, H. Zamani, R. Rakhshae, M. Shahriarinour

Abstract

Introduction: Exploring bacterial cells, as prokaryotic organisms, could be a novel approach for the removal of these compounds. Therefore, in this study, we aimed to isolate and identify oxaliplatin degrading bacteria from pharmaceutical wastewater samples and to evaluate their oxaliplatin removal potential as single and multi-species systems. **Materials and Methods:** Bacterial isolation was performed using the membrane filtration method and the inhibitory effect of the drug for the isolated bacteria was evaluated in 96-well plates. Finally, oxaliplatin removal efficacy of the single and multi-species bacterial populations was determined using the High-Pressure Liquid chromatography (HPLC). **Results:** A total number of five bacterial species, including *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter youngae*, *Xenorhabdus spp.*, *Bacillus licheniformis* and *Moraxella spp.* able to degrade oxaliplatin were isolated. The highest and least oxaliplatin degrading potential was observed for *B. licheniformis* (52%) and *E. agglomerans* (21%), respectively. Also, the multi-species treatment containing *B. licheniformis*, *Xenorhabdus spp.*, *E. agglomerans* showed the highest oxaliplatin removal efficacy (79%).

Conclusion: This work reveals that the bacteria isolated from pharmaceutical effluents could be employed for oxaliplatin removal and could be considered as a novel approach for the reduction of pharmaceutical pollutants.

Keywords: anticancer drugs; bioremediation; HPLC; microbial degradation

کاربرد روش ISSR در شناسایی سیستماتیک و تفکیک جمعیت های گونه

Aspergillus flavus

امیرعباس مینایی فر^{۱*}

چکیده

مقدمه: روش های مرسوم شناسایی بر اساس صفات ریخت شناسی هرچند در شناسایی گونه های مختلف آسپرژیلوس کارایی قابل قبولی دارند اما در تشخیص نژادها و جمعیت های گونه های این جنس عموماً ناکارآمد هستند. این موضوع در مورد شناسایی جمعیت های *Aspergillus flavus* که یکی از گونه های بسیار مهم این جنس در زمینه های اقتصادی، بهداشتی است نیز صدق می کند.

مواد و روش: در این تحقیق جمعیت های این گونه که از پنج محصول خشکباری کشور بدست آمده بودند بر اساس صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند، علاوه بر این، از بیست پرایمر استاندارد شده بر اساس روش Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) برای بررسی جمعیت های این گونه استفاده شد.

نتایج و بحث: آنالیزهای چند متغیره بر اساس یافته های ISSR نشان می دهد با استفاده از این روش می توان جمعیت های مختلف *Aspergillus flavus* جدا شده از میزبان های مختلف و مناطق مختلف را از یکدیگر تشخیص داد.

واژه های کلیدی: *Aspergillus flavus* خشکبار، ISSR، ریخت شناسی

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران *نویسنده مسئول: aaminaeifar@pnu.ac.ir

مقدمه

آسپرژیلوس یکی از قارچ‌های ناقص است که اولین بار توسط میچلی در سال ۱۷۲۹ توصیف شده است (Alexopoulos et al., 1996). این قارچ با دارا بودن حدود ۱۵۰ گونه شناخته شده که برخی نیز دارای واریته می‌باشند از گسترش جهانی برخوردارند، گونه‌های مختلف آسپرژیلوس با داشتن میزبان‌های متعدد و متفاوت از بعضی جهات به عنوان قارچی مفید و از جهاتی دیگر به عنوان یک قارچ مضر شناخته می‌شود (Klich & Pitt, 1988). اکثر گونه‌های این جنس کپک‌های ساپروفیتی هستند که توان استفاده از بقایای آلی و بازیافت نیتروژن و کربن را دارند که از این ویژگی بطور گسترده در صنایع غذایی تخمیری استفاده می‌شود. اما برخی از گونه‌های این جنس جزو قارچ‌های فرصت طلب بوده و می‌توانند باعث بروز بیماری‌های خطرناکی مانند آسپرژیلوزیس شوند. همچنین بعضی از گونه‌های *Aspergillus* قادر به تولید میکوتوکسین‌های مسموم کننده و سرطان زا مانند آفلاتوکسین هستند که هر ساله خسارات فراوانی را به محصولات کشاورزی وارد نموده و برای سلامت انسان نیز خطرناک اند (Yu et al., 2005; Shabab et al., 2011).

در بین گونه‌های متعدد آسپرژیلوس، *Aspergillus flavus* یکی از مهمترین و تاثیر گذارترین گونه‌های این جنس است. این قارچ با قدرت تکثیر بالا و تعدد میزبان‌های مختلف و همچنین توان تولید سم آفلاتوکسین یکی از رایج ترین گونه‌های این جنس است (Balali et al., 2010). به دلیل اهمیت این قارچ در زندگی انسان چه از جنبه‌های مثبت و چه از جنبه‌های منفی آن، شناسایی گونه‌های مختلف این قارچ حائز اهمیت است. بطور معمول برای تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس از مشخصات ظاهری از جمله صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ و میزان رشد کلنی و صفات میکروسکوپی مانند ریخت‌شناسی ظاهری و اندازه-گیری وزیکول، کونیدی، کونیدیوفور، فیالید (Phialide) و متولا (Metula) استفاده می‌شود (Rapper & Fennell, 1975). گونه‌های آسپرژیلوس دارای تغییر پذیری ظاهری وابسته به شرایط محیط رشد هستند به علاوه صفات ریخت‌شناسی معرفی شده برای گونه‌های مختلف از لحاظ اندازه و حالت همپوشانی و شباهت‌های بسیار زیادی بهم دارند (Kich & Pitt, 1988). همچنین برای تمایز گونه‌های این قارچ نیاز به شرایط کنترل شده و محیط‌های کشت استاندارد مختلفی است که هزینه بر و وقت گیر است و در نهایت از دقت بالایی نیز برخوردار نیست خصوصاً در تشخیص واریته‌های آسپرژیلوس. به همین دلیل از ابتدای شناسایی این قارچ کلیدهای شناسایی متعددی ارائه گردیده که هر یک دارای ابهاماتی است (Rapper & Fennell, 1975). نیاز به صرف وقت زیاد جهت تهیه محیط‌های کشت استاندارد برای داشتن کلیه ویژگی‌ها و کاهش تاثیر عوامل محیطی، ناپایداری برخی از صفات و همپوشانی بسیاری از ویژگی‌های بین گونه‌های مختلف این قارچ، همچنین عدم توانایی کافی روش‌های ریخت‌شناسی در تشخیص و تعیین واریته‌های آسپرژیلوس سبب شده است که کوشش‌هایی جهت شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌های این قارچ با کمک روش‌های مولکولی صورت گیرد، بطور مثال می‌توان به استفاده از تکنیک‌های RFLP (Zhu et al., 2011)، RAPD (Patricia et al., 2003)، SSR (Jia et al., 2011)، AFLP (Liu et al., 2010) و ISSR (Zhang et al., 2013) اشاره کرد. همانطور که گفته شد روش‌های شناسایی بر مبنای صفات ریخت‌شناسی است هرچند در برخی از موارد خصوصاً در تشخیص بین گونه‌ای روش‌هایی به نسبت کارآمد، ارزان و قابل اتکا هستند اما در تشخیص تنوعات و اختلاف بین واریته‌های آسپرژیلوس عموماً ناکارآمد بوده و صفات ریخت‌شناسی در این خصوص به عنوان صفات افتراقی مطلوب تلقی نمی‌شود. از اینرو استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت تشخیص یا تفکیک بین واریته‌ها مورد استقبال قرار گرفته است (Batista et al., 2008). هدف از این

تحقیق، تعیین تنوعات درون گونه‌ای این قارچ در ایران و همچنین سنجش و بررسی ارتباط تنوعات جمعیتی این گونه با شرایط اقلیمی در سطح کشور است.

مواد و روش

در این تحقیق برای شناسایی و بررسی تنوعات درون گونه ای بین جمعیت‌های *Aspergillus flavus* جدا شده از تعدادی از محصولات خشکباری پرمصرف داخل کشور شامل بادام زمینی، توت خشک، انجیر خشک، پسته و بادام است که از مراکز اصلی تولید آنها در مناطق زراعی شهرستان‌های آستانه اشرفیه، تفت، استهبان، رفسنجان و بوانات نمونه برداری شده است، علاوه بر روش ریخت‌شناسی بر اساس صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی معمول از روش مولکولی ISSR نیز استفاده شد. در ابتدا از مراکز اصلی و عمده تولید و عرضه هریک از محصولات خشکباری نمونه تهیه شد، سپس در آزمایشگاه نسبت به کشت اولیه و جدا سازی آسپرژیلوس‌های موجود در نمونه ها اقدام شد، پس از خالص سازی آسپرژیلوس‌ها، جهت شناسایی دقیقتر گونه‌ها، نمونه‌های خالص شده به محیط‌های کشت MEA, CYA و CY20S انتقال داده شده و پس از گذشت یک هفته اقدام به اندازه‌گیری و مطالعه ریخت‌شناسی و ثبت اطلاعات آنها براساس روش کلیچ و پیت مبادرت شد (Klich & pitt, 1988)، برای آنالیز نتایج حاصل از اندازه گیری‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی از نرم افزار SPSS Ver. 20 استفاده شد. در بخش مطالعه مولکولی این تحقیق برای استخراج DNA از روش ژانگ استفاده شد (Zhang et al., 2013)، پرایمرهای مناسب، شرایط و نسبت محتوای ترکیبات PCR برای انجام مطالعه ISSR بنابر مطالعات و تحقیقات پیشین (Zhang et al., 2013; Al-Wadai et al., 2019; Salim et al., 2019) با اندکی تغییر بهینه سازی شدند (جدول ۱، ۲ و ۳). محصول حاصل از فرایند PCR با استفاده از جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه روی ژل آگارز ۱.۵٪ (W/V) در محلول TAE بافر (X ۱) ران شد. برای مشخص شدن تصویر باندها بر اثر تابش UV در دستگاه ژل داک از اتیدیوم بروماید استفاده شد. همچنین برای تعیین شاخص Ladder 100 bp بکار گرفته شده است. برای غربالگری باندهای حاصله از ژل ها تصویر گرفته و حضور باند (۱) و نبود باند (۰) در نظر گرفته شد. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده و انجام آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و تعیین پارامترهای تنوع ژنتیکی از نرم افزار GenAlex 6.4 استفاده شد. برای انجام آنالیزهای خوشه بندی و تجزیه به مولفه‌های اصلی نتایج بدست آمده از غربالگری باندها و همچنین سنجش ارتباط عوامل اقلیمی و آنالیز CCA از نرم افزار PAST ver. 2.17 استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتیجه حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه در نرم افزار SPSS اختلاف معنی داری بین صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی (جدول ۴) واریته‌های جدا شده از منابع مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$)، بنابراین از انجام آزمون‌های تعقیبی دانکن و یا توکی و همچنین آنالیزهای چند متغیره نیز صرف نظر شد. نتایج بدست آمده از مطالعه ISSR نشان می‌دهد که در غربالگری اولیه، در مجموع از بیست پرایمر انتخاب شده، ۱۵۳ باند با ۷۶ درصد پلی‌مورفی حاصل شد. پرایمر ۸۳۴، با تولید ۱۲ باند بیش از سایر پرایمرها باند ایجاد نموده است. پس از آن پرایمرهای ۸۰۹ و ۸۱۷ با ۱۰ باند و پرایمرهای ۸۰۸، ۸۹۵ و ۸۹۹ با ۹ باند قرار دارند. همچنین پرایمرهای ۸۹۵، ۸۸۵، ۸۳۵، ۸۱۷ و ۹۰۰ بیشترین پلی‌مورفیسم و پرایمرهای ۸۰۷ و ۸۸۰ کمترین پلی‌مورفیسم را

نشان دادند (جدول ۵). آنالیز اطلاعات بدست آمده از روش ISSR در نرم افزار GenAlex نشان دهنده وجود تنوع درون جمعیتی برابر با ۳۱ درصد و تنوع بین جمعیتی برابر با ۶۹ درصد است. آنالیز خوشه بندی انجام شده بر اساس UPGMA در نرم افزار PAST نشان دهنده سه خوشه مجزا است. جمعیت *Aspergillus flavus* جدا شده از بادام زمینی آستانه اشرفیه در خوشه اول، جمعیت جدا شده از بادام یوانات در خوشه بعدی و خوشه سوم در برگیرنده سه زیر خوشه پسته رفسنجان، توت خشک تفت و انجیر خشک استهبان است (شکل ۱). در آنالیز PCoA بر اساس مولفه های اصلی نیز قرابت بیشتر جدایه های خالص شده از پسته، توت و انجیر نسبت به جدایه های خالص شده از بادام زمینی و بادام مشهود است (شکل ۲). در آنالیز CCA عوامل زیست محیطی مناطق زراعی که نمونه برداری از آنها انجام شده شامل میانگین دمای سالانه، میانگین بارندگی سالانه، ارتفاع و عرض جغرافیایی نیز علاوه بر نتایج حاصل از ISSR مورد سنجش قرار گرفته و در محاسبات لحاظ می شوند که بر این اساس نتیجه حاصل از CCA نیز در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این آنالیز هم موید جدایی جمعیت های خالص شده از پسته، توت خشک و انجیر از جمعیت بادام و بادام زمینی است.

جدول ۱، پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (طراحی شده توسط دانشگاه بریتیش کلمبیا)

کد پرایمر	توالی (۵' به ۳')
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 873	GAC AGA CAG ACA GAC A
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
UBC 895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC
UBC 899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC ACT TCC
UBC 900	CCA CAG GTT AAC ACA

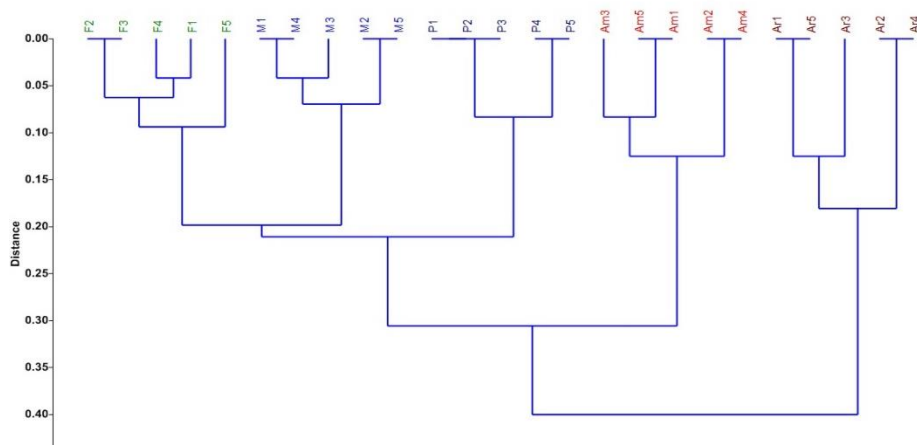
*: R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T), H = (A, C, T), V = (A, C, G)

جدول ۲- مواد و حجم محلول ISSR-PCR مورد استفاده

ماده	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر استریل	۱۶/۳
بافر (10 X)	۲
MgCl ₂	۱/۵
dNTP	۱
پرایمر	۱
Taq Polymerase	۰/۵

جدول ۳- برنامه دمایی ISSR-PCR مورد استفاده

مرحله PCR	شرایط تنظیم شده
واسرشت اولیه (First Denaturation)	۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
واسرشت (Denaturation)	۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
اتصال (Annealing)	۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد
توسعه (Extension)	۱،۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد
توسعه نهایی (Final Extension)	۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد



شکل ۱- آنالیز خوشه بندی جدایه های آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) بر اساس داده های ISSR

(Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک)

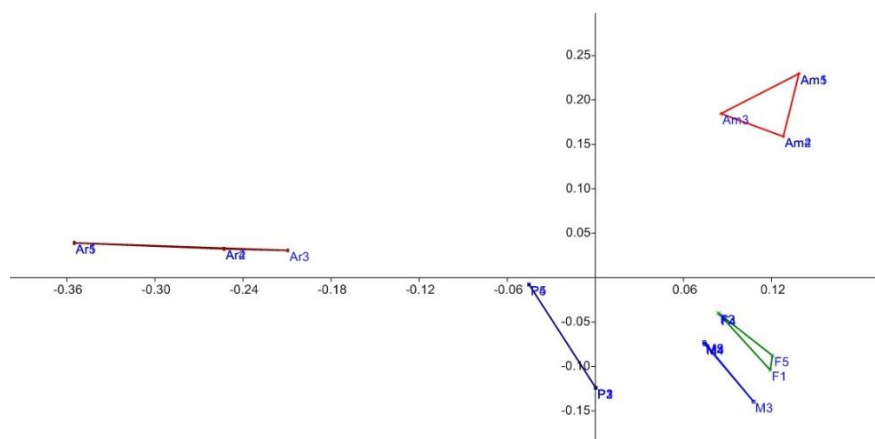
منبع جداسازی <i>A. flavus</i>	صفات میکروسکوپی													
	محیط کشت MEA													
	CYA محیط کشت						CY۲۰S محیط کشت							
	رنگ		قطر کلنی	رنگ		قطر کلنی	رنگ		قطر کلنی	رنگ		متوسط		
سطح	قطر	اندازه	متوسط	اندازه	متوسط	قطر	اندازه	متوسط	اندازه	متوسط	قطر	اندازه		
(mm)	(mm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(mm)	(mm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)		
سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین	سطح زیرین		
صاف	۱±۵	۴*۱۰	۵*۸	۹±۳۲	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۰	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۵	بادام/بوانات
صاف	۱±۵	۴*۱۰	۴*۹	۷±۳۴	بی رنگ	زیتونی	۱±۶۴	قهوه ای	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۴	بادام/بوانات
صاف	۱±۵	۳*۱۰	۶*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۶	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۷	بادام/بوانات
صاف	۱±۵	۳*۱۰	۵*۹	۶±۳۴	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۴	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۶	بادام/بوانات
صاف	۱±۵	۴*۱۰	۵*۸	۶±۳۷	بی رنگ	زیتونی	۱±۶۷	قهوه ای	زیتونی - سبز	۲±۶۵	قهوه ای	زیتونی - سبز	۲±۶۵	بادام/بوانات
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۷	۴±۳۷	قهوه ای	زیتونی - زرد	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۸	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۸	بادام زمینی/آستانه
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۶±۳۴	بی رنگ	زیتونی - سبز	۳±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۶	بی رنگ	زیتونی - سبز	۳±۶۵	بادام زمینی/آستانه
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	قهوه ای	زیتونی	۵±۶۲	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۴	بادام زمینی/آستانه
صاف	۵±۱	۴*۱۱	۴*۹	۶±۳۶	قهوه ای	زیتونی	۵±۶۳	بی رنگ	زیتونی - سبز	۵±۶۵	قهوه ای	زیتونی - سبز	۴±۶۵	بادام زمینی/آستانه
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۷	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۴±۶۳	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	بادام زمینی/آستانه
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۶	۴±۳۶	قهوه ای	زیتونی - زرد	۲±۶۶	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۷	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۴	پسته/رفسنجان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۷	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۵	پسته/رفسنجان
صاف	۵±۱	۳*۹	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۶	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۴±۶۵	پسته/رفسنجان

صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۶	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	پسته/رفسنجان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۴±۶۵	پسته/رفسنجان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۴	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۳	قهوه ای	زیتونی - سبز	۵±۶۷	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۸	توت خشک/ تفت
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۴±۳۵	قهوه ای	زیتونی	۲±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۷	قهوه ای	زیتونی - سبز	۴±۶۵	توت خشک/ تفت
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۳±۶۶	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	توت خشک/ تفت
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۶±۳۶	قهوه ای	زیتونی	۳±۶۶	قهوه ای	زیتونی	۳±۶۸	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۵	توت خشک/ تفت
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی - زرد	۴±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۵±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۴±۶۷	توت خشک/ تفت
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۶	بی رنگ	زیتونی	۵±۶۴	قهوه ای	زیتونی - سبز	۵±۶۷	قهوه ای	زیتونی - سبز	۴±۶۸	انجیر خشک/ استهبان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	قهوه ای	زیتونی - زرد	۴±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۵±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۷	انجیر خشک/ استهبان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۵±۳۵	بی رنگ	زیتونی	۲±۶۵	بی رنگ	زیتونی - سبز	۴±۶۷	بی رنگ	زیتونی - سبز	۲±۶۶	انجیر خشک/ استهبان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۷	۶±۳۵	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۶	قهوه ای	زیتونی	۴±۶۸	قهوه ای	زیتونی - سبز	۴±۶۵	انجیر خشک/ استهبان
صاف	۵±۱	۴*۱۰	۵*۸	۶±۳۵	بی رنگ	زیتونی - زرد	۵±۶۵	بی رنگ	زیتونی	۵±۶۶	قهوه ای	زیتونی	۲±۶۷	انجیر خشک/ استهبان

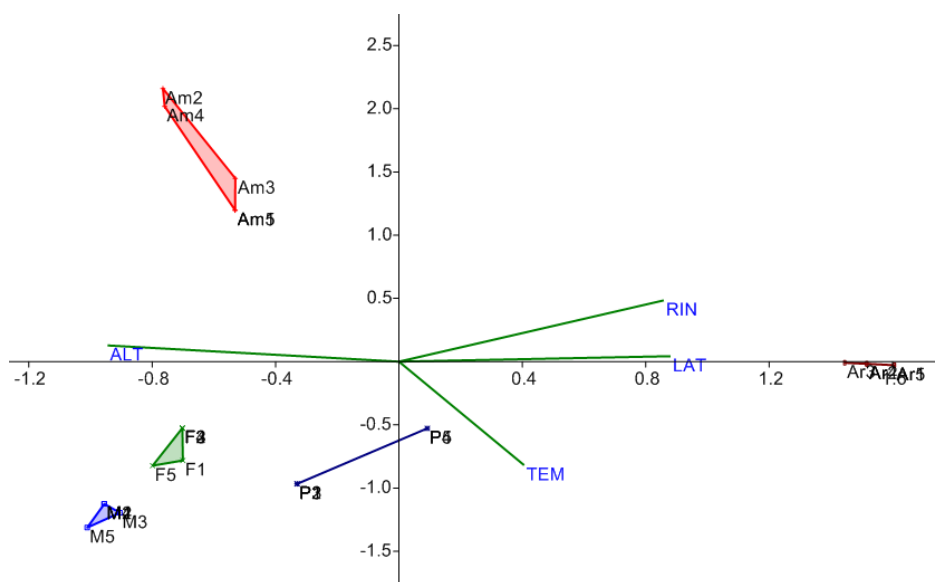
جدول ۴- صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطالعه شده

جدول ۵- تعداد باند و تعداد باندهای پلی مورف تشکیل شده توسط پرایمرهای مورد استفاده

کد پرایمر	تعداد باند	تعداد باند پلی مورف	در صد باند پلی مورف
UBC 807	۶	۳	%۵۰
UBC 808	۹	۵	%۵۵
UBC 809	۱۰	۶	%۶۰
UBC 811	۸	۷	%۸۷,۵
UBC 817	۱۰	۱۰	%۱۰۰
UBC 825	۸	۷	%۸۷,۵
UBC 826	۷	۶	%۸۵,۷
UBC 834	۱۲	۱۰	%۸۳,۳
UBC 835	۸	۸	%۱۰۰
UBC 847	۶	۴	%۶۶,۶
UBC 856	۷	۴	%۵۷,۱
UBC 864	۷	۵	%۷۱,۴
UBC 873	۶	۴	%۶۶,۶
UBC 880	۸	۴	%۵۰
UBC 881	۶	۴	%۶۶,۶
UBC 885	۵	۵	%۱۰۰
UBC 891	۸	۴	%۸۷,۵
UBC 895	۹	۹	%۱۰۰
UBC 899	۹	۸	%۸۸,۸
UBC 900	۴	۴	%۱۰۰



شکل ۲- آنالیز مولفه‌های اصلی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) بر اساس داده‌های ISSR (Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک)



شکل ۳- آنالیز CCA جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) بر اساس داده‌های ISSR و داده‌های محیطی (Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک، ALT: ارتفاع از سطح دریا، LAT: عرض جغرافیایی منطقه، RIN: متوسط بارندگی و TEM: متوسط دما)

بحث

استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی در شناسایی قارچ‌های ساپروفیت هرچند به دلیل سهولت نسبی مطالعه، تفکیک و شناسایی قابل قبول گونه‌ها و قیمت کمتر همچنان رایج و مورد استفاده هستند اما عموماً توانایی تشخیص جمعیت‌های یک گونه را ندارند به نحوی که با استفاده از این روش‌ها امکان شناسایی و تفکیک افراد متعلق به یک گونه که از میزبان‌های مختلف جدا شده یا در شرایط اقلیمی متفاوتی رشد نموده‌اند وجود ندارد (Kumeda & Asao 1996)، نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپی و ماکروسکوپی صورت گرفته در این تحقیق نیز موید این مطلب است به نحوی که هرچند با استفاده از محیط‌های کشت تخصصی و استفاده از کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی امکان شناسایی و جداسازی گونه *A. flavus* از سایر گونه‌ها فراهم آمد، اما بدلیل تشابه زیاد صفات ریخت‌شناسی افراد این گونه و نبود تفاوت معنی‌دار بین آنها همانطور که در بخش نتایج اشاره شد امکان تفکیک جمعیت‌های این گونه با استفاده از این صفات میسر نشد ($P > 0.05$)، بنابراین هرچند از صفات ریخت‌شناسی در تفکیک بین گونه‌ها در جنس آسپرژیلوس می‌توان استفاده نمود، اما این روش برای شناسایی و تفکیک جمعیت‌های گونه *A. flavus* کارآمد نیست. تاکنون تحقیقات نسبتاً محدودی برای استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت شناسایی و تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌های *A. flavus* با استفاده از روش ISSR و سایر روش‌های مولکولی صورت گرفته است، به‌عنوان مثال Priyanka و همکاران با استفاده از روش ISSR برای شناسایی گونه‌های بخش *Flavi* از جنس آسپرژیلوس تلاش نموده‌اند (Priyanka et al., 2014)، Al-Wadai و همکاران برای تشخیص بین نژادهای *A. flavus* مولد آفات توکسین آلوده کننده گندم از روش ISSR و RAPD استفاده کرده‌اند (Al-Wadai et al., 2013)، همچنین Salim و همکاران در مطالعه بین گونه‌ای آسپرژیلوس از روش ISSR استفاده نموده‌اند (Salim et al., 2019). در مطالعه حاضر نیز از روش ISSR برای تعیین اختلافات و تشابهات جدایه‌های بدست آمده از محصولات خشکباری از مناطق مختلف استفاده شد. بر اساس آنالیز خوشه بندی UPGMA و آنالیز مولفه‌های اصلی، جمعیت‌های جدایه‌های بدست آمده از مناطق مختلف در سه دسته کلی تقسیم بندی شدند. گروه اول جدایه‌های حاصل از بادام زمینی منطقه آستانه اشرفیه در استان گیلان، گروه دوم جدایه‌های خالص شده از بادام منطقه بوانات استان فارس و گروه سوم جدایه‌های خالص سازی شده از پسته منطقه رفسنجان، توت از منطقه تفت استان یزد و انجیر از منطقه استهبان استان فارس می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص توانایی روش ISSR در تفکیک جمعیت‌های *A. flavus* بدست آمده از مناطق مختلف و میزبان‌های مختلف را اثبات می‌کند. هرچند تاکنون مطالعات بسیار محدودی در خصوص استفاده از روش ISSR برای شناسایی جمعیت‌های آسپرژیلوس انجام گرفته اما نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعه Zhang و همکاران و همچنین مطالعه محمود و همکاران مطابقت دارد (Zhang et al., 2013; Mahmoud et al., 2016). اگرچه نتایج تحقیقات Al-Wadai و همکاران قویاً نتایج این تحقیق را تایید نمی‌کند اما تاکید می‌نمایند که روش ISSR به نسبت روش RAPD از توانایی تفکیک بالاتری برای مطالعه بین جمعیت‌های *A. flavus* برخوردار است (Al-Wadai et al., 2013). بطور معمول در مطالعات مولکولی بین جمعیت گیاهان عالی جهت سنجش عوامل جغرافیایی مختلف موثر بر بروز اختلافات بین جمعیت‌ها از آنالیز CCA استفاده می‌شود (Minaeifar et al., 2015). اگرچه در مورد قارچ‌های ساپروفیت مانند گیاهان عالی عوامل اقلیمی ماکروکلیمایی به علت شرایط میکروکلیمایی تاثیر کمتری دارند (Minaeifar et al., 2016)، اما در این تحقیق با توجه به گستره

مناطق جغرافیایی و همچنین نمونه‌گیری مستقیم از محل‌های اصلی تولید محصولات خشکباری مورد مطالعه بلافاصله پس از برداشت و قبل از انبارشدن، آنالیز CCA بر اساس شرایط ماکروکلیمایی منطقی به نظر می‌رسید. از اینرو علاوه بر آنالیزهای معمول از این روش نیز در تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. بر اساس نتیجه این آنالیز، موثرترین عوامل اقلیمی در جدا افتادگی جمعیت خالص شده از بادام بوانات نسبت به سایر جمعیت‌ها، متوسط دمای سالانه (۱۰ درجه، کمترین دما در بین مناطق مورد مطالعه) و ارتفاع از سطح دریا (۲۱۵۰ متر، مرتفع‌ترین منطقه در بین مناطق مورد مطالعه) بوده است، موثرترین عوامل جدایی جمعیت‌های خالص شده از بادام‌زمینی منطقه آستانه اشرفیه از جمعیت بادام بوانات درجه حرارت و از سه جمعیت دیگر میزان بارندگی است. منطقه آستانه اشرفیه در بین مناطق بررسی شده بیشترین میزان متوسط بارندگی (۱۵۰۰ میلیمتر) و رطوبت نسبی را داراست در حالی که سه منطقه تفت (۱۲۰ میلیمتر)، استهبان (۱۴۵ میلیمتر) و رفسنجان (۱۳۵ میلیمتر) کمترین میزان متوسط بارندگی را در بین مناطق مورد بررسی دارد. در خصوص گروه سوم شامل جمعیت‌های جدا شده از انجیر استهبان، پسته رفسنجان و توت تفت، علیرغم اینکه از لحاظ ماکروکلیمایی مانند عرض جغرافیایی، ارتفاع منطقه از سطح دریا و میزان بارندگی بین منطقه رفسنجان از استان کرمان و منطقه استهبان از استان فارس قرابت بیشتری وجود دارد اما آنالیزهای PCOA و UPGMA بین جمعیت‌های جدا شده از انجیر استهبان و توت تفت تشابه بیشتری را نشان می‌دهد. بنظر می‌رسد در این خصوص تشابه ترکیبات و مواد مغذی میزان (توت و انجیر هر دو از خانواده Moraceae هستند) موثرتر از تشابه ماکروکلیمای اقلیمی باشد ضمن اینکه بادام زمینی از خانواده Fabaceae و بادام از خانواده Rosaceae هستند که شاید یکی دیگر از دلایل جدایی بیشتر این دو از سایر جمعیت‌های مطالعه شده در این تحقیق نیز به علت تفاوت ترکیبات و مواد مغذی آنها باشد. پیشنهاد می‌شود تحقیقات دقیق‌تری در این موضع صورت پذیرد چراکه در صورت وجود ارتباط معنی‌دار و قابل اثبات، می‌تواند افق جدیدی در شناسایی جمعیت‌های قارچی ایجاد نماید.

نتیجه گیری کلی:

از روش مولکولی ISSR می‌توان برای تعیین تنوعات درون گونه‌ای *Aspergillus flavus* استفاده کرد، با استفاده از این تکنیک می‌توان ضعف روش‌های معمول ریخت‌شناسی در تشخیص یا تفکیک جمعیت‌های این گونه را بر طرف نمود.

قدردانی:

از مراکز مختلف دانشگاه پیام نور که با در اختیار قرار دادن امکانات اسکان جهت نمونه‌برداری در فصول مناسب برداشت محصول در استان‌های گیلان، فارس، یزد و کرمان در انجام هرچه بهتر این تحقیق همراهی نموده‌اند قدردانی می‌گردد.

منابع

- Alexopoulos, C. J., Mins, C. W. and Blackwell, A. (1996). Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York, 742.
- Al-Wadai, A.S., Al-Othman, M.R., Mahmoud, M.A, Abd El-Aziz, A.R.M. (2013). Molecular characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of wheat grains from Saudi Arabia. Genetic and Molecular Research. 12(3): 335-352.
- Balali, G.R., Minaeifar, A.A. and Sharifnabi, B. (2010). Pectic zymogram variation and morphological identification of *Aspergillus* species. Rostaniha 11(2): 163-174. 163-174.
- Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S. and Lima, E.A., (2008). Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. Genetic and Molecular Research. 7(3): 706–717.
- Jia, X.D., Wang, T., Zhai, M., Li, Y.R., Guo, Z.R., (2011). Genetic diversity and identification of Chinese-Grown Pecan using ISSR and SSR markers. Molecules 16, 10078–10092.
- Klich, M. A. and Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs, N.S.W., 115.
- Kumeda, Y. and Asao, T. (1996). Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. Applied and Environmental Microbiology. 62(8): 2947-2952.
- Liu, W.D., Li, H.J., Bao, X.B., Gao, X.G., Li, Y.F., He, C.B., Liu, Z.J., (2010). Genetic differentiation between natural and Hatchery stocks of Japanese Scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) as revealed by AFLP analysis. International Journal of Molecular Sciences. 11(10): 3933–3941.
- Mahmoud, M.A., EL-Samawaty, A.M.A., Yassin, M.A. and AbdELAziz, A.R.M. (2016). Genetic diversity analysis of *Aspergillus flavus* isolates from plants and air by ISSR Markers. Genetic and Molecular Research. 15(2): 28-81.
- Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, B., (2015). Genetic and morphological diversity in *Cousinia tabrisiana* (Asteraceae) populations. Biologia 70, 328-338.
- Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, B., (2016). Biosystematic study in the genus *Cousinia* Cass. (Asteraceae), section *Cousinia* Biochemical Systematics and Ecology. Biochemical Systematics and Ecology 69. 252-260.
- Patricia, R.D., Chirlei, G.B., Vanessa, K.C., Welington, L.A., Azevedo, J.L., (2003). RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mycological Research. 107(9): 1069–1074.
- Priyanka, S.R., Uppalapati, S.R., Kingston, J.J., Murali, H.S. (2014). Development of ISSR-derived SCAR marker-targeted PCR for identification of *Aspergillus* section *Flavi* members. Letters in Applied Microbiology. 58: 414-422.
- Rapper, K. B. and Fennell, D. I. (1975). The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger, Huntington, New York, 686.
- Salim R., Aly, S., Abo-Sereh, N. Hathout, A. and Sabry, B. (2019). Molecular Identification and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Differentiation of Toxigenic *Aspergillus* Strains. Jordan Journal of Biological Sciences. 12(5): 609 – 616.

- Sahab, A.F., Aly, S.E., Nawar, L.S. and El-Faham, S.Y. (2011). Fungal occurrence in physic nut (*Jatropha curcas*) seeds during storage and possibility aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates. *Journal of American Science*.7(5): 11-516.
- Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C. and Bennett, J.W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana Micologia*. 22:194-202.
- Zhang, C., Xing, F., Selvaraj, J.N., and Yang, Q. (2013). The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. *Biochemical Systematics and Ecology*. 50: 147-153.
- Zhu, S., Bai, Y.J., Oya, M., Tanaka, K., Komatsu, K., Maruyama, T., Goda, Y., Kawasaki, T., Fujita, M. and Shibata, T. (2011). Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast intron sequence. *Food Chemistry*.129:1844–1850

Application of ISSR method in systematic identification and segregation of populations of *Aspergillus flavus*

A.A. Minaeifar^{1*}

Received: 19.06.2021

Accepted: 21.05.2022

Abstract:

Conventional morphological identification methods, although reasonably effective in identifying different species of *Aspergillus*, are generally ineffective in identifying the races and populations of *Aspergillus* species. It is also true about *Aspergillus flavus*, which is one of the most important *Aspergillus* species in Economic and health. In this study, in addition to morphological identification based on microscopic and macroscopic traits of *Aspergillus flavus* isolates from five dried fruit products, twenty standardized primers based on ISSR method were used to study the populations of this species. Statistical Multivariate analyzes based on ISSR findings show different populations from different sources and different locations of *Aspergillus flavus* can distinguished from each other by this method.

Key words: *Aspergillus flavus*, ISSR, Nuts, Morphology

¹ Associate Professor, Department of Biology. Payame Noor University, Tehran, Iran *Corresponding author: aaminaeifar@pnu.ac.ir

Content	page
1. Effects of <i>Heracleum persicum</i> and <i>Nigella sativa</i> L. alcoholic extracts on insulin amyloid formation K. Ahadi Amandi, S. A. Ghadami.....	18
2. Evaluation of nickel acumulation and tolerance by <i>Trifolium repens</i> L. in hydroponic culture S. Amir Ahmady, T. Asemaneh *, A. S. Javanmard	36
3. Molecular systematics and phylogeny of <i>Rutilus</i> s. str. (Teleostei: Leuciscidae) at the southern part of Caspian Sea	48
4. Investigation of the effect of altitude from the sea level on physical properties of <i>pistacia atlantica</i> seeds (Case study: of Sustan Reserves in West Azerbaijan province) G. Rahimzadeh*, R. Mirzaei Mola Ahmad	61
5. Comparative and combined toxicity of some microbial, chemical and botanical pesticides on <i>Haplothrips tritici</i> K. (Thysanoptera: Phlaeothripidae) in laboratory conditions F. Shokouhi-Nia, A. Mirshekar* and A. Khani.....	79
6. Effects of gamma irradiation on allergen compounds and lethality of bee venom in a hamster animal model P. Shawrang*, F. Abbasi, F. Tahoori, H. Askari	91
7. Effect of chilling stress on three commercial kiwifruit cultivars (Hayward, Golden and Red) Sh. Sedaghatthoor*, S. Kh. Abbasnia Zare, S. A. Sajjadi	107
8. Covalent Immobilization of <i>Lepidium draba</i> peroxidase recombinant on zinc metal-organic framework using glutaraldehyde S. Farhadi, A. Riahi-Madvar*, M. Mortazavi, G. Sargazi	125
9. Isolation of oxaliplatin degrading bacteria from pharmaceutical wastewater and using them in drug removal by single and multi-species bacterial population S. R. Garakoui,*Kh. Issazade, H. Zamani, R. Rakhshae, M. Shahriarinour	138
10. Application of ISSR method in systematic identification and segregation of populations of <i>Aspergillus flavus</i> A.A. Minaeifar*	152

Journal of Applied Biology

Summer 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. Hosseini, 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. Saboori, 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, Fatemeh Sanaei Kashanifar

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