

۱. بررسی پاسخ های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی کلپوره (*Teucrium polium* L.) به تنش خشکی زهرا توحیدی، حمید سبحانین،* امین باقی زاده
۲. روابط تکاملی ساختار دمین پروتئین ATAXIN-2 در گیاهان: بینش احتمالی دخالت این پروتئین در بومی سازی ترجمه در فرایند جنین زایی گیاه برنج (*Oryza sativa*) شادی حیدری، پیوند حیدری، بهارک حیدری*
۳. مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) بر باکتری های بیماری زای گیاهی (*زانتوموناس کامپستریس* و *سودوموناس سیرینگه*) و بیماری زای انسانی (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی*) مسعود حیدری زاده*، مهدیه همتی، مراحم آشنکرف
۴. تحلیلی انتقادی بر رابطه نظریه "ژن خدا" با ایمان گروهی غلامحسین خدری*، وحید عزیزی
۵. ارزیابی تأثیر پروبیوتیک Bio-Aqua® بر شاخص های رشد و بازماندگی، کیفیت لاشه ماهی، اندیس های خونی و بیوشیمیایی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و متغیرهای فیزیوشیمیایی آب محیط پرورش امید رمضان نژاد،* صابر وطن دوست،* رضا چنگیزی، حامد منوچهری، رضا صفری
۶. شناسایی و سنجش محتوای اسیدهای فنلی در قارچ های اندوفیت جدا شده از *Corylus avellana* L. نرجس محمدی بلکوتی، فائزه قناتی*، سعیده وزیری فر
۷. حفاظت طولانی مدت ژرم پلاسما از دانه های (*Panucum miliaceum* L.) بومی شمال غرب ایران مهدی کاکایی*، طیبه بساکی
۸. بررسی ترکیبات فنولی و خواص بیولوژیکی اندام های رویشی گیاه *Lepidium vesicarium* L. سعید ملانی*، مهناز اسلامی، مصطفی عبادی
۹. اثر سویه های آگروباکتریوم رایزوزنز بر القای ریشه مویین در ریزنمونه های مختلف گیاه یونجه الهه میرزایی دلبری، جعفر وطن دوست، متین جامی معینی*، عیسی کهن باغخیراتی
۱۰. جداسازی و شناسایی باکتری های اندوفیت ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) و بررسی تأثیر آن ها بر جوانه زنی بذر و رشد گیاه شیدا نظریور، مریم محمدی سیچانی*، منیره رنجبر

بسم الله الرحمن الرحيم
فصلنامه علمی مجله زیست شناسی کاربردی

پاییز 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 کونیگ 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 فارسی: خانم معصومه اصلان زاده

ویراستار انگلیسی: فاطمه صانعی کاشانی فر

چاپ و صحافی: انتشارات دانشگاه الزهرا (س)

ترتیب و انتشار: فصلنامه

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

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

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

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

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

وضعیت اعمال موارد:

محققان با رعایت سلامت و اصالت کامل نویسندگی در چهارچوب های اخلاق حرفه ای، مقالات علمی-پژوهشی خود را براساس نکات زیر تدوین و ارائه نمایند.

تعهدات:

- فقط در صورت هیأت علمی بودن (مربی پژوهشی، استادیار، دانشیار و استاد) اقدام به ارسال مقاله فرمایید.
- نشریه زیست‌شناسی کاربردی در برابر مقاله‌های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
- الزامیست نویسنده مسئول مقاله یکی از اعضاء محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها یا موسسات تحقیقاتی باشد. از این‌رو ایمیل نویسنده مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
- در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به‌عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
- مقاله قبلاً به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور همزمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
- تعهد نامه مطابق فرمت مجله ارسال شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی است این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد(ان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.

نگارش :

- مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرند.
- هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد که همراه عنوان و واژه‌های کلیدی انگلیسی در انتهای مقاله آورده شود.
- مقاله کامل دارای عنوان فارسی، نام و آدرس نویسندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه‌گیری کلی، سپاسگزاری(اختیاری)، منابع، عنوان، آدرس، چکیده انگلیسی و واژه‌های کلیدی انگلیسی می باشد.
- تمام نمودارها، نقشه‌ها و شکل‌ها رنگی باشند (سیاه و سفید نباشند). زیرنویس و توضیحات مربوط به شکل‌ها و جدول‌ها در مقاله‌های فارسی، به هر دو زبان فارسی و انگلیسی ذکر شوند. این قسمت با قلم B-Nazanin با اندازه فونت ۱۰ و انگلیسی با قلم Times New Roman و اندازه فونت ۱۰ آماده شود. بعد از واژه شکل از خط تیره و بعد از واژه Figure از نقطه استفاده شود. کلمات شکل تا آخر شماره به فارسی با خط تیره باید بولد باشد و به لاتین Figure باید بولد باشد.
- تمامی جداول و نوشته‌های روی شکل‌ها به انگلیسی تنظیم شوند.
- مثال: شکل ۱- درصد حذف کنگو رد در محلول ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگ با غلظت‌های مختلف نمک.
- **Figure 1.** Congo red removal percentage at ۶۰۰ mg/l dye solution with different salt concentrations.
- تایپ مقاله با نرم افزار Microsoft Office Word 2007 باحاشیه ۲/۵ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل‌ها و بالانویس و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم در پایین و وسط صفحه با اندازه فونت ۱۲ B Nazanin
- شماره گذاری شوند. در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
- از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز درون پرانتز و در مقاله آورده شود.

• همواره فونت فارسی B Nazanin و فونت انگلیسی Times New Roman با دو سایز کوچکتر باشد و جزییات مطابق زیر رعایت شود:

• عنوان فارسی مقاله: وسط چین، Bold و ۱۴ و انگلیسی وسط چین، Bold و ۱۲ باشد.

نام نگارندگان: وسط چین، Bold و ۱۱ باشد و با کاما از هم جدا شوند. در مورد انگلیسی هم همینطور ولی با اندازه فونت ۹. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده مسئول سمت راست آن عدد باشد. (Akbari*)

نشانی نگارندگان: وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد.

• چکیده باید شامل هدف، مقدمه، پارامترها و نتیجه گیری باشد و از این به بعد نویسندگان ملزم به رعایت چکیده های بخش بندی شده می باشند.

• چکیده فارسی: فونت ۱۲ نازک و ایتالیک، در یک پاراگراف و حداقل ۱۵۰ کلمه باشد.

• واژگان کلیدی فارسی Bold : ۱۲ و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.

• متن فارسی: اندازه فونت ۱۲ و در انگلیسی اندازه فونت ۱۰ باشد.

عناوین بخش های مختلف: عناوین اصلی، درجه دو و سه Bold باشند. عنوان اصلی فارسی راست چین ۱۴ و انگلیسی چپ چین و ۱۲ باشند.

پس از عناوین اصلی و درجه دوم دو نقطه استفاده نشود و ادامه متن از سطر جدید نوشته شود ولی عناوین درجه سه با دو نقطه از مطلب جدا شود.

چکیده گسترده انگلیسی: (مشاهده شیوه تنظیم چکیده گسترده انگلیسی)



• چکیده انگلیسی: اندازه فونت ۱۰ نازک و در یک پاراگراف باشد.

• واژگان کلیدی انگلیسی: اندازه فونت ۱۰ و bold باشند.

شماره صفحه: پایین وسط با اندازه فونت ۱۲ B Nazanin

• ابتدای هر پاراگراف ۱/۲۷ سانتی متر تورفتگی داشته باشد.

• برای نوشتن اسامی علمی تحت جنس (سرده) سیستم دونامی رعایت شود.

• در مقاله، علائم نگارشی مثل نقطه و غیره به کلمه قبلی چسبیده و از بعدی یک فاصله داشته باشد. از علامت % استفاده نشود بلکه کلمه درصد نوشته شود(به استثنای جداول و اشکال).

• برای بیان مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.

• جدول با سه خط افقی رسم شود(دو خط نشان دهنده سرتیر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).

• اندازه فونت اعداد و متن داخل جداول و اشکال ۱۰ نازک و وسط چین باشد.

• اعداد حداکثر تا دو رقم اعشار نوشته شوند.

• عنوان جداول(در بالای جدول) و اشکال(در پایین شکل) وسط چین با اندازه فونت ۱۱ Bold علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با اندازه فونت ۸ نازک نوشته شوند.

مرجع نویسی در متن:

- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003).
- منابع با دو نگارنده: نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001).
- منابع با بیش از دو نگارنده: تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al* (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (et al Fernandes, 2001). در متن مقاله می‌توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953))

منابع:

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

نشریات:

الف) با یک نویسنده:

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

ب) با دو نویسنده:

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

ج) با بیش از دو نویسنده:

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

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

کتاب

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-منابع بی نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود:

بی نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

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

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

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

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

• نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که 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 پاسخ های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی کلپوره (*Teucrium polium* L.) به تنش خشکی زهرا توحیدی، حمید سبحانیان*، امین باقی زاده..... ۷
۲. روابط تکاملی ساختار دمین پروتئین ATAXIN-2 در گیاهان: بینش احتمالی دخالت این پروتئین در بومی سازی ترجمه در فرایند جنین زایی گیاه برنج (*Oryza sativa*) ۲۵
۳. مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) بر باکتری های بیماری زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و بیماری زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی) مسعود حیدری زاده*، مهدیه همتی، مراحم آشنگرف..... ۴۱
۴. تحلیلی انتقادی بر رابطه نظریه "ژن خدا" با ایمان گروهی ۶۰
۵. ارزیابی تأثیر پروبیوتیک Bio-Aqua® بر شاخص های رشد و بازماندگی، کیفیت لاشه ماهی، اندیس های خونی و بیوشیمیایی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و متغیرهای فیزیکیوشیمیایی آب محیط پرورش امید رمضان نژاد،*صابر وطن دوست،*رضا چنگیزی، حامد منوچهری، رضا صفری ۷۵
۶. حفاظت طولانی مدت ژرم پلاسما از دانه های (*Panucum miliaceum* L.) بومی شمال غرب ایران مهدی کاکایی*، طیبه بساکی ۸۹
۷. شناسایی و سنجش محتوای اسیدهای فنلی در قارچ های اندوفیت جدا شده از *Corylus avellana* L. نرجس محمدی بلکوتی، فائزه قناتی*، سعیده وزیری فر ۱۰۰
۸. بررسی ترکیبات فنولی و خواص بیولوژیکی اندام های رویشی گیاه *Lepidium vesicarium* L. سعید ملائی*، مهناز اسلامی، مصطفی عبادی ۱۱۰
۹. اثر سویه های اگروباکتریوم رایزورنز بر القای ریشه مویین در ریزنمونه های مختلف گیاه یونجه الهه میرزایی دلبری، جعفر وطن دوست، متین جامی معینی*، عیسی کهن باغخیراتی ۱۲۷
۱۰. جداسازی و شناسایی باکتری های اندوفیت ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) و بررسی تأثیر آن ها بر جوانه زنی بذر و رشد گیاه شیدا نظریور، مریم محمدی سیچانی*، منیره رنجبر..... ۱۴۳

بررسی پاسخ های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی کلپوره

(*Teucrium polium* L.) به تنش خشکی

زهرا توحیدی^۱، حمید سبحانیان^{۲*}، امین باقی زاده^۳

چکیده

مقدمه: تنش خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی در ایران است گیاه کلپوره (*Teucrium polium*) از تیره نعناع به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش شناسایی شده است. از اینرو در این پژوهش، این گیاه از استان کرمان جمع آوری و از لحاظ مقاومت به تنش خشکی بررسی شد. **روش ها:** آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی طراحی و به صورت گلدانی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای ۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی اعمال گردید. تجزیه و شناسایی اسانس با دستگاه GC/MS انجام شد. **نتایج و بحث:** گیاه کلپوره با به کارگیری برخی مکانیسم های تحمل به خشکی مانند افزایش طول ریشه، افزایش محتوی پروتئین و پروتئین در مقابل تنش خشکی مقاومت می کند و با آنالیز اسانس مشخص شد که این گیاه غنی از متابولیت های ضد باکتریایی همچون بتا- پینن و بتا- کاریوفیلین. این نتایج به انتخاب این گیاه به عنوان گیاه مقاوم به خشکی و به دنبال آن استفاده بهینه در صنایع دارویی و بهداشتی کمک شایانی خواهد نمود.

واژه های کلیدی: اسانس، بتا- پینن، بتا- کاریوفیلین، پروتئین، گاز کروماتوگرافی

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران (نویسنده مسئول : motif3000@yahoo.com)

۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

مقدمه

مقدار آب در دسترس گیاه از عوامل مهم اقلیمی مؤثر بر توزیع و پراکنش گیاهان در سرتاسر جهان بوده و می تواند باعث بروز تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه شود (Hasani, & Omid-beige., 2002). کم آبی یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان در سراسر جهان و شایع ترین تنش محیطی است که تقریباً ۲۵ درصد از اراضی جهان را محدود می کند و باعث کاهش محصولات می شود (Khan et al., 2010). با توجه به کمبود شدید منابع آب در آینده نزدیک، مدیریت منابع آب به منظور بهره وری و افزایش راندمان مصرف آب از اهمیت خاصی برخوردار است (Baghizade et al., 2019). لذا انتخاب گونه های مناسب مناطق خشک حائز اهمیت است. گونه های مختلف گیاهی از نظر مقاومت به خشکی دامنه وسیعی را نشان می دهند که این امر به علت سازگاری های فیزیولوژیکی، ریخت شناسی و بیوشیمیایی گوناگون گیاهان است. *Teucrium polium* یکی از گیاهان تیره نعناع است و به نام های محلی مریم نخودی و کلپوره معروف است و در مناطق سنگلاخی و ماسه زارهای نواحی مختلف اروپا، منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می روید. این جنس در ایران ۱۲ گونه دارد (Mozzafarian., 1994).

این گیاه علفی پایا، پرشاخه به ارتفاع ۱۰ تا ۳۵ سانتی متر است برگ ها باریک، دراز و پوشیده از کرک های پنبه ای است. گل ها به رنگ سفید یا مایل به زرد و زمان گل دادن بین خرداد و مرداد است. تا کنون مطالعه جامعی در زمینه واکنش این گیاه به تنش خشکی صورت نگرفته است. با این وجود عکس العمل گیاهان دارویی مختلف به تنش خشکی در تحقیقات متعددی بررسی شده است. تنش خشکی می تواند از یک یا چند فعالیت فیزیولوژیکی مانند تعرق، فتوسنتز، طویل شدن بافت و اندام و یا فعالیت های آنزیمی سلول ممانعت کرده و یا حتی باعث توقف آنها شود (Gul., 2005).

کاهش آب اثر منفی مشخصی بر رشد، میزان محصول، میزان کلروفیل و روغن های ضروری گیاه *Ocimum basilicum* دارد (Hassani & Omid-beige., 2002). همچنین تنش خشکی پارامترهای رشد را در گیاهان دارویی مانند ریحان (Khalil., 2010)، جعفری (Petrooulos et al., 2008) و ریحان بنفش (Moeini et al., 2006) کاهش داده است. Tazikehmiyandare و همکاران (۲۰۱۲) نیز در تحقیقات خود اعلام کردند که تنش خشکی سبب کاهش

معنی دار وزن خشک برگ نعناع می شود. همچنین تنش خشکی در گیاهان تیره نعناع اثر مشخصی بر سطح برگ، وزن تر و خشک، کلروفیل و میزان روغن های ضروری دارد (Misra & Sricastara., 2000).

T. polium گیاهی غنی از متابولیت های ضد باکتریایی است که به عنوان منبع جدیدی از داروهای ضد تولید بیوفیلیم در باکتری ها معرفی شده است. فعالیت ضدباکتریایی می تواند شامل مکانیسم های دفاعی نظیر غیرفعال سازی آنزیمی مولکولی های ایجادکننده بیوفیلیم ها باشد. حذف و یا جلوگیری از ساخت بیوفیلیم توسط باکتری ها، کارایی آنتی بیوتیک را بالا می برد (Tran et al., 2000). علاوه بر فعالیت آنتی باکتریایی، *T. polium* دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی مشخصی است. چندین گیاه از این

جنس در طب سنتی برای درمان عفونت‌های قارچی و آبسه‌ها استفاده شده است (Elmasri *et al.*, 2014). همچنین این گیاه برای اختلالات گوارشی، التهاب، فشارخون بالا، تب، دیابت و روماتیسم، استفاده می‌شود (Moustapha *et al.*, 2011).

این گیاه دارای منبع غنی از دی‌ترین‌ها است و بیش از ۲۴۰ دی‌ترین شناسایی شده است. در پژوهش Amiri و Esmaili (۲۰۰۹) در نمونه کلپوره مربوط به بروجرد ۴۴ ماده شناسایی شد که مهمترین ترکیب‌های شناسایی شده شامل آلفا-پینن ۱۲/۹۵ درصد، بتا-کاریوفیلن ۱۲/۳۵ درصد، ژرماکرن دی ۱۱/۷۴ درصد، بتا-پینن ۸/۷۵ درصد، لیمونن ۷/۶۰ درصد و کاریوفیلن اکسید ۵/۵۷ درصد است. همچنین در تحقیقی که توسط Hassan و Muhtadi (۱۹۷۹) انجام شد ۸۰ ماده از اسانس کلپوره جداسازی شد که بیشترین مواد به ترتیب اسپاتولنول، آلفا-پینن، سیس و رینول، بتا-پینن، لیمونن و ورینون بود. در الجزایر، ۲۱ ترکیب از اسانس گیاه شناسایی شد که شامل آلفا پینن ۹/۵ درصد، بتا پینن ۸ درصد به عنوان ترکیبات اصلی گیاه نام برده شده است (Kabouche *et al.*, 2011). براساس تحقیقات انجام شده بر روی اسانس گیاه مذکور در جزیره کرس فرانسه، ۸۶ ترکیب شناسایی شدند که شامل آلفا پینن ۲۸/۸ درصد، بتا پینن ۷/۲ درصد، لیمونن ۳ درصد به عنوان ترکیبات اصلی اسانس گیاه بودند Cozzani *et al.*, 2005). در Jordanian germander، ۳۷ ترکیب از اسانس این گیاه، شناسایی قرار گرفت که ترکیبات اصلی آن عبارتند از بتا-کاریوفیلن ۸/۷ درصد، سابینن ۵/۲ درصد، ژرماکرن دی ۶/۸ درصد (Aburjui *et al.*, 2006). تفاوت‌های مشاهده شده در اسانس این گیاه در مناطق مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش اسانس‌گیری، زمان جمع‌آوری گیاه و یا تفاوت‌های اکولوژیکی محل‌های جمع‌آوری گیاه باشد.

با توجه به اهمیت دارویی این گیاه، مطالعه پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف از جمله تنش خشکی و شناسایی اسانس گیاه در مناطق خشک جهت مصارف دارویی و بهداشتی حائز اهمیت است. از اینرو مطالعه حاضر به بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و موفولوژیکی گیاه تحت تنش خشکی پرداخته است و با شناسایی اسانس گیاه این منطقه جهت استفاده بهینه در علم داروسازی و جایگزین کردن آن با داروهای شیمیایی پیشنهاد می‌گردد.

مواد و روش ها

این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با ۳ تکرار در گلخانه‌ای در شهر کرمان تحت شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتیگراد و رطوبت ۳۰ درصد انجام شد. تیمارهای رطوبتی شامل ۱۰۰ درصد به عنوان شاهد، ۷۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بود (Baghizade *et al.*, 2019).

بذرهای گیاه کلپوره از استان کرمان تهیه شد. در ابتدا بذرها با محلول سدیم هیپوکلراید ۰/۱ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند و به مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفتند. جهت کاشت بذرها از گلدان‌های مناسب به قطر ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر استفاده و به منظور کاهش تبادل حرارتی بین خاک و محیط بیرون، سطح آن با فوم عایق بندی شد (Baghizade *et al.*, 2019).

جهت انجام آزمایش از گلدان‌های پلاستیکی حاوی دو چهارم ماسه، یک چهارم رس و یک چهارم خاک برگ پیت استفاده شد. گلدان‌ها هر سه روز یکبار آبیاری شدند و محلول غذایی مورد استفاده محلول هوگلند (Hogland & Arnon, 1950) بود. در ماه دوم کاشت گیاه و پس از استقرار کامل و رشد گیاه اعمال تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰ درصد، ۷۰ درصد و ۴۰ درصد FC به مدت ۱۰ دوره سه روز یکبار انجام گرفت. نمونه برداری از برگ‌های توسعه یافته گیاهان پس از اتمام تیمارهای خشکی جهت بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک شامل طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، پروتئین و پروتئین کل انجام شد و نمونه‌ها با ازت مایع تا زمان اندازه‌گیری فریز شدند (Baghizade *et al.*, 2019).

اندازه‌گیری طول ساقه و ریشه

در پایان فصل رشد رویشی گیاه، طول ساقه و ریشه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک

برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک گیاه، پس از جدا کردن اندام هوایی، وزن تر با استفاده از ترازو و برحسب گرم اندازه‌گیری شد. سپس جهت اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیوم پیچیده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس با استفاده از ترازو وزن آنها اندازه‌گیری شد (Shakirova & Sahabutdinova., 2003).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای محاسبه کلروفیل از روش Lichtenthaler (1987) استفاده شد. پس از عصاره‌گیری برگ‌ها با استون ۸۰ درصد و صاف نمودن آنها، جذب هر نمونه در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ خوانده شد و با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل محاسبه و برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ بیان گردید.

$$a = (A_{663} - A_{645}) / 2.5 = \text{کلروفیل } a$$

$$b = (A_{645} - A_{663}) / 0.21 = \text{کلروفیل } b$$

$$\text{کلروفیل کل} = a + b \text{ کلروفیل}$$

سنجش پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (1993) استفاده شد. میزان ۰/۰۲ گرم از نمونه برگ تازه در ده میلی لیتر محلول سه درصد اسید سولفوسالسیلیک سائیده و مخلوط یکنواختی تهیه شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس دو میلی لیتر از مایع رویی با دو میلی گرم معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر اسید استیک خالص مخلوط و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم، قرار داده شد. جهت قطع انجام کلیه واکنشها، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ، سرد گردید. سپس چهار میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه دو لایه کاملاً مجزا در آنها تشکیل شد. از لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده گردید. جذب مقدار مشخصی از این ماده رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پرولین برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

سنجش پروتئین کل

برای سنجش پروتئین از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد. برای تهیه عصاره پروتئینی ۵۰۰ گرم از بافت تازه برگ گیاه در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار که حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین ۱ درصد و EDTA یک میلی مولار بود ساییده شد. سپس سانتریفیوژ شد (تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت). برای سنجش غلظت پروتئین، به لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر معرف بیوره ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از ۲۵ دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

بررسی اسانس اندام هوایی

برگ‌های گیاه کلیپوره با استفاده از دستگاه کلونجر مدل USP و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند. به این منظور ۴۰ گرم برگ خشک پودر شده به همراه ۳۵۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. بعد از حدود چهار ساعت عمل تقطیر، اسانس بدست آمده به همراه آب تقطیر شده جمع‌آوری و با حلال آلی n-هگزان ورتکس گردید. بخش n-هگزانی به دستگاه GC-MS تزریق شد. برای شناسایی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی

(GC/MS) مدل QP5050 دارای ستون DB5 با قطر ۰/۲۵ میلی متر و طول ۶۰ متر انجام شد. برنامه دمایی به این صورت بود که ۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داشت، سپس با سرعت ۵ درجه سانتی گراد بر دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد و در ادامه با سرعت چهار درجه سانتی گراد بر دقیقه تا دمای ۲۷۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت. گاز هلیوم با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. پتانسیل یونیزاسیون دستگاه ۷۰ الکترون ولت بود. در نهایت ترکیب های تشکیل دهنده اسانس با مقایسه طیف های جرمی و شاخص های بازداری بدست آمده با طیف های جرمی و شاخص بازداری ترکیب های استاندارد و همچنین بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه GC/MS شناسایی شدند (Jaymand & Rezaei, 2006).

آنالیزهای آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS، ۲۰۱۹ و ورژن ۲۶ مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها نیز براساس روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel 2010، ورژن ۲۶ رسم شدند.

نتایج

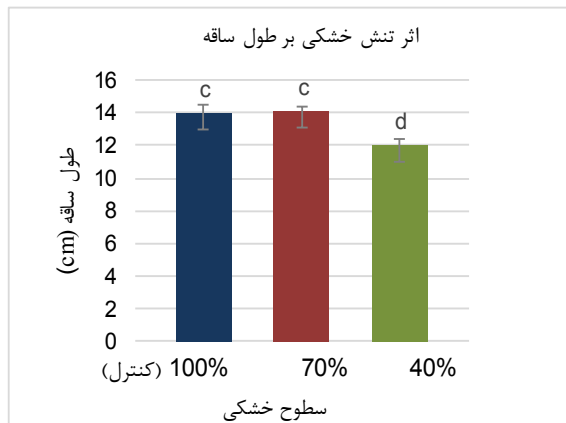
در این تحقیق گونه گیاه کلپوره استان کرمان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از داده های مربوط به ویژگی های مورفولوژیکی اندام هوایی کلپوره نشان داد که افزایش تنش خشکی منجر به کاهش معنی دار صفات مورفولوژیکی اندام هوایی شد. در بررسی تنش خشکی، کاهش معنی دار طول ساقه به مقدار $0/43 \pm 12$ سانتیمتر در خشکی ۴۰ درصد نسبت به تنش ۷۰ درصد و شرایط فاقد تنش، مشاهده گردید (شکل ۱). بررسی تأثیر تنش خشکی ۷۰ درصد و ۴۰ درصد سبب افزایش طول ریشه شده اند، ولیکن مقایسه آن ها با شرایط فاقد تنش نشان می دهد که اعمال تنش های خشکی باعث افزایش طول ریشه به صورت معنی دار، نسبت به مورد فاقد تنش شده اند (شکل ۲).

اعمال تنش های خشکی ۷۰ درصد و ۴۰ درصد، به ترتیب سبب کاهش مقدار وزن تر و خشک در آن ها شده است ($13/5 \pm 0/1$ و $11/4 \pm 0/36$ گرم بر مترمربع). مقایسه این مقادیر با میزان وزن تر در شرایط فاقد تنش نشان داد که تنش ۷۰ درصد سبب ایجاد تفاوت آماری معنی دار با شرایط فاقد تنش نشده است. در صورتی که کاهش وزن تر به سبب تنش ۴۰ درصد در مقایسه با شرایط فاقد تنش از لحاظ آماری معنی دار است (شکل ۳). همچنین تأثیر تنش خشکی ۴۰ درصد باعث کاهش وزن خشک به میزان $8/8 \pm 0/26$ گرم بر مترمربع شده است. این مقدار از لحاظ آماری تفاوت معنی دار با وزن خشک با اثر تنش ۷۰ درصد و بدون اعمال تنش دارد (شکل ۴).

اعمال تنش خشکی ۴۰ درصد باعث افزایش معنی‌دار ($0/7 \pm 28/82$ میلی گرم بر گرم) میزان پروتئین نسبت به تنش ۷۰ درصد و شرایط فاقد تنش گردید (شکل ۵).

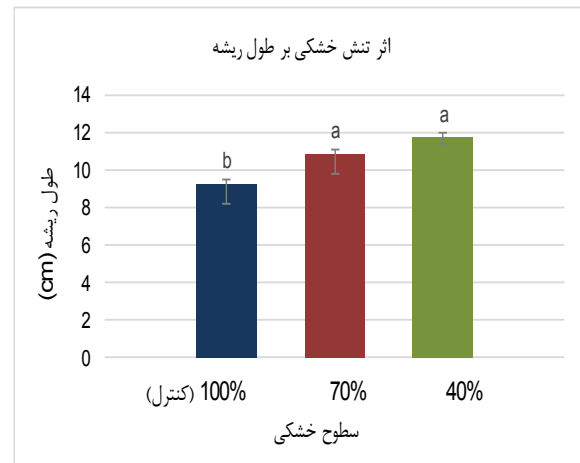
ارزیابی تغییرات میزان پرولین افزایش معنادار این شاخص را به ترتیب در وضعیت فاقد تنش، تنش ۴۰ درصد و ۷۰ درصد به ترتیب با مقادیر $0/9 \pm 22/013$ ، $1/08 \pm 32/09$ و $0/01 \pm 48/19$ نشان داد (شکل ۶). تنش خشکی ۴۰ درصد سبب کاهش معنادار کلروفیل a ($0/02 \pm 4/35$ میلی گرم بر گرم) نسبت به نمونه‌های تحت تأثیر تنش ۷۰ درصد و فاقد تنش نشان داد. تأثیر خشکی ۷۰ درصد در این نمونه‌ها سبب کاهش نسبی میزان کلروفیل a نسبت به شرایط فاقد تنش شده است (شکل ۷). تأثیر تنش خشکی ۷۰ درصد، موجب کاهش مقدار کلروفیل b نسبت به شرایط فاقد تنش ($0/03 \pm 1/36$ میلی گرم بر گرم) گردید. بررسی مقادیر به دست آمده به لحاظ آماری کاهش معنی‌دار مقدار شاخص کلروفیل b در تنش ۴۰ درصد نسبت به تنش ۷۰ درصد و شرایط فاقد تنش را نشان داد (شکل ۸). تأثیر تنش خشکی ۴۰ درصد در میزان کلروفیل کل سبب کاهش این شاخص ($0/03 \pm 4/72$ میلی گرم بر گرم) نسبت به شرایط فاقد تنش ($0/12 \pm 1/18$ میلی گرم بر گرم) و تنش ۷۰ درصد ($0/07 \pm 4/65$) گردید. این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار است. همچنین تنش خشکی ۷۰ درصد سبب افزایش کلروفیل کل به طور معنی‌دار آماری نسبت به شرایط فاقد تنش و تنش ۴۰ درصد شده است (شکل ۹).

با آنالیز اسانس از طریق کروماتوگراف گازی مجهز به طیف سنج جرمی (GC/MS)، ۱۷ ترکیب شناسایی شد. ترکیبات شیمیایی شناسایی شده نشان داد که ترکیب‌های عمده اسانس شامل کاریوفیلین اکسید ۱۷ درصد، فارنسیس ۶/۵۰ درصد، بتا-پینن ۴ درصد، بتا کاریوفیلین ۳/۹ درصد و لیمونن ۱ درصد بود. ترکیبات اسانس‌های شناسایی شده در جدول ۱ آمده است.



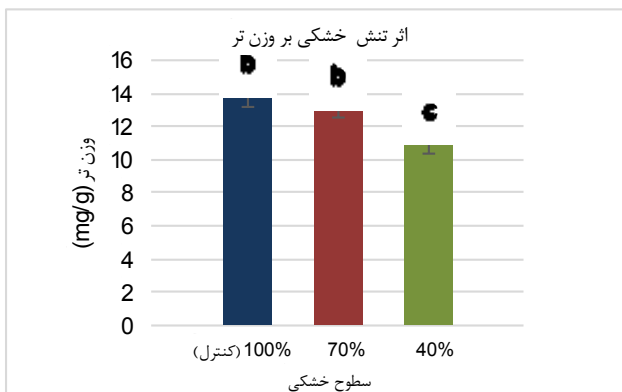
شکل ۱- اثر سطوح مختلف خشکی بر طول ساقه‌ی گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure1.



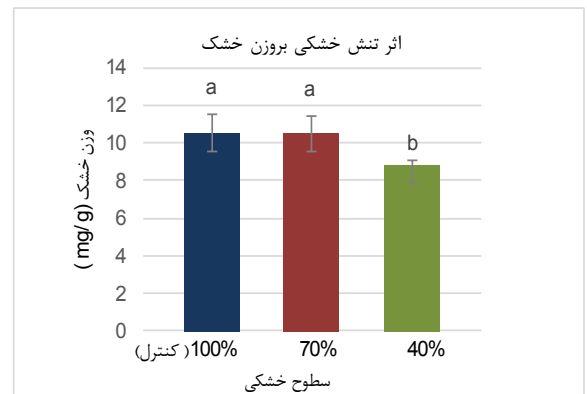
شکل ۲- اثر سطوح مختلف خشکی بر طول ریشه‌ی گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure2.



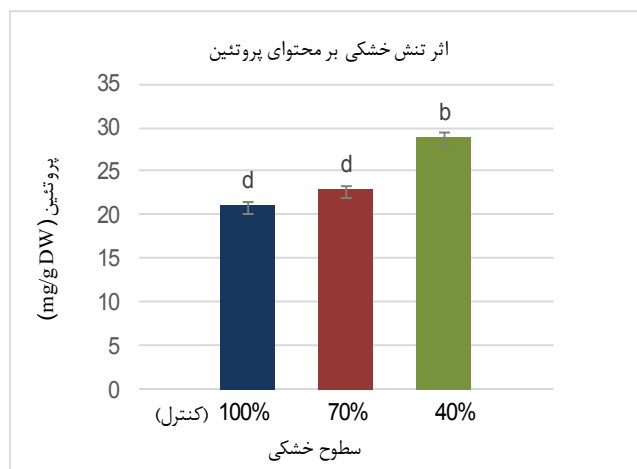
شکل ۳- اثر سطوح مختلف خشکی بر وزن تر گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 3.



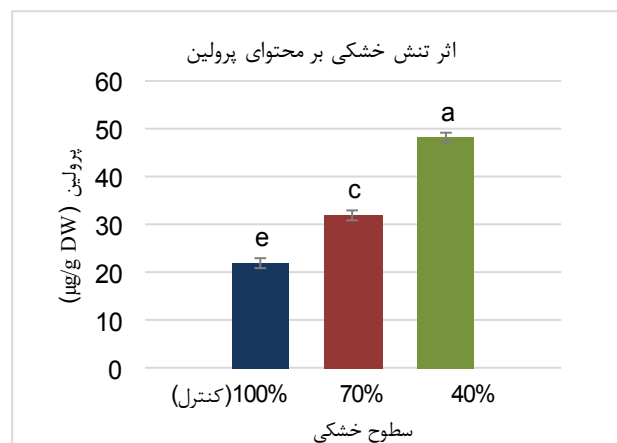
شکل ۴- اثر سطوح مختلف خشکی بر وزن خشک گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 4.



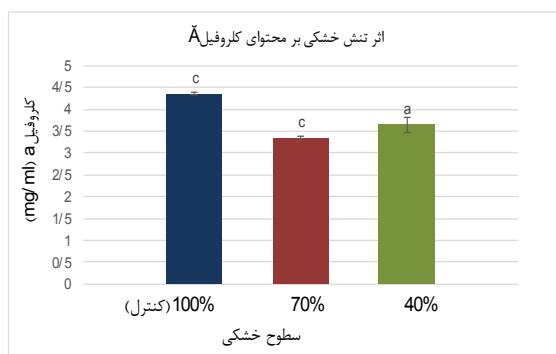
شکل ۵- اثر سطوح مختلف خشکی بر محتوای پروتئین گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 5.



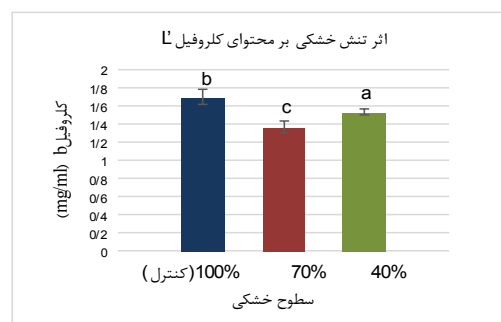
شکل ۶- اثر سطوح مختلف خشکی بر محتوای پروکلین گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 6.



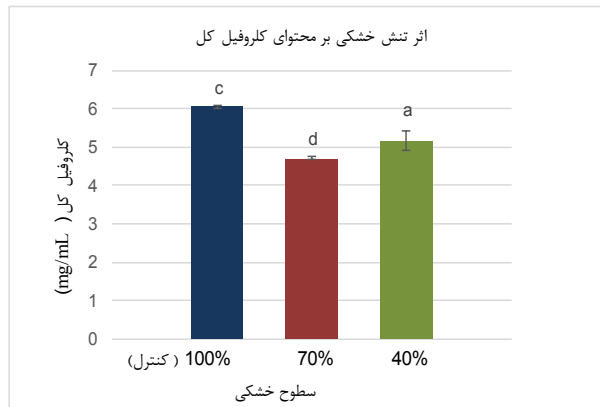
شکل ۷- اثر سطوح مختلف خشکی بر محتوای کلروفیل a گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 7.



شکل ۸- اثر سطوح مختلف خشکی بر محتوای کلروفیل b گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 8.



شکل ۹- اثر سطوح مختلف خشکی بر محتوای کلروفیل کل گیاه کلپوره (*Teucrium polium*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است و حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون دانکن است.

Figure 9.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی عمده شناسایی شده در برگ های گیاه کنترل کلپوره (*Teucrium polium*)

درصد موجود در اسانس	ترکیبات شناسایی شده	درصد موجود در اسانس	ترکیبات شناسایی شده
3/3	Curcumene	1	n-Octane
2	α -Farnesene	1	Sabinene
17	Caryophyllene	4	β -Pinene
2/5	Oxide	۰/۸۵	Limonene
28	Cedrenol	3/8	Linalool
6/5	Italidenol	2	α -Trapinol
12/5	β -Farnesene	2/2	Myrtenol
3	Bisabolol	0/6	Carveol-Trans
	Farnesol	3/9	β -Caryophyllene

بحث

تنش آبی یک تنش عمده محیطی است که بر مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی گیاه تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش قابل توجهی در تولید محصولات کشاورزی می‌شود. این امر ۲۵ درصد از سرزمین های جهان را غیرمولد می‌کند (Delfine *et al.*, 2005). خشکسالی یک تنش چند بعدی برای گیاهان است. بنابراین، می‌تواند جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، خشکسالی می‌تواند بر کمیت و کیفیت رشد و عملکرد گیاهان، به ویژه محصولات زراعی تأثیر منفی بگذارد (Panneerselvam, 2011).

Alishah و همکاران (۲۰۰۶) کاهش قابل توجهی در ارتفاع بوته، قطر ساقه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*)، در اثر تنش رطوبت خاک نشان دادند. کاهش طول ساقه در پاسخ به تنش خشکی ممکن است به علت تقسیم سلولی و یا طول شدن سلول باشد. کمبود آب منجر به کاهش اتساع سلول، حجم سلول و در نتیجه رشد سلول می‌شود. علاوه بر این تنش خشکی از طریق کاهش سرعت انتقال مواد در آوندهای چوبی و آبکش نیز ممکن است باعث کاهش رشد ساقه شود (Lovislo & Boyer, 1998). کاهش طول ساقه قادر است از طریق سازوکارهای تخفیف تنش خشکی و کاهش تلفات آب، گیاه را در برابر خسارت تنش محافظت کند (Mohammadi & Haghparast, 2011).

به منظور افزایش جذب آب در شرایط کم‌آبی، گیاهان ریشه‌های خود را گسترش داده و سیستم ریشه‌ای تولید می‌کنند. افزایش تخصیص زیست توده به ریشه در شرایط خشکسالی و گسترش سیستم ریشه گیاه به طور کلی منجر به ظرفیت بیشتری برای جذب آب می‌شود. بر این اساس، با وجود کاهش رشد شاخه، رشد ریشه تحت کمبود آب به طور قابل توجهی کاهش نمی‌یابد (Ismail *et al.*, 2012).

با بررسی اثر تنش خشکی بر عملکرد بوته و اسانس گیاه مرزه توسط Bahernik و همکاران (۲۰۰۷) به این نتیجه رسیدند که وزن تر و خشک کل گیاه تحت تنش کاهش یافته است. در شرایط تنش، کاهش ماده خشک می‌تواند به دلیل فشار آماس سلول ناشی از کاهش سطح برگ گیاه باشد (Lawlor & Cornic, 2002). یکی از دلایل اصلی کاهش وزن گیاه آسیب دیدن غشاء سلول های گیاهی است که باعث از دست دادن آب گیاه و یا کاهش در جذب آب می‌شود و احتمالاً به دلیل همین تغییر در وضعیت آبی است که بیوماس نیز کاهش می‌یابد (Mokhtari & brothers, 2011).

تنش آب نه تنها بر مورفولوژی گیاه تأثیر می‌گذارد بلکه شدیداً متابولیسم و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در یک بررسی تجمع پروتئین در ریشه و برگ های دو رقم گیاه *Zea mays* مشاهده شد. پروتئین کل ابتدا تحت تنش خشکی ریشه و برگ دو رقم گیاه *Zea mays* افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد (Riccardi *et al.*, 1998). کمبود آب باعث تولید پروتئین های LEA می‌شود که کار آنها به طور کامل مشخص نشده است، برخی شواهد

نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها در افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی نقش دارند (Wise & Tunnacliffe, 2004). ثبات پروتئین و یا افزایش آن تحت تاثیر تنش به مفهوم حفظ فعالیت‌های آنزیمی برگ در این شرایط است. علاوه بر این افزایش محتوای پروتئین محلول در شرایط تنش دلالت بر نقش آنزیمی و حفاظتی پروتئین های محلول در حفظ فتوسنتز تحت تنش دارد (Mafakheri *et al.*, 2010).

گیاهان سازوکارهای سازگاری متفاوتی در پاسخ به تنش‌های غیرزنده محیطی نظیر تنش خشکی دارند. این سازوکار سازگاری شامل تغییر در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است که در بین آن‌ها تجمع محلول‌های آلی سازگار بیشتر مورد توجه است تنش خشکی منجر به تجمع چند محلول آلی سازگار نظیر قندها، بتائین و پرولین می‌گردد (MohammadKhani & Heidari., 2008).

در حین کمبود آب، حفظ پتانسیل آب گیاه برای ادامه رشد ضروری است و این می‌تواند از طریق سازوکارهای تنظیم اسمزی ناشی از تجمع محلول‌های سازگار نظیر پرولین و هیدرات‌کربن در سیتوپلاسم به دست آید (Ajithkumarand & Panneerselvam., 2013).

Safikhani و همکاران (2007) در بررسی تأثیر تنش خشکی بر گیاه دارویی (*Dracocephalum moldavica* L.) گزارش کردند که تنش رطوبتی باعث افزایش پرولین شد. همچنین Babaei و همکاران (نیز در بررسی اثر تنش خشکی بر میزان پرولین در آویشن به این نتیجه رسیدند که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر انباشت پرولین داشته و میزان آن را افزایش داده است. به دنبال تنش خشکی، بروز تنش اکسیداتیو منجر به تجمع قابل توجه پرولین می‌شود که می‌تواند ناشی از افزایش در سنتز پرولین و یا کاهش ازهم‌پاشیدگی آن باشد. پرولین آزاد به عنوان یک محافظ اسمزی، پایدارکننده پروتئین، کلات کننده فلز، ممانعت کننده از پراکسیداسیون چربی عمل می‌کند (Trovata., 2008).

Kholova و همکاران (2011) با مطالعه اثر تنش خشکی بر محتوای کلروفیل در ارقام مختلف ارزن، بیان کردند که محتوای کلروفیل برگ در تمام ارقام کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین Arazmjo و همکاران (2010) با مطالعه بر روی بابونه نشان دادند که با افزایش کمبود آب از میزان کلروفیل کاسته می‌شود. کاهش و یا مهار فتوسنتز یکی از اصلی‌ترین اثرات خشکسالی در گیاهان عالی است. کاهش محتوای کلروفیل برگ تحت تنش آب یکی دیگر از عواملی است که در کاهش میزان فتوسنتز دخیل است. کاهش محتوای کلروفیل در طول تنش خشکی به مدت زمان و شدت خشکسالی بستگی دارد و به معنی کاهش ظرفیت فتوسنتز است (Labudda & SafiulAzam., 2014). تنش‌های محیطی اساساً با ایجاد اختلال در کلیه اجزای اصلی فتوسنتز از جمله انتقال الکترون تیلاکوئید، چرخه کاهش کربن و کنترل روزافزون تأمین CO₂، همراه با افزایش تجمع کربوهیدرات‌ها، تخریب پراکسیداتیو لیپیدها و برهم زدن تعادل آب همراه

کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش خشکی یک علامت معمول استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده است و ممکن است در نتیجه اکسیداسیون و تخریب کلروفیل باشد. رنگدانه های فتوسنتزی به طور عمده برای برداشت نور و تولید ترکیبات کاهنده مهم هستند (Farooq et al., 2016).

اسانس های حاصل از گونه *Teucrium* در ایران و جهان مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه علمی درباره روغن *T. stocksianum* subsp. *Stocksianum* در آوریل ۲۰۰۳، سی و هشت ترکیب شد. ترکیب اصلی روغن شامل کامفن 20/6 درصد، α -پینن 19/7 درصد، میرسن 10/2 درصد و کارواکرول 9/90 درصد است (Jaimand et al, 2006). با مطالعات انجام شده روی برگ های *T. flavum* از ایران هجده ترکیب مشخص شد که ترکیب اصلی آن بتا کاریوفیلین بود (Mirza et al., 2003). به نظر می رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی اسانس *Teucrium polium* مرهون ترکیب های ترپنی به ویژه کاریوفیلین و بتا- پینن باشد که بیشترین درصد ترکیب شیمیایی اسانس را به خود اختصاص داده اند (Autor et al., 1984). بتا-پینن واسطه مهمی در ساخت ترکیب های معطر سنتزی است و جزئی از روغن است که در طعم دهنده ها استفاده می شوند. همچنین در کارخانجات ساخت پلیمر و چسب مورد استفاده قرار می گیرد. کاریوفیلین یک سزکونی ترپن دو حلقه ای است که در صنایع عطرسازی، صابون سازی، آرایشی و بهداشتی مصرف می شود.

در مطالعه Mirza (۲۰۰۱) و مطالعه Esmaili و Amiri (۲۰۰۹) و همچنین نمونه های مورد بررسی این تحقیق، بتا-کاریوفیلین، بتا-پینن و لیمونن با وجود تفاوت هایی در درصد آنها مشاهده می شود که از مواد شاخص موجود در اسانس این گیاه محسوب می شوند. بتا- پینن که از ترکیبات اصلی گیاه مورد بررسی است از شناخته شده ترین ترپن ها بوده و اهمیت تجاری ویژه ای دارد. به علاوه اینکه خاصیت ضدالتهابی بتا-پینن توسط Karaca و همکاران (۲۰۰۷) و توسط Lorente و همکاران (۱۹۸۹) همچنین اثرات ضد باکتریایی قوی این ترکیب توسط Afolayan و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است.

تفاوت مشاهده شده بین اکوتیپ های مورد بررسی گیاه کلپوره از نظر درصد و نوع ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در مطالعات قبلی، می تواند مربوط به شرایط رویشگاهی، وجود خصوصیات خاک و اقلیمی، تفاوت در روش اسانس گیری، زمان جمع آوری گیاه و یا تفاوت های اکولوژیکی محل های جمع آوری گیاه باشد.

نتیجه گیری کلی

تنش های محیطی مهم ترین عامل کاهش دهنده عملکرد محصولات کشاورزی در سطح جهان هستند. نتایج این مطالعه بیانگر آن است که گیاه دارویی کلپوره با به کارگیری برخی مکانیسم های دفاعی مانند کاهش ارتفاع گیاه، وزن

اندام هوایی و همچنین افزایش طول ریشه و تجمع پرولین واکنش مناسبی در برابر تنش خشکی نشان می دهد. همچنین با بررسی اسانس این گیاه، امکان استفاده از اسانس *T. polium* در علوم مربوط به گیاهان دارویی، داروسازی، صنایع غذایی و مواردی از این قبیل، می تواند مورد مطالعه و بررسی بیشتر قرار گیرد.

منابع

- Aburjai, T., Hudaib, M., Cavrini, V. (2006). Composition of Essential oil from Jordanian germander (*Teucrium polium* L.). Journal of Essential Oil Research, 18:97-99.
- Afolayan, A.J. and Ashafa, A.O.T. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Chrysocoma ciliata* L. leaves. Journal of Medicinal Plants Research, 3(5): 390-394.
- Alishah, TN., Ghadir, I. (2006). Water status measurements of excised leaves: Position and age effects. Crop Science, 31: 1583-1588.
- Arazmjo, A., Heidari, M. and Ghorbani, A. (2010). The effect of water stress and three sources of fertilizers on flower yield, physiological parameters and nutrient uptake in chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 4: 482-494.
- Ashraf, S. (2009). Cold, salinity and drought stresses. an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444: 139-158.
- Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasco, M.R., Lembo, M., Mascolo, N. and Menghini, A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. Pharmacological Research Communications, 16: 21-29.
- Babaei, K., Amini, M., Modares sanavi, A. and Jabbari, r. (2010). The effect of drought stress on morphological traits, proline content and thymol content in (*Thymus vulgaris* L.) thyme. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 239-251.
- Baghizadeh, A., and Haj Mohammad Rezaei, M., and Tohidi, Z. (2019). Investigation of the interaction of drought stress with ascorbate and salicylic acid on the activity of some antioxidant enzymes and flavonoids in okra *Hibiscus esculentus* L. Cellular and Molecular Research (Iranian Biology), 33 (1): 142-152.
- Bahernik, Z., Mirza, M., Abbaszadeh, b. and Naderi, m. (2007). The effect of drought stress on some metabolic processes of *violet*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 3: 322-315.
- Bates, L.S., Waldren, R. P., and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 29:205-207.
- Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Tomi, F. and Casanova, J. (2005). Chemical composition of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Crosia. Flavour and Fragrance Journal, 20(4): 436-441.
- Delfine, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S. E., & Shabala, S. (2005). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. Journal of Experimental Botany, 62(1): 185-193.

- Elmasri, W. A., Hegazy, M. E., Aziz, M., Koksai, E., Amor, W., Mechref, Y., Hamood, A. N., Cordes, D. B., Pare, P. W. (2014). Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. The International Journal of Plant Chemistry, Plant Biochemistry and Molecular Biology, 103: 107-113.
- Esmaili, A. and Amiri, H. (2009). Survy on antimicrobial effect and identify compounds substance *Teucruom polium*. Journal of Esfahan University Pure Science, 31: 15-22.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. (2016). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy of Sustain Development, 29:185–212.
- Gul, P. (2005). Seasonal variation of oil and menthol content in *Mentha arvensis* Linn. Pakistan Journal of Forestry, 44: 16-20
- Hasani, A. and R. Omid-beigi. (2002). Effect of water stress on some morphological, physiological and metabolical traits in basil (*Ociumum basilicum*). The Journal of Agricultural Science, 12: 47–59
- Hassan, M.M. and Muhtadi, F.J. (1979). GC/Mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. Journal of Pharmceutical Sciences, 68(16): 800-801.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950). The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station. Search Results California Agricultural Experiment Station Circular, 347:1-32.
- Ismail, M.D., Mofizur, R., and Hiroshi, H. (2012). Water stress. IL: In Teck 300 Pp. Craotia.
- Jaimand, K. and Rezaei, M. B. (2006). Essential oils, distillation devices, test methods and inhibition indices in the analysis of essential oils. Publications of the Association of Medicinal Plants, 56-61.
- Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait- Kaki, Z., Moustapha, C., Hasen, T., Waleed, M., Sadaka, M. (2011). Chemical constituents of *Teucrium polium* L. var. mollissimum Hand-Mazz. Jordan Journal of Chemistry, 1(3): 302-305.
- Karaca, M., Ozbek, H., Him, A., Tutuncu, M., Akkan, H.A. and Kaplanoglu, V. (2007). Investigation of antiinflammatory activity of bergamot oil. European Journal of General Medicine, 4(4): 176-179.
- Khalil, A.A. (2010). Effect of post–anthesis water stress on yield regulating processes in wheat (*Triticum aestivum* L.). Ph.D. Thesis. University of London, Wye College, Wye, Ashford, U.K.
- Khan, A.S., UL-Allah, S. and Sadique, S. (2010). Genetic variability and correlation among seedling traits of Wheat (*Triticum sativum*) under water stress. International Journal of Agricultur and Biology, 12(2):249-250.
- Kholova, J., Hasan, C.T.M., Khocova, M. and Vadie, V. (2011). Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pear millet exposed to drought. Journal of Environmental and Experimental Botany, 71: 199-106.
- Labudda, M., SafiulAzam, F.M., (2014). Glutathione-dependent responses of plants to drought. The international journal Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 83:3–12.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148:350-382.
- Lorente, I., Ocete, M.A., Zarzuelo, A., Cabo, M.M. and Jimenez, J. (1989). Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. Journal of Natural Products, 52(2): 267-272.

- Lovislo, L., Boyer, J. (1988). Breeding for water-saving and drought-resistance rice. *Agronomy of Sustain Development*, 25:183-191
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher. *Plant, cell and Environment*, 25: 275-249.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. and Rand, R.J. (1951). Protein measurmont with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 256-273
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P.C., Sohrabi, E. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three *chickpea* cultivars. *American Journal of Chinese Studies on JSTOR*, 4:580–585.
- Mirza, M., Bahernik, Z. And Jamzad, Z. (2003). Extraction and identification of *Salvia mirzayanii* essential oil compounds (*Salvia mirzayanii* Rech. F. & Esfand). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 19 (2): 117-124.
- Mirza, M. (2001). The quantitative and qualitative chemical composition of essential oil of *Teucrium polium*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 10: 27-38.
- Misra, A. and Sricastatva, N.K. (2000). Influence of water stress on *Japanese mint*. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 7:51–58.
- Moeini Ali-Shah, H., Heidari, R., Hassani, A. and Asadi Dizaji, A. (2006). Effect of water stress on some morphological and biochemical characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum*). *Jurnal of biological Sciences*, 6: 763-767
- Mohammadi, R., Haghparast, R. (2011). Evaluation of rainfed promising wheat breeding lines on farmers field in west of Iran. *International Journal of Plant Breeding*, 5: 30-36.
- Mokhtari, A. and brothers, R. (2011). The effect of drought stress on some growth indices of *Satureja hortensis*, *Regional Conference on Crop Ecophysiology*. Shushtar.
- Mohamadkhani, P., Heidari, S.M. (2008). Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two *Maize* Varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3 (3): 448-453
- Moustapha, C., Hasen, T., Waleed, M., Sadaka, M. (2011). Chemical constituents of *Teucrium polium* L. var. *mollissimum* Hand-Mazz. *Jordan Journal of Chemistry*, 6: 339-345
- Mozaffarian, V. (1994). *An Encyclopedia of Plants, Plant Classification*. IL: Tehran University 750Pp. Tehran.
- Panneerselvam, M. (2011). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agricultural Biology*, 11: 100-105.
- Petropoulos, L. S., Walderen, R. D. and Taere, I. D. (2008). Rapid determination of freep roline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Rezaei, M.B., Jaymand, K., Majd, A. And Madah, M. (2001). The effect of collection time on the amount of essential oils and compounds. *Chemistry of fennel plant organs. Plant Research Quarterly. Iranian Medicinal and Aromatic*, 11: 23-11.
- Sefidkan, F. (2000). Investigation of the constituents of essential oil of shoots and seeds of *Jashir* plant L. *Ferulacea Prangos Lindly. Research on Iranian Medicinal and Aromatic Plants*, 5: 60-47

- Shakirova, F.M., Sahabudinova, D.R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedling induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, 164:317-322.
- Tazikehmiyandare, M., Niyakan, M and Ahmadigosefidi, M. (2012). Effect of pretreatment of salicylate on the growth and photosynthetic pigments parameters of peppermint (*Mentha piperita* L.) under different levels of stiffness. *Journal of Plant Science Research*, 28(4): 654-663.
- Tran, P. L., Lowry, N., Campbell, T., Reid, T. W., Webster, D. R., Tobin, E., Ulubelen, A., Topcu, G., Sonmez, U. (2000). Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 23: 591-648.
- Wise, L.e. and Tunnacliffe, T.R. (2004). Nodule gas exchange and water potential response to rapidim position of water deficit. *Plant Cell Environ*, 18: 179-187.

Morphological, biochemical and physiological responses of *Teucrium polium* L. to drought stress

Z. Tohidi¹, H. Sobhanian^{2*}, A. Baghizadeh³

Received:2020.11.19

Accepted:2021.7.19

Abstract

Introduction: Drought stress is one of the most important environmental stresses in Iran. *Teucrium polium* has been identified as a valuable medicinal plant. Therefore, in this study, this plant was collected from Kerman province and evaluated in terms of drought stress resistance **Methods:** An experiment was designed in a completely randomized design and performed in a pot with three replications. Treatments of 100, 70 and 40 percent of field capacity were applied. Essential oil analysis was performed by GC / MS. **Results and discussion:** *Teucrium polium* resists drought stress by using some drought tolerance mechanisms such as increasing root length, proline and protein contents. Essential oil analysis showed that this plant is rich in antibacterial metabolites such as beta-pinene and beta-caryophyllene. These results will greatly help in the selection of this plant as a drought tolerant plant and its subsequent optimal use in the pharmaceutical and health industries.

Keywords: *Beta- caryophyllen, Beta-pinene, Chromatography, Essential oil, Proline*

1. Assistant Professor, Department of Biology Payam Noor University, Tehran-Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology Payam Noor University, Tehran-Iran *Corresponding author: motif3000@yahoo.com

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

روابط تکاملی ساختار دمین پروتئین *ATAXIN-2* در گیاهان: بینش احتمالی دخالت این پروتئین در

بومی‌سازی ترجمه در فرایند جنین‌زایی گیاه برنج (*Oryza sativa*)

شادی حیدری^۱، پیوند حیدری^۲، بهارک حیدری^{۳*}

چکیده

مقدمه: با توسعه فن آوری‌های تعیین توالی با توان بالا، داده‌های توالی با سرعت زیادی جمع‌آوری می‌شوند و تفسیر عملکرد آنها یک چالش اساسی است. ژن *ATXN2* کد کننده پروتئینی با عملکرد نا شناخته در برنج (*Oryza sativa*) است. هدف از این مطالعه، تعیین ساختار دمین و پیش‌بینی عملکرد این پروتئین بود. **روش‌ها:** درخت فیلوژنی موتیف توالی با ۱۶۴ توالی اسید آمینه *ATAXIN-2* از ۴۵ گونه گیاهی توسط مجموعه MEME و نرم افزار Phylyp آنالیز شد. **نتایج و بحث:** نتایج، دو نوع کلاس کلی از پروتئین‌های *ATAXIN-2* را مشخص نمود. عدم وجود دمین LsmAD در یک کلاس ممکن است ویژگی‌های عملکردی متمایزی را نسبت به کلاس دیگر *ATAXIN-2* اعطا کند. در این پژوهش عملکرد *ATAXIN-2* به عنوان پروتئین‌های متصل شونده به RNA (*RNA binding*) پیش‌بینی شد که در تنظیم mRNA سیتوپلاسمی در جنین‌زایی برنج نقش دارد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند اساس تحقیق در مورد عملکرد این پروتئین در هدف قرار دادن زیرمجموعه‌های جداگانه mRNA به مکان‌های زیر سلول در گیاهان باشد که توسط سلول‌های دو قطبی جنین برای ایجاد محفظه‌های عملکردی مشخص بکار گرفته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های متصل شونده به RNA، پیش‌بینی عملکرد، ترجمه موضعی، فیلوژنتیک

۱. دکتری، گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دکتری، گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه مهندسی کامپیوتر، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران (*نویسنده مسئول: b_heidari@iauksh.ac.ir)

مقدمه

با توسعه فن‌آوری‌های تعیین توالی با توان بالا، داده‌های توالی‌های جدید با سرعت زیادی جمع‌آوری می‌شوند در حالیکه تفسیر عملکرد آنها یک چالش اساسی است (Wong *et al.*, 2019). بنابراین یکی از مراحل کلیدی در همه پروژه‌های تعیین توالی ژنوم، پیش‌بینی عملکرد ژن‌های موجود در آنها است. روش‌های آزمایشگاهی برای تعیین عملکرد پروتئین گامی دشوار و یک فرایند محدود کننده عمده برای تعیین عملکرد است. بسیاری از روش‌های محاسباتی و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک به منظور پیش‌بینی عملکرد ژن ایجاد شده است. به طور معمول، تفسیر عملکرد پروتئین به دنبال جستجوهای پایگاه داده و تکنیک‌های محاسباتی برای یافتن هومولوگ‌های توالی پروتئین در آرگانیزم‌های مدل صورت می‌گیرد. این روش‌ها بر این اصل تکیه دارند که پروتئین‌های یک جد مشترک ممکن است عملکرد مشابهی داشته باشند. با این حال، بیشتر خانواده‌های پروتئینی دارای گروه‌هایی از پروتئین‌ها با عملکردهای مختلف مولکولی هستند و بنابراین رویکردهای بیوانفورماتیک سنتی قادر نیستند عملکرد مناسب را به پروتئین‌های بدون علامت اختصاص دهند (Engelhardt *et al.*, 2009). اکنون نرم افزارهای مختلفی برای بررسی دقیق توالی‌ها و ساختارهای پروتئین برای شباهت‌های تاخوردگی‌ها و موتیف‌ها در دسترس است. BLAST، Dali و PSI-BLAST نمونه‌هایی از رویکردهای کلاسیک برای استنباط عملکرد از روی توالی‌ها هستند و پایگاه‌های داده مانند PROSITE، Pfam و InterPro و از طرفی Profunc، SPRITE و PINTS به ترتیب، به منظور جستجوی عملکرد در سطح ساختاری، موتیف و الگوهای سه بعدی بکار می‌روند. از آنجا که ساختار پروتئین‌ها بیشتر از توالی‌ها حفاظت شده‌اند از این رو جستجوی شباهت در سطح ساختار معنای عمیق‌تری را نسبت به توالی فراهم می‌کند (Nadzirin *et al.*, 2012).

یافتن عملکرد باز هم می‌تواند با ادغام داده‌های عملکردی موجود با استفاده از روابط تکاملی یک خانواده پروتئینی معنای عمیق‌تری پیدا کند. این رویکرد فیلوژنتیک به منظور تفسیر عملکرد مولکولی (فیلوژنومیک) از یک درخت فیلوژنتیک صریح برای پیش‌بینی عملکرد استفاده می‌کند و یک روش موثر برای پیش‌بینی عملکرد مولکولی پروتئین است (Brown & Sjölander, 2006). این روش شامل شواهد عملکردی از همه اعضای یک خانواده است که با استفاده از یک درخت فیلوژنتیک مسیر تکاملی مجموعه‌ای از پروتئین‌های هومولوگ را منعکس می‌کند و پیش‌بینی‌های قوی برای پروتئین‌های ناشناخته انجام می‌دهد. به دلیل تجدید ساختار مدولار دمین‌ها در طول تکامل پروتئین "دمین شافلینگ" بیشتر پروتئین‌ها از چندین دمین تشکیل شده‌اند که این امر روابط همسانی دوتایی بیشتری را بین توالی‌های دمین منفرد نسبت به توالی‌های پروتئین کامل به وجود می‌آورد. بهره‌برداری از این واقعیت می‌تواند باعث افزایش حساسیت رویکردهای پیش‌بینی عملکرد پروتئین شود (Chothia *et al.*, 2003).

به منظور تعیین عملکرد پروتئین *ATXN2* چندین دمین از این پروتئین و شرکای تعامل کننده متنوع آنها شناسایی و مورد پژوهش قرار گرفته‌اند. *ATAXIN-2* از دو دمین کروی به نام Lsm و LsmAD تشکیل شده است. دمین Lsm احتمالاً به RNA متصل می‌شود و دمین LsmAD شامل یک سیگنال ترانس گلژی با واسطه کلاترین و یک سیگنال خروجی شبکه آندوپلاسمی (ERD) است (Albrecht et al., 2004). مشخص شده است که DEAD/H-Box RNA Helicase DDX6 به دمین Lsm/LsmAD در *ATAXIN-2* متصل می‌شود. DDX6 یک جز از اجسام P و گرانول‌های تنش (SG) است (Nonhoff et al., 2007). SG ها و اجسام P محل تریاز RNA هستند. قرار گرفتن در معرض تنش سلولی می‌تواند باعث پاسخ تنش شود که شروع ترجمه را متوقف کرده و منجر به تشکیل SG ها می‌شود. SG ها کمپلکس‌های RNA-پروتئینی سیتوپلاسمی پویا هستند که حاوی پروتئین‌های اتصال دهنده RNA، mRNA ها و عوامل شروع ترجمه هستند. بعد از رفع تنش، SG ها جدا شده و ترجمه mRNA از سر گرفته می‌شود. همچنین mRNA های ترجمه نشده می‌توانند به اجسام P، گرانول‌های دیگری که محل تخریب mRNA هستند، هدایت شوند (Li et al., 2013).

دمین Lsm *ATAXIN-2* تیپ معمول پروتئین‌های Sm هستند و در انواع رویدادهای اساسی پردازش RNA از جمله اصلاح RNA، اسپلایسینگ Pre-mRNA، تجزیه و تخریب mRNA نقش دارند. برخی از آنها همچنین اجزای مهم ریبونوکلوپروتئین‌های هسته‌ای کوچک اسپلایسوزومی (snRNP) هستند (Albrecht et al., 2004). *ATAXIN-2* همچنین دارای یک موتیف C-terminal یا (PAM2) در انتهای کربوکسی است که با پروتئین متصل شونده به پلی (A) سیتوپلاسمی (PABP) که یکی دیگر از اجزاء SG است، تعامل می‌کند (Albrecht et al., 2004). ساختار دمین پروتئین *ATAXIN-2* اطلاعات مربوط به عملکرد مولکولی آن را در متابولیسم RNA فراهم می‌کند. از جمله عملکرد آنها می‌توان به دخالت در چندین مسیر از جمله تنظیم ترجمه، اتصال، پاسخ تنش، آندوسیتوز گیرنده و متابولیسم لیپید اشاره نمود. *ATAXIN-2* از نظر تکاملی حفاظت شده است و عملکرد آن علاوه بر انسان به SG ها و تنظیم ترجمه در ارگانیسم‌های مدل نیز مرتبط است. علاوه بر این، *ATAXIN-2* غلظت درون سلولی شرکای تعامل کننده خود، پروتئین متصل شونده به پلی (A)، یکی از اجزاء دیگر SG ها و یک عامل اصلی برای کنترل ترجمه را تنظیم می‌کند. بنابراین، بیان ژن *ATAXIN-2* سلولی برای مونتاژ SG و اجسام P ضروری است که بخش‌های اصلی تنظیم و کنترل تخریب، پایداری و ترجمه mRNA هستند.

(Jiménez-López & Guzmán et al, 2014) در بررسی روابط تکاملی دمین‌ها، اطلاعات ارزشمندی را در مورد تکامل و ساختار دمین پروتئین‌های *ATAXIN-2* در سراسر یوکاریوت ها فراهم کردند. (Heidari (2010) در مطالعه خود *ATAXIN-2* را به عنوان ژن کد کننده پروتئینی با عملکرد ناشناخته و افزایش بیان معنی‌دار در جنین‌زایی گیاه برنج گزارش نمود. مطالعات زیادی

افزایش بیان این پروتئین را در بافت‌های جنینی ارگانیسم‌های مختلف گزارش کرده‌اند (Kiehl *et al.*, 2006; Kiehl *et al.*, 2000). تاکنون عملکرد سلولی دقیق *ATXN2* در گیاهان، ناشناخته باقی مانده است. بنابراین در این تحقیق، از روابط تکاملی دمین‌های *ATXN2* در گونه‌های مختلف گیاهی برای پیش‌بینی عملکرد این پروتئین ناشناخته استفاده شد.

مواد و روش‌ها

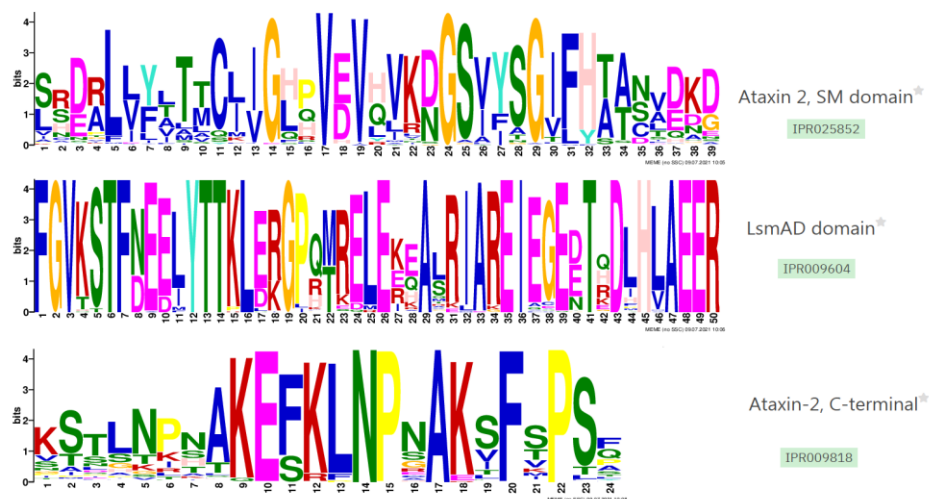
به منظور بررسی دمین‌های حفاظت شده در خانواده *ATAXIN-2* در گیاهان تمام اعضای خانواده *ATAXIN-2* که در PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/>) ثبت شده‌اند به عنوان توالی‌های جستجو (query) برای جستجو در Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2016) و بانک اطلاعاتی دمین حفاظت شده (NCBI (CDD) (Marchler-Bauer *et al.*, 2013) مورد استفاده قرار گرفتند. PlantGDB پایگاه داده‌ای از توالی‌های مولکولی برای همه گونه‌های گیاهی است. هدف این وب سایت ایجاد زمینه‌ای برای شناسایی مجموعه‌ای از ژن‌های مشترک در همه گیاهان یا گونه‌های خاص از طریق ادغام تعدادی از ابزارهای بیوانفورماتیک است که پیش‌بینی ژن و مقایسه بین گونه‌ها را تسهیل می‌کند. اسکن Pfam با استفاده از hmmscan، از مجموعه نرم‌افزار HMMer (Eddy, 2011) با استفاده از آستانه گردآوری اجرا شد. $E\text{-value} < 10^{-5}$ ، با حداقل ۷۰٪ هم‌پوشانی توالی‌های دمین به منظور یافتن همردیفی معنی‌دار در نظر گرفته شد. اسکن CDD با استفاده از rpsblast از مجموعه بلاست NCBI انجام شد (Camacho *et al.*, 2009). گزینه‌های اجرای rpsblast آستانه $E\text{-value} < 10^{-5}$ ، آمار مبتنی بر ترکیب و پوشاندن نرم قطعات حاوی اطلاعات کم بود.

به منظور تجزیه خوشه و آنالیزهای فیلوژنتیک برای بررسی واگرایی نسبی در بزرگ خانواده *ATAXIN-2* از برنامه Phylip (Retief, 2000) استفاده شد. همردیفی‌های چندگانه توسط MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) با استفاده از روش L-INS-i ایجاد شد (Katoh & Standley, 2013). همردیفی‌های ضعیف و دارای گپ با استفاده از trimAL (<http://trimal.cgenomics.org/>) برداشته شدند (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009). همردیفی‌های با شکاف کمتر در نظر گرفته شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از مجموعه Phylip با استفاده از برنامه‌های NEIGHBOR، FITCH و PROML با ۱۰۰ تکرار بوت‌استرپ ساخته شد. به منظور حفاظت از باقی‌مانده‌های عملکردی، توالی کامل تمام پروتئین‌های موجود در بزرگ خانواده *ATAXIN-2* برای اجرای MEME (<https://meme-suite.org/>) به منظور جستجوی ۳ موتیف برتر به طول بین ۲۰ تا ۶۰ باقیمانده (با افزایش ۵ باقیمانده و $E\text{-value} < 10^{-10}$) استفاده شد. برای دستیابی به همگرایی از حداکثر ۱۰۰۰ تکرار و حداقل فاصله ۱۰-۷ بین ماتریس‌های تناوب موتیف استفاده شد.

از ۵ موتیف شناسایی شده برتر در جستجوهای اولیه، فقط سه نمونه دارای $E\text{-value MEME} < 10^{-100}$ بودند و از این ۳ موتیف شناسایی شده توسط MEME برای اجرای MAST و مکان‌یابی موتیف (مقدار $E\text{-value} < 10^{-5}$) برای شناسایی سایر پروتئین‌های حاوی این موتیف‌ها استفاده شد. وب سرور MEME یک پورتال واحد برای کشف و تجزیه و تحلیل آنالین موتیف توالی ارائه دهنده ویژگی‌هایی مانند سایت‌های اتصال DNA و دمین‌های تعامل پروتئین فراهم می‌کند. سه الگوریتم اسکن توالی MAST، FIMO و GLAM2SCAN امکان اسکن چندین پایگاه داده DNA و توالی پروتئین برای موتیف کشف شده توسط MEME و GLAM2 را فراهم می‌کند. خروجی MEME حاوی توالی LOGOS برای هر موتیف کشف شده و همچنین گزینه‌هایی است که به کاربر امکان می‌دهد موتیف‌ها به راحتی به الگوریتم‌های اسکن پایگاه داده توالی و موتیف MAST، FIMO و TOMTOM یا GOMO برای تجزیه و تحلیل بیشتر از سال شوند (Bailey et al., 2015). در نهایت، عملکرد شرکای تعامل‌کننده با پروتئین ATAXIN-2 با استفاده از وب سایت STRING (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/STRING/>) پیش‌بینی شد (von Mering et al., 2003).

نتایج و بحث

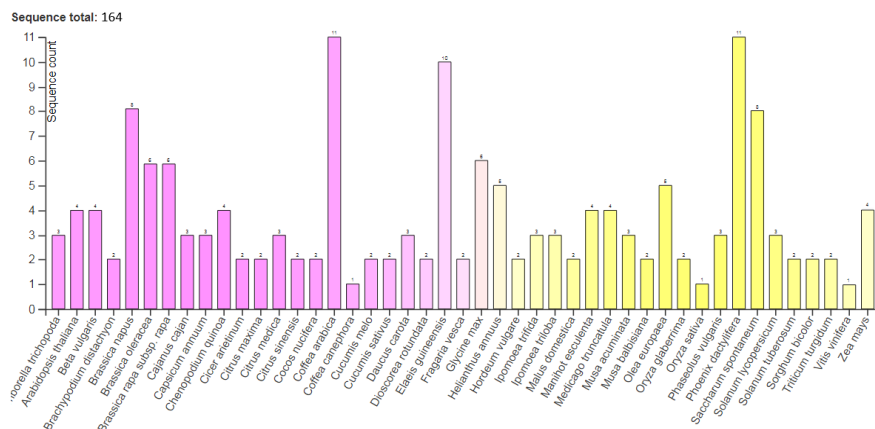
نتایج جست و جو Pfam با اعضای خانواده پروتئین ATAXIN-2 برای مطالعه ساختار دمین استفاده شد. خانواده پروتئین ATAXIN-2 در گیاهان ترکیبات مختلفی از دمین‌های Pfam قابل شناسایی دارند. ۳ دمین اصلی شناسایی شده (به ترتیب با طولی حدود ۳۹، ۵۰ و ۲۴ آمینواسید) در اغلب گونه‌ها در شکل ۱ به صورت لوگو نشان داده شده است. مجموعه‌ای از ۱۶۴ توالی حاوی حداقل یکی از ۳ دمین اصلی یعنی SM domain، LsmAD domain و C-terminal از ۴۵ گونه گیاهی بازیابی شدند. شکل ۲ توزیع اعضای خانواده پروتئین ATAXIN-2 در ۴۵ گونه گیاهی را نشان می‌دهد. دمین اصلی (اول) و دمین سوم در هر خانواده در اکثر گونه‌ها وجود داشت، در حالیکه دمین‌های دوم، چهارم، پنجم و ششم شناسایی شده در همه اعضا شناسایی نشدند. ساختار دمین‌ها از خانواده‌ها، شامل دمین‌های متمایز و همپوشان بودند. دمین اصلی (اول)، SM domain، ATAXIN-2 با اکسشن (*IPR025852*) در پایگاه داده InterPro بود. دمین دوم LsmAD domain با اکسشن (*IPR009604*)، دمین سوم C-terminal، ATAXIN-2 با اکسشن (*IPR009818*)، دمین چهارم LSM domain superfamily (*IPR010920*)، دمین پنجم UBA-like superfamily (*IPR009060*) و دمین ششم GBF-interacting protein 1, N-terminal (*IPR009719*) بودند.



شکل ۱- موتیف‌های اصلی شناسایی شده در اکثر خانواده پروتئین ATAXIN-2 با استفاده از سایت MEME

Figure 1. Major motifs identified in most of the ATAXIN-2 protein family using the MEME site

بیشترین تعداد پروتئین ATAXIN-2 در گونه‌های قهوه *Coffea arabica*، نخل خرما *Phoenix dactylifera*، نخل روغنی *Elaeis guineensis*، کلزا *Brassica napus*، نی شکر *Saccharum spontaneum*، کلم *Brassica oleracea* و شلغم *Brassica rapa* subsp. *Rapa* مشاهده شد (شکل ۲).

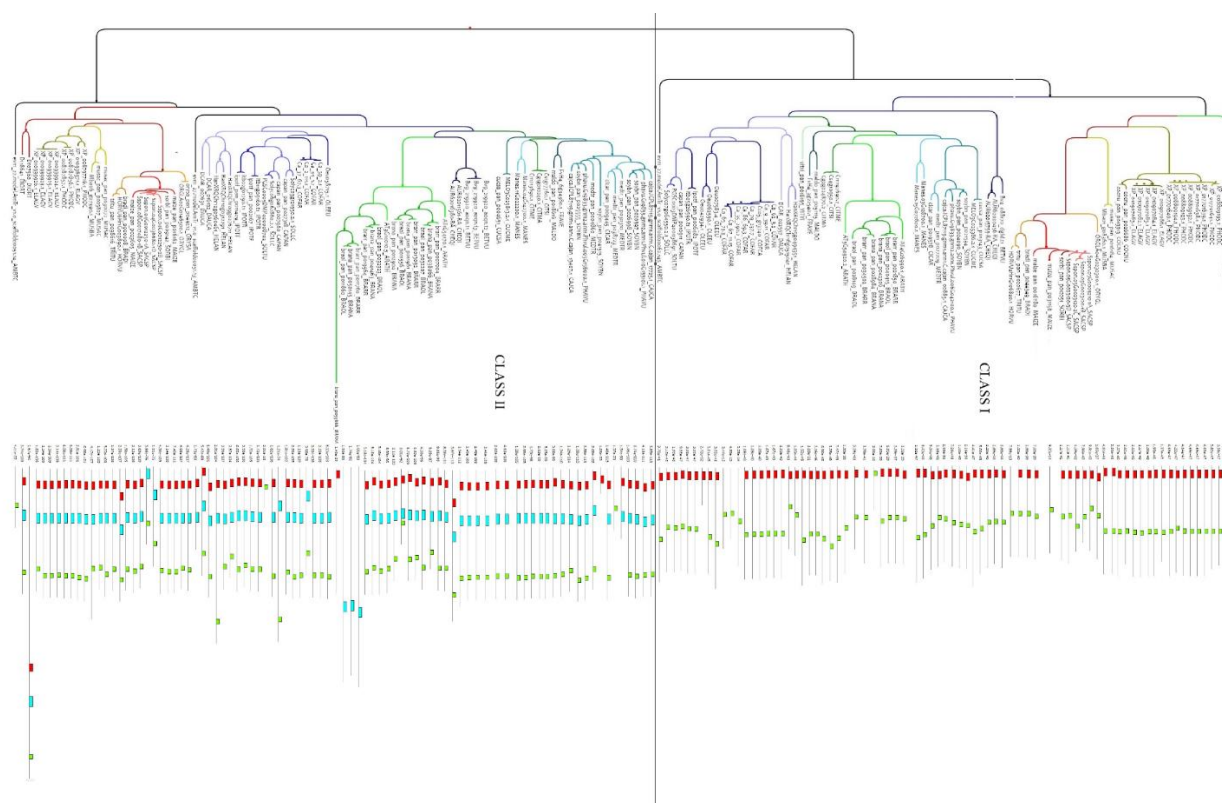


شکل ۲- توزیع اعضای خانواده پروتئین ATAXIN-2 شامل ۱۶۴ پروتئین در ۴۵ گونه گیاهی

Figure 2. Distribution of ATAXIN-2 protein family members including 164 proteins in 45 plant species

ارتولوگ‌های فرضی در اغلب گونه‌ها مشخص شدند، که نشان می‌دهد ATAXIN-2 ژن‌های مهمی در ژنوم‌های گیاهی هستند. برای به دست آوردن فیلوژنی‌ها از ۱۶۴ پروتئین ATAXIN-2 با پشتیبانی از طبقه‌بندی شاخه‌ها و رزولوشن مرسوم گونه‌ها، درختان براساس ۳ دمین حفاظت شده مقایسه شدند (شکل ۳). فیلوژنی‌های تولید شده با روش‌های neighbor-joining

(NJ)، (MP) maximum-parsimony و (ML) maximum-likelihood تولید و مقایسه شدند. درختان حاصل از هر ۳ روش توپولوژی مشابهی داشتند و گونه‌های گیاهان را به صورت کلادهای جداگانه گروه‌بندی کردند. درخت تولید شده با روش NJ اتفاقات ناسازگاری (عدم تطابق) طبقه‌بندی در اکثر کلادها کمتر از فیلوژنی‌های بدست آمده از طریق ML و MP بود (درختان تولید شده با روش MP و ML نشان داده نشده است). برای به دست آوردن یک دید جامع از معماری دمین در میان پروتئین‌های *ATAXIN-2* در گونه‌های مختلف، نتایج جستجوی موتیف توالی در ۱۶۴ توالی اسید آمینه *ATAXIN-2* توسط مجموعه MEME در کنار درخت فیلوژنی آورده شده است.



شکل ۳- رسم درخت فیلوژنی از ۱۶۴ پروتئین *ATAXIN-2* و ۴۵ گونه ی گیاهی براساس ۳ دمین حفاظت شده
Figure 3. Phylogeny tree drawing from 164 *ATAXIN-2* proteins and 45 plant species based on 3 conserved domains

برای هر دمین توالی از رنگ متفاوتی استفاده شده است. موتیف‌ها همراه با درخت فیلوژنتیک و کاتالوگ آنها در شکل ۳ نمایش در آمده است. علاوه بر این، همردیفی پروتئین‌های گیاهان و تعیین مکان مناطق شامل موتیف توالی توسط مجموعه MEME، حفاظت از موتیف‌ها را در میان گیاهان در سه منطقه با طولی حدود ۳۹، ۵۰ و ۲۴ باقیمانده را نشان داد که به ترتیب ۱۰، ۲۱ و ۱۰ باقیمانده در آن غالب هستند (شکل ۱). تمام توالی‌های ATAXIN-2 در گیاهان به دو دسته اصلی تقسیم شدند. یک کلاس شامل کلاس I و کلاس II دیگر شامل کلاس II بود (شکل ۳). در کلاس I اکثر توالی‌ها دارای دو موتیف حفاظت شده اصلی SM domain (موتیف با رنگ قرمز در شکل ۳) و موتیف سوم C-terminal (موتیف با رنگ سبز در شکل ۳) بودند. در کلاس II اکثر توالی‌ها دارای هر سه موتیف حفاظت شده SM domain، C-terminal و LsmAD domain (موتیف با رنگ آبی در شکل ۳) بودند. اکثر گونه‌های مورد مطالعه دارای هر دو نوع کلاس I و II پروتئین ATAXIN-2 بودند. به جز نخل نارگیل *Cocos nucifera*، *Coffea canephora* و *Solanum tuberosum* که دارای دو موتیف اصلی و *Oryza sativa* فقط دارای یک توالی با هر ۳ موتیف اصلی بود. وجود هر دو نوع کلاس I و II پروتئین ATAXIN-2 در اکثر گونه‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده حفاظت شدید هر دو نوع توالی است و احتمالاً اهمیت عملکرد این خانواده پروتئینی را در گیاهان نشان می‌دهد. نتایج پیش‌بینی عملکرد پروتئین ناشناخته در گیاه برنج از طریق رسم درخت فیلوژنی بر مبنای موتیف‌های ساختاری به همراه پیش‌بینی عملکرد شرکای تعامل‌کننده آنها توسط سایت STRING، عملکرد مولکولی و فرایندهای بیولوژیکی آن در جدول ۱ نشان داده شده است. بالاترین همولوژی‌های معنی‌دار، عملکرد مولکولی پروتئین ATAXIN-2 را RNA binding و عملکرد بیولوژیکی آنها را تنظیم mRNA سیتوپلاسمی مشخص کرد. گزارش شده است که ATAXIN-2 در موجودات مختلف عملکردهای بسیاری مانند سیکلینگ گیرنده‌های درون ریز، تنظیم ترجمه، رشد جنینی و متابولیسم انرژی دارد و با بسیاری از پروتئین‌ها برهم‌کنش دارد. (Lastres-Becker et al (2008) نقش اصلی پروتئین ATAXIN-2 را در تعدیل گسترده ترجمه موضعی mRNA بیان می‌کند. این نقش ATAXIN-2 احتمالاً به مکانیسم جایگزین برای بومی سازی پروتئین اشاره دارد که در آن mRNA رمزگذاری کننده پروتئین هدف قرار گرفته می‌شود و متعاقب آن در محل ترجمه می‌شود. رایج‌ترین مکانیزم برای بومی سازی پروتئین شامل هدف‌گیری مستقیم خود پروتئین از طریق توالی‌های خاص مانند توالی‌های بومی سازی هسته‌ای یا میتوکندری است. بسیاری از پروتئین‌های سلولی در مکان‌های اختصاصی زیر سلولی قرار می‌گیرند. بومی سازی فضایی امکان تقسیم‌بندی عملکردی را فراهم می‌کند. با این حال شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که بومی سازی RNA، جایی که mRNA های خاص به زیر سلول منتقل می‌شوند و متعاقباً در پاسخ به سیگنال‌های موضعی ترجمه می‌شوند، مکانیزمی است که برای کنترل بومی سازی پروتئین حفاظت می‌شود. سنتر در محل، ویژگی‌های جدید علامت دهی را به یک پروتئین می‌بخشد و به حفظ هموستاز پروتئوم موضعی کمک می‌کند (Imai & Nakai, 2010).

جدول ۱- معنی دارترین همولوژی های عملکردی پیش بینی شده برای پروتئین ناشناخته به همراه پیش بینی عملکرد شرکای تعامل کننده و فرایند های بیولوژیکی آنها

Table 1. The most significant functional homologies predicted for the unknown protein along with the prediction of function of interacting partners and their biological processes.

Predicted function	Interacted protein	Molecular function	Biological function	E-value
Polyadenylate-binding protein-interacting protein	Polyadenylate-binding protein	RNA-binding	Translational initiation, Regulation of cytoplasmic mRNA, P-body assembly, Stress granule assembly	2.49e ⁻¹⁰⁸
SM-ATX -LsmAD domain-containing protein	Polyadenylate-binding protein	RNA-binding	Translational initiation, mRNA metabolic process	8.58e ⁻¹⁰¹
SM-ATX -LsmAD domain-containing protein	AD domain-containing protein	RNA binding	-	9.86e ⁻⁹⁹
LsmAD domain-containing protein	Belongs to the DEAD box helicase family	mRNA binding, helicase activity	Stress granule assembly, P-body assembly	1.74e ⁻⁸⁰
Polyadenylate-binding protein interacting protein	AD domain-containing protein	RNA binding	-	9.09e ⁻⁷⁸
SM-ATX domain-containing protein	Bromo domain-containing protein	-	Transcriptional activator	8.99e ⁻⁶⁹
SM-ATX -LsmAD domain-containing protein	TPR_MLP1_2 domain-containing protein	Structural constituent of nuclear pore	mRNA and Protein transport	3.68e ⁻⁴⁴
SM-ATX -LsmAD domain-containing protein	MI domain-containing protein	mRNA binding	Translation regulation, Translation initiation factor activity	3.70e ⁻⁴¹
SM-ATX -LsmAD domain-containing protein	CNOT1_X*-containing protein	Molecular adaptor activity, Repressor	Negative regulation of translation, Nuclear-transcribed mRNA catabolism, Deadenylation-dependent decay	1.98e ⁻³⁹
Polyadenylate-binding protein-interacting protein	Nuclear-pore anchor	Structural constituent of nuclear pore	Regulation of gene silencing, mRNA transport, Protein transport	1.45e ⁻²⁴
SM-ATX domain-containing protein	Ethylene-responsive transcription factor 3	DNA-binding, transcription factor activity	Ethylene-activated signaling pathway, Defense response	4.11e ⁻²²

* نشان دهنده دمین HEAT, TTP_bind و CAF1_bind می باشد.

پیشرفت‌های چشمگیر در روش‌های تشخیص RNA منجر به شناسایی تعداد فزاینده mRNA های موضعی شده است. تا اوایل دهه گذشته، مجموعه‌ای از mRNA های هدفمند توصیف شده تقریباً به ۱۰۰ عدد و فرایند بومی‌سازی mRNA به سلول‌های خاص محدود بود. با این حال، تجزیه و تحلیل‌های اخیر در سطح ژنوم این دیدگاه را به طرز چشمگیری تغییر داده است و نشان می‌دهد که هدف قرار دادن زیر سلول mRNA ها مکانیزمی رایج است که توسط سلول‌های قطبی برای ایجاد محفظه‌های عملکردی مشخص استفاده می‌شود (Palacios & Johnston, 2001). تجمع قطبی شده مولکول‌های RNA برای اولین بار نزدیک به ۳۰ سال پیش، هنگامی که مشخص شد mRNA β -اکتین به طور نامتقارنی در تخمک‌ها و جنین‌های برخی از موجودات قرار دارد، تجسم یافت (Jeffery *et al.*, 1983). به دنبال این، کشف اولین mRNA های بومی مادر در تخمک‌های زنوپوس و دریزوفیلا شواهدی را برای پیشنهاد قبلی ارائه داد که تعیین‌کننده‌های موضعی RNA می‌توانند مسئول الگوی اولیه جنینی باشد (Kandler-Singer & Kalthoff, 1976). به زودی مشخص شد که mRNA ها به طور نامتقارن در سلول‌های سوماتیک متمایز مانند فیروپلاست، الیگودندروسیت‌ها و سلول‌های عصبی توزیع می‌شوند و با پروتئین‌های رمزگذاری شده آنها هم بومی‌سازی می‌شوند و انتقال داخل سلولی mRNA ها به مکان‌های مجزا را فراهم می‌کند. یک مطالعه در مقیاس بزرگ هیبریداسیون در محل در جنین‌زایی دریزوفیلا نشان داد، ۷۰ درصد از mRNA ژن‌های بررسی شده (۲۰ از کل ژن‌ها) به بخش‌های متمایز زیر سلولی بومی‌سازی می‌شوند، جایی که در بسیاری از موارد، آنها با پروتئین‌هایی که رمزگذاری می‌کنند هم بومی‌سازی می‌شوند (Lécuyer *et al.*, 2007). همچنین صدها تا هزاران mRNA در محفظه‌های سلولی به اندازه دستگاه میتوزی، پای کاذب (pseudopodia)، سلول‌های کاملاً تخصصی مانند نرون‌های عصبی، دندریت یا آکسون متنوع تشخیص داده شده‌اند (Medioni *et al.*, 2012).

هدف‌گیری mRNA درون سلولی با شناسایی mRNA های موضعی در طیف وسیعی از ارگانیسم‌های به غیر از حیوانات، از جمله مخمر، باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان گسترش پیدا کرد. با این وجود اطلاعات زیادی در مورد نقش مکانیسم بومی‌سازی RNA در عملکردهای خاص سلولی گیاهی وجود ندارد. (Heidari (2010 در بررسی بیان ژن و ژنومیکس کارکردی مسیرهای مختلف مورفوژن با استفاده از تجزیه و تحلیل منابع EST افزایش بیان معنی‌دار توالی EST منتسب به ATAXIN-2 در جنین‌زایی برنج را گزارش نمودند. معمولاً توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست می‌خورند، کاندیدای مناسبی برای ژنهای جدید هستند (Heidari *et al.*, 2012). ایجاد محور رأس-پایه یک رویداد مهم در جنین‌زایی گیاه است، که از اولین مراحل در کیسه جنین، سلول تخمک و زیگوت به بعد مشهود است. تعدادی از جهش‌یافته‌ها، به ویژه از ارگانیسم ژنتیکی مدل عملکرد

ژنی جدیدی را که برای الگوسازی محور راس-پایه مورد نیاز است نشان داده‌اند. اکنون شواهد بیشتری وجود دارد که نشان می‌دهد نوع اختصاصی از علامت دهی نقش مهمی در هماهنگی برنامه‌های بیان ژن برای ایجاد قطبیت تعیین می‌کنند. بنابراین، mRNA ها چیزی فراتر از "پیام رسان" های ساده هستند که اطلاعات ژنتیکی را از DNA به دستگاه سنتز پروتئین می‌رسانند جایی که، mRNA های مرتبط با عملکرد می‌توانند همزمان با توجه به نیازهای بیولوژیکی ترجمه شوند و علامت دهی کارآمد برای کنترل هماهنگ بیان ژن فراهم می‌کنند (Keene & Tenenbaum, 2002).

مشخص شده است که در جنین، از طریق بیان موضعی ژن‌های کلیدی، دو سیستم عملکردی متمایز در هر قطب تشکیل می‌شود. جلبک قهوه‌ای *Fucus* برخی از ویژگی‌های تجربی را در مطالعه وقایع اولیه قطب‌بندی زیگوت را فراهم می‌کند. مشاهده شده است که همراه با تشکیل محور، بومی‌سازی یا توزیع مجدد اجزای غشا پلازما از جمله کانال‌های یونی، توزیع مجدد کلسیم به انتهای پایه، بومی‌سازی F-اکتین در ریزودرم، توزیع نامتقارن مولکول‌های RNA در زیگوت (هر چند mRNA اکتین به طرز جالبی در قطب مخالف پروتئین F-اکتین جمع می‌شود) و یک ترشح قطبی از اجزای دیواره سلولی مشتق شده از گلژی به سمت منطقه "پایه" که سلول ریزوئید از آن توسعه می‌یابد، اتفاق می‌افتد (Shaw & Quatrano, 1996). این مکانیسم مبتنی بر RNA، شامل هماهنگی فرایندهای پیچیده متعدد، از جمله نقل و انتقال mRNA، هدف‌گیری و ترجمه است و کنترل دقیق ناشی از انواع محرک‌ها بر موقعیت پروتئین، فراوانی و تا حدودی عملکرد را قادر می‌سازد. از این رو می‌توان استدلال نمود که در گیاهان نیز مانند سایر موجودات مجموعه‌های متفاوتی از mRNA برای بخش‌های مختلف هدف قرار گرفته می‌شود و سلول‌ها را به سمت پاسخ دادن به محرک‌های مختلف و برنامه‌ریزی مجدد سلولی به سمت تکثیر، تمایز، رشد، آپوپتوز و غیره سوق می‌دهد. این لایه جدید از الگوی داخل سلولی که در ابتدا تصور می‌شد منحصر به سلول‌های بسیار تخصصی است ممکن است به طور گسترده‌ای در بسیاری از انواع سلول‌ها وجود داشته باشد و نقش *ATAXIN-2* را در این زمینه در گیاهان برجسته می‌کند. این بررسی نقش احتمالی *ATAXIN-2* را در ترجمه موضعی به عنوان یک حالت متمایز از کنترل بیان ژن نشان می‌دهد که عملکرد ژن را با دقت، کارایی و انعطاف پذیری مکانی-زمانی برنامه‌ریزی می‌کند. تنظیم بیان ژن یک فرآیند ضروری است که از طریق آن سلول‌های موجودات با تغییرات در محیط خود مقابله می‌کنند. تجزیه و تحلیل اطلاعات مربوط به ارتولوگ های کاوش نشده از طریق MAST زیر مجموعه MEME، وجود دمین LsmAD را در شبدر قرمز *Trifolium pratense*، دمین SM domain را در *Macleaya cordata*، هر دو دمین LsmAD و SM domain را در *Ipomoea nil* و دمین C-terminal را در *Artemisia annua* شناسایی کرد. اطلاعات مربوط به ارتولوگ‌های کاوش نشده می‌تواند برای درک بهتر نقش پروتئین‌های *ATAXIN-2* در متابولیسم mRNA مفید باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه به بررسی ژنوم و تجزیه و تحلیل دمین پروتئین‌های ATAXIN-2 در گونه‌های گیاهی می‌پردازد. ۱۶۴ توالی پروتئینی در ۴۵ گونه انتخاب شده شناسایی شد. این توالی‌های ارتولوگ در گیاهان ممکن است در طی یک رویداد تکاملی ژنوم ایجاد شده باشند. در برخی گونه‌ها تا یازده ژن از این خانواده پروتئینی مشاهده شد و دو نوع کلی کلاس از پروتئین‌های ATAXIN-2 مشخص شد. بنابراین، عملکرد اختصاصی را می‌توان برای این ارتولوگ‌های ATAXIN-2 استنباط کرد. عدم وجود LsmAD در یک کلاس که به توزیع متفاوت زیر سلول و سایر ویژگی‌ها اشاره دارد ممکن است ویژگی‌های عملکردی متمایزی را نسبت به کلاس دیگر ATAXIN-2 اعطا کند. شناخت خوب از دامنه تنوعی که بر یک ویژگی مشخص تأثیر می‌گذارد، درک درستی از مجموعه ژن‌های موجود را فراهم می‌کند (Heidari et al., 2019-2020). تعامل پروتئین-پروتئین در پیش‌بینی عملکرد پروتئین هدف نقش اساسی دارد. روش‌های تجربی مانند تصفیه افینیتی، Y2H (مخمر ۲ هیبریدی)، TAP (تصفیه افینیتی هیبریدی پشت سر هم) و غیره محدودیت‌های مانند هزینه، زمان و غیره خاص خود را دارند. بنابراین، روش‌های بیوانفورماتیک که شامل رویکردهای مبتنی بر ساختار و درخت فیلوژنتیک است به روشن شدن عملکرد پروتئینی و مسیرهای انتقال سیگنال کمک زیادی می‌کند.

در این پژوهش عملکرد ATAXIN-2 که در جنین‌زایی گیاه برنج نقش ایفا می‌کند به عنوان پروتئین‌های متصل شونده به RNA (RNA binding) مشخص شد که در تنظیم mRNA سیتوپلاسمی نقش دارد. نقش پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA (RPBs) ممکن است در هدف قرار دادن زیرمجموعه‌های جداگانه mRNA به مکان‌های زیر سلول باشد که در آنجا منتظر سیگنالی برای ادامه سنتز پروتئین‌ها با توجه به شرایط ذاتی و خارجی هستند. ترجمه بومی انتقال mRNA ها به جای پروتئین‌ها چندین مزیت قابل توجه برای یک سلول دارد. کاهش هزینه‌های نقل و انتقال، جلوگیری از بیان ژن قبل از رسیدن mRNA به محل مناسب به ویژه در مورد عوامل تعیین‌کننده مادر بسیار مهم است، زیرا در تعدادی از موجودات مشاهده شده است که بیان نامناسب فضایی، الگوی جنینی را مختل می‌کند. یک مزیت عمده در هدف قرار دادن mRNA این است که امکان تنظیم دقیق بیان ژن را در فضا و زمان مناسب فراهم می‌کند. علاوه بر این به خاطر تغییرات پس از ترجمه یا از طریق مسیرهای تاخوردگی با کمک چاپرون‌های مولکولی، پروتئین‌های جدید شکل گرفته ممکن است دارای خواص متمایز از نسخه‌های قبلی باشند. علاوه بر این ترجمه بومی می‌تواند در کمپلکس‌های ماکرومولکولی غلظت پروتئین‌ها را تغییر دهد و امکان ترجمه همزمان زیرواحدهای مختلف را تسهیل کند که تمام موارد ذکر شده برای یک جنین دو قطبی از اهمیت زیادی برخوردار است. پیشرفت‌های اخیر در بررسی تنوع ژنتیکی، جداسازی و شناسایی ژن‌های مسئول مسیرهای مختلف مورفوژن را تسهیل نموده است (Heidari

et al., 2017). از آنجا که پروتئین ATAXIN-2 با افزایش بیان و تفاوت معنی دار در کتابخانه جنین زایی در گیاه برنج شناسایی شد و عملکرد آن در گیاهان پیش بینی شد می توان نسبت به جداسازی آن در راستای مطالعات آزمایشگاهی بیشتر اقدام نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه برای حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

- Albrecht, M., Golatta, M., Wüllner, U. and Lengauer, T. (2004). Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur. j. biochem.*, 271(15): 3155-3170.
- Bailey, T.L, Johnson, J., Grant, C.E. and Noble, W.S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.*, 43: W39-49.
- Brown, D. and Sjölander, K. (2006). Functional classification using phylogenomic inference. *PLoS Comput. Biol.*, 30: 2(6): e77.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J. and Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.*, 10: 421.
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J.M, Gabaldon, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinform.*, 25(15): 1972-3.
- Chothia, C., Gough, J., Vogel, C. and Teichmann, S.A. (2003). Evolution of the protein repertoire. *Sci.*, 300(5626): 1701-1703.
- Eddy, S.R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.*, 7(10): e1002195.
- Engelhardt, B.E., Jordan, M.I., Repo, S.T. and Brenner, S.E. (2009). Phylogenetic molecular function annotation. *Journal of physics. Conference series*, 180(1), 12024.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L. et al. (2016). The Pfam protein family database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1): D279-85.
- Heidari, Sh. (2010). A study of gene expression and functional genomics of different in vitro morphogenesis pathways by analyzing expressed sequence tags (ESTs). MSc. Thesis on Agricultural Science, Department of Plant breeding, Shiraz university, 380P.
- Heidari, Sh., Azizinezhad, R. and Haghparast, R. (2017). Investigation on genetic diversity in *Triticum turgidum* L. var. durum using agro-morphological characters and molecular markers. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 77(2): 242-250.

- Heidari, Sh., Azizinezhad, R., Haghparast, R. and P. Heidari. (2019). Evaluation of the association among yield and contributing characters through path coefficient analysis in advanced lines of durum wheat under diverse conditions. *J. Anim. Plant Sci.*, 29(5): 1325-1335.
- Heidari, Sh., Heidari, P., Azizinezhad, R., Etminan, A. and Khosroshahli, M. (2020). Assessment of genetic variability, heritability and genetic advance for agro-morphological and some in-vitro related-traits in durum wheat. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 26(1): 120-127.
- Heidary, P., Maleki Zanjani, B., Heidary, S. (2012). A study of gene expression and functional genomics of wheat, rice, cotton and festuca plants under drought stress by analyzing expressed sequence tags (EST). *modern genetics journal (mgj)*, 7(2 (29)): 129-140.
- Imai, K. and Nakai, K. (2010). Prediction of subcellular locations of proteins: where to proceed? *Proteomics*, 10: 3970-3983.
- Jeffery, W. R., Tomlinson, C. R. and Brodeur, R. D. (1983). Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Dev. Biol.*, 99: 408-417.
- Jiménez-López, D. and Guzmán, P. (2014). Insights into the evolution and domain structure of ATAXIN-2 proteins across eukaryotes. *BMC research notes*, 7, 453.
- Kandler-Singer, I. and Kalthoff, K. (1976). RNase sensitivity of an anterior morphogenetic determinant in an insect egg (*Smittia* sp., Chironomidae, Diptera). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 3739-3743.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30(4): 772-80
- Keene, J. D. and Tenenbaum, S. A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell*, 9: 1161-1167.
- Kiehl, T. R., Nechiporuk, A., Figueroa, K. P., Keating, M. T., Huynh, D. P. and Pulst, S. M. (2006). Generation and characterization of Sca2 (ATAXIN-2) knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339(1): 17-24.
- Kiehl, T. R., Shibata, H. and Pulst, S. M. (2000). The ortholog of human ATAXIN-2 is essential for early embryonic patterning in *C. elegans*. *J. Mol. Neurosci.*, 15(3) :231-41.
- Lastres-Becker, I., Rüb, U. and Auburger, G. (2008). Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum*, 7: 115-124.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P., Krause, H. M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*, 131: 174-187.
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J. and Gitler, A. D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.*, 201(3): 361-372.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, L. Y, Geer, R. C. et al. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.*, 41: D348-52.
- Medioni, C., Mowry, K. and Besse, F. (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development (Cambridge, England)*, 139(18): 3263-3276.

- Nadzirin, N. and Firdaus-Raih, M. (2012). Proteins of unknown function in the Protein Data Bank (PDB): an inventory of true uncharacterized proteins and computational tools for their analysis. *International journal of molecular sciences*, 13(10): 12761-12772.
- Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M. L., Lehrach, H. and Krobitsch, S. (2007). Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol. Biol. Cell*, 18(4):1385-96.
- Palacios, I. M. and St Johnston, D. (2001). Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 569-614.
- Retief, J. D. (2000). Phylogenetic Analysis Using PHYLIP. In: Misener S., Krawetz S.A. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods Mol. Biol.*, 132. Humana Press, Totowa, NJ.
- Shaw, S. L. and Quatrano, R. S. (1996). The role of targeted secretion in the establishment of cell polarity and the orientation of the division plane in *Fucus* zygotes. *Development*, 122: 2623-2630.
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P. and Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.*, 31(1): 258-261.
- Wong, K. C. (2019). Big data challenges in genome informatics. *Biophys. Rev.*, 11(1): 51-54.

Evolutionary relationships of the *ATAXIN-2* protein domain structure in plants: A possible insight into the involvement of this protein in localized translation in rice (*Oryza sativa*) plant embryogenesis process

Sh. heidari¹, P. heidari², B. Heidari^{3*}

Accepted: 2021.09.19

Received: 2022.05.09

Abstract

Introduction: With the development of high-throughput sequencing technologies, sequence data is collected at a high rate and their functional annotation remains a major challenge. The *ATXN2* gene encodes a protein with an unknown function in rice (*Oryza sativa*). The aim of this study was to determine the structure of the domain and predict the function of this protein. **Methods:** The sequence motif phylogenetic tree with 164 *ATAXIN-2* amino acid sequences from 45 plant species was analyzed by MEME Suite and Phylip software. **Results and discussion:** The results revealed two general classes of *ATAXIN-2* proteins. The absence of the LsmAD domain in one class may confer distinct functional characteristics compared to another *ATAXIN-2* class. In this study, the function of *ATAXIN-2* was found to be RNA binding protein that plays a role in the regulation of cytoplasmic mRNA in rice embryogenesis. Findings from this study could be the basis for research on the function of this protein in targeting separate subsets of mRNA to subcellular locations in plants, which are recruited by embryonic bipolar cells to establish specific functional compartments.

Keywords: Local translation, Phylogenetics, Prediction of function, RNA-binding proteins

1. Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Computer Engineering, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

(*Corresponding author: b_heidari@iauksh.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

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

doi 10.22051/JAB.2021.34309.1398

مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) بر

باکتری های بیماری زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و بیماری زای

انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی)

مسعود حیدری زاده^{۱*}، مهدیه همتی^۲، مراحم آشنگر^۳

چکیده

مقدمه: رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) گیاهی دارویی با ارزش است. این پژوهش با هدف مقایسه ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی و اسانس برگ گیاه رزماری در برابر پاتوژن های گیاهی و انسانی انجام گرفت. روش ها: ترکیبات عصاره متانولی و اسانس برگ رزماری با GC- Mass شناسایی و اثرات ضد باکتری اسانس و عصاره با روش انتشار دیسک و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس و عصاره ی رزماری اندازه گیری شد. برای ارزیابی آماری داده ها از آنالیز واریانس و آزمون دانکن استفاده شد. **نتایج و بحث:** نتایج نشان داد آلفا-پینن، ورنون، بورنیل استات، کامفور، کامفن، کاریوفیلن، ال- بورنیول، لیمونن، بتامیرسین، بتاپینن ترکیبات اصلی عصاره و آلفا-پینن، کامفور، بورنیل استات، اوکالپیتول، کامفن، کاریوفیلن، لیمونن، بتاپینن، ترکیبات اصلی اسانس برگ رزماری هستند. عصاره رزماری بیشترین و کمترین اثر مهارکنندگی را به ترتیب در برابر اشرشیاکلی و زانتوموناس کامپستریس نشان داد. در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کامپستریس نتایج نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان اسانس در برابر این سه سویه بوده و

۱. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران (* نویسنده مسئول: haidarizadeh@uok.ac.ir).

۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو مهدیه همتی با راهنمایی دکتر مسعود حیدری زاده و مشاوره دکتر مراحم آشنگر اعضای هیئت علمی دانشگاه کردستان می باشد.

توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن های انسانی بطور معنی دار بیشتر از پاتوژن های گیاهی است. می توان از عصاره و اسانس گیاه رزماری به عنوان راهکاری برای کنترل عوامل بیماری زای گیاهی و انسانی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آلفا پینن، اثرات ضد باکتریایی، مهارکنندگی، کافور

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان یک ظرفیت بسیار ارزشمند برای تولید بسیاری از داروها، آفت کش ها و نگهدارنده های طبیعی در فرآورده های غذایی، جایگزین مناسبی برای فرآورده های شیمیایی آسیب رسان و با عوارض جانبی متعدد هستند. گیاهان زیادی به دلیل ویژگی های ضد میکروبی آنها مورد استفاده قرار گرفته اند. رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) گیاهی دارویی از خانواده Lamiaceae است که به طور گسترده در سراسر جهان کشت می شود (شکل ۱). اخیراً استفاده از برخی گیاهان دارویی مانند رزماری و اسطوخدوس در فضای سبز شهری به عنوان گیاه زینتی متداول شده است (Saharkhiz et al. 2010). رزماری در تولید ترکیبات نگهدارنده مواد غذایی، مواد معطر و همچنین طعم دهنده مورد توجه و مورد استفاده است. اسانس و عصاره رزماری حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی منحصر به فردی است که این ترکیبات شیمیایی و متابولیت های ثانویه بسته به شرایط محیطی به طور قابل توجهی متفاوت هستند (Hamidpour et al. 2017).

تحقیقات متمرکز بر شناسایی و معرفی ترکیبات ضدباکتریایی طبیعی با منشا گیاهی و کاربردهای احتمالی آنها برای کنترل بیماری های باکتریایی در انسان و همچنین در گیاهان در حال افزایش است. بیماری های ناشی از باکتری های بیماری زای گیاهی تهدیدی برای امنیت غذایی جهانی هستند. *Xanthomonas* یک جنس بزرگ از باکتری های گرم منفی است که باعث ایجاد بیماری در چندین گیاه شده و موجب تلفات قابل توجهی در بهره وری و کیفیت برداشت می شوند (Bajpai et al. 2011).

لکه برگ باکتریایی (Bacterial leaf spot (BLS ناشی از *Xanthomonas campestris pv* و یکی از بیماری های مهم اقتصادی کاهو است. اولین نشانه های BLS عموماً در حاشیه برگ ظاهر و منجر به تشکیل بافت آبکی می شود که در نهایت به بافت نکروتیک تبدیل می شود. بنابراین علائم BLS بر ارزش بازاری، کاهش کیفیت و افزایش تلفات پس از برداشت کاهو تأثیر می گذارد. کنترل BLS کاهو بسیار دشوار است زیرا تعداد کمی آفت کش برای درمان آن ثبت شده است (Nicolas et al. 2018).

گونه پاتوژن گیاهی *Pseudomonas syringae* باعث ایجاد بیماری در صدها گونه از گیاهان تک لپه ای (گندم، ذرت)، گیاهان علفی و گیاهان چوبی در سراسر جهان می شود (Lamichhane et al. 2018). گره سیاه باکتری یک بیماری جو و گندم ناشی از *Sudomonus* سیرینگیه است که از طریق بذر آلوده منتقل می شود (Mori et al. 2019). معرفی و شناسایی ترکیبات طبیعی مهار کننده این باکتری یک هدف پژوهشی با ارزش است.



شکل ۱- تصاویری از گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)
Figure 1. Pictures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. بیشتر سویه‌های اشریشیاکلی، بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند $O_{157}:H_7$ موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند (Malakar, 2014). استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس (سرده) استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس، گستره وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده پوستی (مانند جوش‌دانه، کورک، کفگیرک، گل‌مژه و آبسه) گرفته تا بیماری‌های تهدید کننده مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است. هر سال ۵۰۰ هزار نفر در بیمارستان‌های ایالات متحده آمریکا به عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس مبتلا می‌شوند (Kluytmans et al. 1997).

با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی که بتدریج در این میکروارگانیسم‌ها بوجود آمده است و همچنین به دلیل اهمیت و ضرورت شناسایی و معرفی منابع جدید طبیعی ضد باکتریایی در برابر این عوامل بیماری‌زا مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه رزماری انجام گرفت.

هدف از این پژوهش مقایسه اثرات ضد باکتریایی و همچنین مقایسه حساسیت و یا مقاومت پاتوژن‌های گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی) به اسانس و عصاره برگ گیاه رزماری است. در این زمینه گزارشی مشاهده نگردید. مقایسه ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و عصاره برگ گیاه رزماری نیز از اهداف این تحقیق است.

در این پژوهش از برگ های گیاه رزماری (*Rosmarinus Officinalis*) اسانس و عصاره متانولی تهیه شد و ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره و اسانس برگ گیاه رزماری با استفاده از روش GC-Mass آنالیز گردید. فعالیت ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری در برابر گونه های مختلف باکتریایی از طریق اندازه گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار دیسک بر سطح آگار بررسی و برای انجام آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC (Minimum inhibitory concentration) از محیط لوریا برتانی براث و غلظت های مختلف عصاره و اسانس برگ رزماری استفاده شد.

جدول ۱- ویژگیها و بیماریزایی سویه های باکتریایی مورد استفاده در آزمایش اثرات ضد میکروبی
Table 1- Characteristics and pathogenicity of bacterial strains used in antimicrobial testing

بیماری زایی	ویژگی	سویه باکتریایی
مسمومیت غذایی، کفگیرک، سندرم پوستی فلسی شونده استافیلوکوکی (Kluytmans et al. 1997)	کوکسی گرم مثبت	استافیلوکوکوس اورئوس
عفونت ادراری، اسهال خونی (Malakar, 2014)	باسیل گرم منفی	اشیریشیا کلی
گره سیاه باکتری، بلایت (لکه های درشت و نامنظم بافت مرده به رنگ سفید تا زرد روی برگ) (باکتریایی گندم (Mori et al., 2019)	باکتری گرم منفی	سودوموناس سیرینگه
پوسیدگی سیاه در گیاهان رده براسیکا (Bajpai et al. 2011)	میله ای گرم منفی	زانتوموناس کمپسترینس

مواد و روش ها

روش عصاره گیری از رزماری (*Rosmarinus Officinalis*)

برگ رزماری در فصل رویشی سال ۹۶ از محوطه دانشگاه کردستان، سنندج در موقعیت (E ۴۶°، ۹۹'، ۷۳" N & ۳۵°، ۲۷'، ۸۳") با ارتفاع ۱۵۱۲ متر از سطح دریا جمع آوری شد. بعد از شستشوی کامل در سایه خشک و برگ های گیاه آسیاب شده و با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ سی سی متانول خالص (Merck) به روش سوکسله عصاره گیری شد. عصاره ها به کمک دستگاه تقطیر دوار (مدل Tecan sunrise) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده، برای حذف کامل حلال، عصاره در یک ظرف شیشه ای و در زیر هود قرار داده شده تا حلال به طور کامل تبخیر شود. سپس از رسوب باقیمانده غلظت های مختلف (۱۰۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ گرم بر لیتر) تهیه گردید. برای هر یک از آزمایش ها عصاره تازه تهیه شد (Haidarizadeh et al. 2020).

روش اسانس گیری از رزماری

اسانس از طریق تقطیر آبی از برگ گیاه رزماری با استفاده از دستگاه Clevenger با روش زیر به دست آمد. گونه رزماری در فصل رویشی سال ۹۶ از محوطه دانشگاه کردستان جمع آوری شد. بعد از شستشوی کامل در سایه خشک شد. برگ های گیاه آسیاب شده و با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر در بالن دستگاه ریخته شده سپس اجزای دستگاه وصل شد. با اعمال

حرارت از طریق هیتر به مدت چهار تا پنج ساعت اسانس گیاه به طور کامل استخراج شد. پس از پایان کار اسانس استخراج شده، آبگیری شد. به منظور آبگیری اسانس از سولفات سدیم انیدرید استفاده شد (Haidarizadeh et al. 2020).

شناسایی و اندازه گیری ترکیبات برگ رزماری با استفاده از روش GC-Mass

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های عصاره

مقدار ۰/۲ میکرولیتر از عصاره یا اسانس به دستگاه GC-Mass تزریق و درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده پس از جداسازی به همراه شاخص بازداری محاسبه شد. در نهایت شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره با استفاده از اندیس بازداری (Retention Index)، بررسی طیف‌های جرمی و پیشنهاد‌های کتابخانه کامپیوتر دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیب‌های استاندارد انجام شد (Haidarizadeh et al. 2018).

دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی GC/MS فوق‌سریع Agilent مدل ۷۸۹ cA متصل به طیف‌سنج جرمی با ستون HP5 به طول ۳۰ متر قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ریزی حرارتی از ۴۵ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۸۰ درجه و درجه حرارت ترانسفرلاین ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت (Haidarizadeh et al. 2018).

اثرات ضد باکتریایی عصاره رزماری

بررسی فعالیت ضد میکروبی، پس از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار، بررسی آنتی باکتریال به روش انتشار دیسک (Disk diffusion) انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش، عصاره متانولی برگ گیاه رزماری در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) به روش سوکسله تهیه شد. متانول در درصدهای مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵) به عنوان کنترل منفی تهیه شد. سوسپانسیون میکروبی از تک کلونی باکتری‌های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس* IBRC-M 10690، *شریشیا کلی* IBRC-M 10871، *زانتوموناس کامپستریس* IBRC-M 10644 و *سودوموناس سیرینگه* IBRC-M 10702) با کدورت معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنها بطور مجزا و به صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون، کشت داده شدند. پس از آماده‌سازی محیط کشت و استریل کردن آن و قبل از سرد شدن کامل، حدود ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت‌های استریل ریخته شد. از عصاره متانولی برگ گیاه رزماری، غلظت‌های هیدروالکلی مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) تهیه شد. از متانول خالص درصدهای (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ متانول) به عنوان کنترل

منفی گذاشته شدند. دیسک های بلانک استریل به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت های مختلف عصاره و کنترل منفی قرار داده شدند. از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی یکنواخت کشت داده شدند. دیسک ها به مدت ۵ دقیقه از غلظت ها بیرون آورده شدند تا آب اضافی آن ها تبخیر و خشک شود. سپس، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پلیت های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در مقابل نور اندازه گیری شد. کشت باکتری و دیسک گذاری در سه تکرار انجام شد. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن RIZD (Relative inhibitory zone diameter) ، درصد قطر نسبی ناحیه مهار و IZD قطر ناحیه مهار (inhibitory zone diameter) بر حسب میلی متر است (Haidarizadeh et al. 2020).

$$RIZD = (IZD_{zon\ diameter} - IZD_{negative\ control}) / IZD_{zon\ diameter} \text{ (درصد)}$$

سویه های باکتریایی مورد مطالعه به صورت کشت فعال از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شدند.

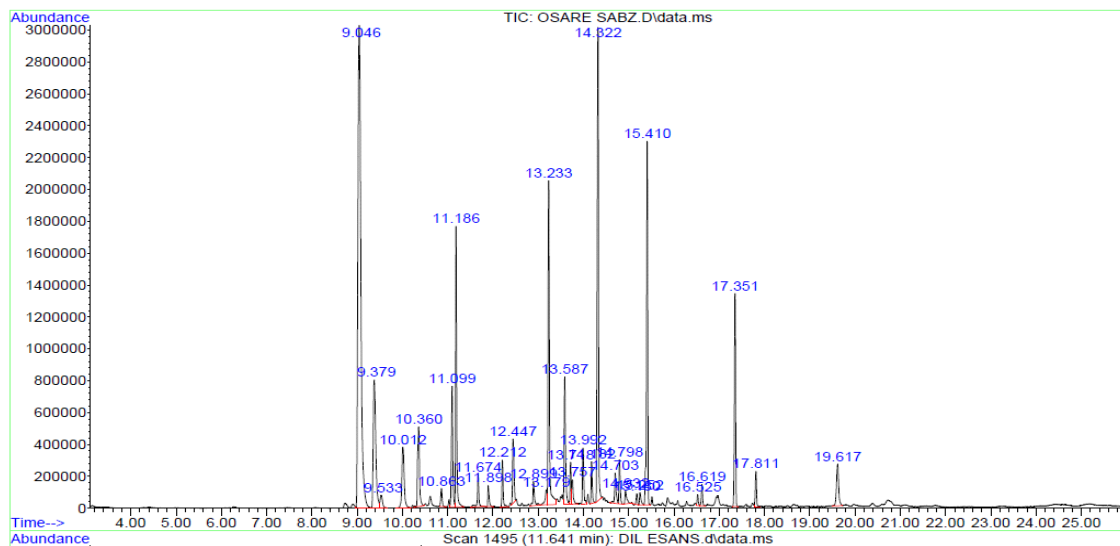
آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

برای انجام آزمون MIC از محیط لوریا برتانی براث Luria Bertani broth در میکروپلیت ۹۶ خانه و همچنین غلظت های مختلفی از عصاره و اسانس استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده (با تراکم ۰/۵ مک فارلند) به چاهک های الیزا حاوی ۱۴۰ میکرولیتر لوریا برتانی براث شامل غلظت های مشخصی از اسانس و عصاره ی رزماری (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ گرم در لیتر) و همچنین غلظت یک گرم در لیتر کلرامفنیکل (به عنوان کنترل مثبت) اضافه گردید. کلرامفیکل در برابر طیف گسترده ایی از باکتری های متنوع مورد استفاده قرار می گیرد به دلیل تنوع باکتری های مورد بررسی در این پژوهش از این آنتی بیوتیک عنوان کنترل استفاده شد. پلیت های حاوی باکتری های پاتوژن انسانی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و باکتری های پاتوژن گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. بعد از پایان دوره ی گرماگذاری به تمام خانه های هر پلیت، ۱۰ میکرولیتر محلول ۲، ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت اولیه ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر اضافه و به مدت سه ساعت گرمخانه گذاری شد. در خانه هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد ظرف مدت کمتر از ۳ ساعت رنگ قرمز ایجاد می شود. دلیل این امر این است که باکتری های فعال و زنده به کمک آنزیم هیدروژناز خود تری فنیل تترازولیوم کلراید را به نمک های فورمازان با رنگ قرمز احیاء می نمایند. پس از گذشت سه ساعت گرماگذاری، میکروپلیت ها از گرمخانه خارج و از نظر ایجاد رنگ قرمز بررسی شد. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی رخ نداد و رنگ قرمز تشکیل نشد، به عنوان MIC برای باکتری های مورد بررسی در نظر گرفته شد (Eloff, 1998).

نتایج و بحث

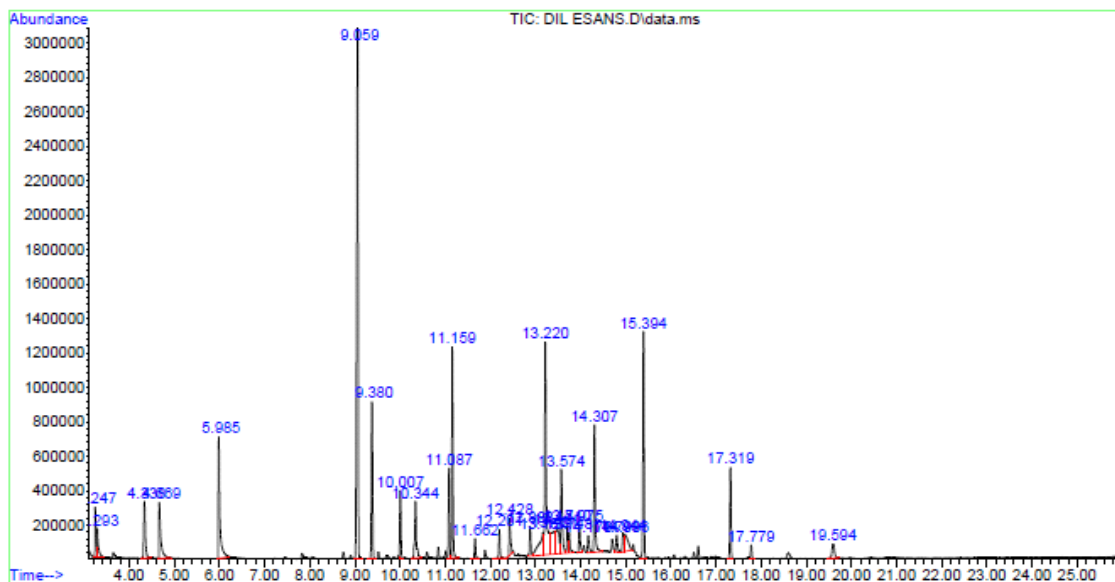
نتایج حاصل از GC – Mass در نمودار شکل ۲ دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی

رزماری و در نمودار شکل ۳ آنالیز اسانس رزماری نشان داده شده است.



شکل ۲ – دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی برگ گیاه رزماری

Figure 2. Diagram obtained from GC-Mass analysis of methanolic extract of rosemary leaves



شکل ۳ – دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass اسانس برگ گیاه رزماری

Figure 3. Diagram obtained from GC-Mass analysis of rosemary leaf essential oil

جدول ۲- ترکیبات احتمالی موجود در عصاره متانولی برگ گیاه رزماری به دست آمده از آنالیز GC-Mass

Table 2: Possible compounds in methanolic extract of rosemary leaves obtained from GC-Mass analysis

شماره پیک	فرمول مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	C ₁₀ H ₁₆	۹/۰۴۶	۲۷/۲۷۵	alpha.Pinene
۲	C ₁₀ H ₁₆	۹/۳۷۹	۶/۰۸۳	Camphene
۳	C ₁₀ H ₁₄	۹/۵۳۳	۰/۵۸۰	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
۴	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۰۱۲	۲/۶۹۱	beta.Pinene
۵	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۳۶۰	۲/۸۴۹	beta.Myrcene
۶	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۸۶۳	۰/۴۷۶	alpha.Terpinen
۷	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۰۹۹	۳/۱۰۵	Limonene
۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱/۱۸۶	۵/۶۸۹	Eucalyptol
۹	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۶۷۶	۰/۸۹۱	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
۱۰	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱/۸۹۸	۰/۴۹۲	beta. Terpeneol, cis.
۱۱	C ₁₀ H ₁₆	۱۲/۲۱۲	۱/۰۶۱	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
۱۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۲/۴۴۷	۱/۷۰۱	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
۱۳	C ₉ H ₁₆ O	۱۲/۸۹۹	۰/۷۱۱	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
۱۴	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۱۷۹	۰/۷۹۰	Verbenol (2-pine-4-ol)
۱۵	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۲۳۳	۷/۸۰۰	Camphor, (1R,4R)-(+)-
۱۶	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۵۸۷	۳/۳۱۸	.L-borneol
۱۷	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۷۱۸	۰/۸۹۳	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl, (1.alpha.2.beta.5.alpha.)-
۱۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۷۵۷	۰/۶۱۴	Terpeneol
۱۹	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۹۹۲	۱/۳۷۶	p-menth-1-en-8-ol
۲۰	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۴/۱۸۲	۰/۹۲۳	3-Cyclopentene-1-ethanol, 2,2,4-trimethyl-
۲۱	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۴/۳۲۲	۱۱/۹۴۴	Verbenone
۲۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۴/۷۰۳	۰/۸۶۶	Bicyclo[4.1.0]heptan-3-ol, 4,7,7-trimethyl, (1.alpha.3.alpha.4.alpha.6.alpha.)-
۲۳	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۱۴/۷۹۸	۱/۰۱۳	Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-dimethyl, acetate
۲۴	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۴/۹۳۲	۰/۴۳۰	Nerol
۲۵	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	۱۵/۱۸۰	۰/۲۲۱	3,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl, methyl ester, (Z)-
۲۶	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۵/۲۵۲	۰/۳۴۸	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl), (S)-
۲۷	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۱۵/۴۱۰	۸/۰۲۰	Bornyl acetate
۲۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۶/۵۲۵	۰/۲۴۸	trans-Shisool
۲۹	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۶/۶۱۹	۰/۵۱۰	trans-Shisool
۳۰	C ₁₅ H ₂₄	۱۷/۳۵۱	۴/۷۹۵	Caryophyllene
۳۱	C ₁₅ H ₂₄	۱۷/۸۱۱	۰/۸۶۰	alpha.Caryophyllene
۳۲	C ₁₅ H ₂₄ O	۱۹/۶۱۷	۱/۷۲۹	Caryophyllene oxide

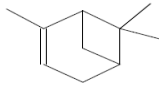
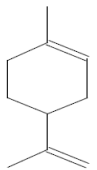
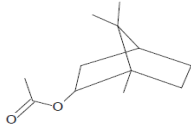
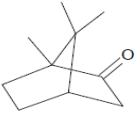
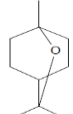
جدول ۳- ترکیبات احتمالی موجود در اسانس برگ گیاه رزماری به دست آمده از آنالیز GC-Mass
Table 3: Possible compounds in rosemary leaf essential oil obtained from GC-Mass analysis

شماره پیک	فرمول مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	C ₅ H ₁₀ O ₂	۳/۲۴۷	۱/۳۴۹	Propanoic acid, ethyl ester
۲	C ₅ H ₁₀ O ₂	۳/۲۹۳	۱/۱۱۳	n-Propyl acetate
۳	C ₇ H ₈	۴/۳۳۸	۲/۵۱۱	Toluene
۴	C ₆ H ₁₂ O ₂	۴/۶۶۹	۲/۷۰۳	Acetic acid, 2-methylpropyl ester
۵	C ₆ H ₁₂ O ₂	۵/۹۸۵	۵/۵۷۱	Acetic acid, butyl ester
۶	C ₁₀ H ₁₆	۹/۰۵۹	۲۰/۱۰۷	.alpha.Pinene
۷	C ₁₀ H ₁₆	۹/۳۸۰	۴/۹۷۲	Camphene
۸	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۰۰۷	۲/۰۸۳	.beta.-pinene
۹	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۳۴۴	۲/۴۴۰	.beta.Myrcene
۱۰	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۰۸۷	۲/۷۶۹	Limonene
۱۱	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱/۱۵۹	۶/۲۶۶	Eucalyptol
۱۲	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۶۶۲	۰/۶۱۹	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
۱۳	C ₁₀ H ₁₆	۱۲/۲۰۱	۰/۹۷۰	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
۱۴	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۲/۴۲۸	۱/۳۵۳	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
۱۵	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۲/۸۸۳	۰/۹۸۲	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-one, 2,7,7-trimethyl-
۱۶	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۳/۱۶۷	۲/۸۵۷	1,2,3-Propanetriol, monoacetate
۱۷	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۲۲۰	۹/۸۹۱	camphor
۱۸	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۳/۴۲۱	۲/۳۶۱	1,2,3-Propanetriol, monoacetate
۱۹	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۳/۴۸۱	۲/۴۶۶	1,2,3-Propanetriol, monoacetate
۲۰	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۵۷۴	۳/۵۷۶	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl, (1S-endo)-
۲۱	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۷۱۰	۰/۸۹۰	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl, (1.alpha.2.beta.5.alpha.)-
۲۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۷۴۸	۰/۷۴۰	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
۲۳	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۳/۹۷۵	۱/۰۷۷	p-menth-1-en-8-ol
۲۴	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۴/۱۷۰	۰/۷۵۳	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl, (1S-endo)-
۲۵	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۴/۳۰۷	۴/۷۴۸	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-
۲۶	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۱۴/۷۹۹	۰/۷۵۰	Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-dimethyl, acetate
۲۷	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	۱۴/۹۴۴	۰/۸۸۹	Decanoic acid, 3-hydroxy, methyl ester
۲۸	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۴/۹۸۶	۱/۶۸۲	1,2,3-Propanetriol, monoacetate
۲۹	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۱۵/۳۹۴	۷/۱۰۲	Bornyl acetate
۳۰	C ₁₅ H ₂₄	۱۷/۳۱۹	۲/۹۲۴	Caryophyllene
۳۱	C ₁₅ H ₂₄	۱۷/۷۹۹	۰/۴۸۲	alpha.Caryophyllene
۳۲	C ₁₅ H ₂₄ O	۱۹/۵۹۴	۱/۰۰۳	Caryophyllene oxide

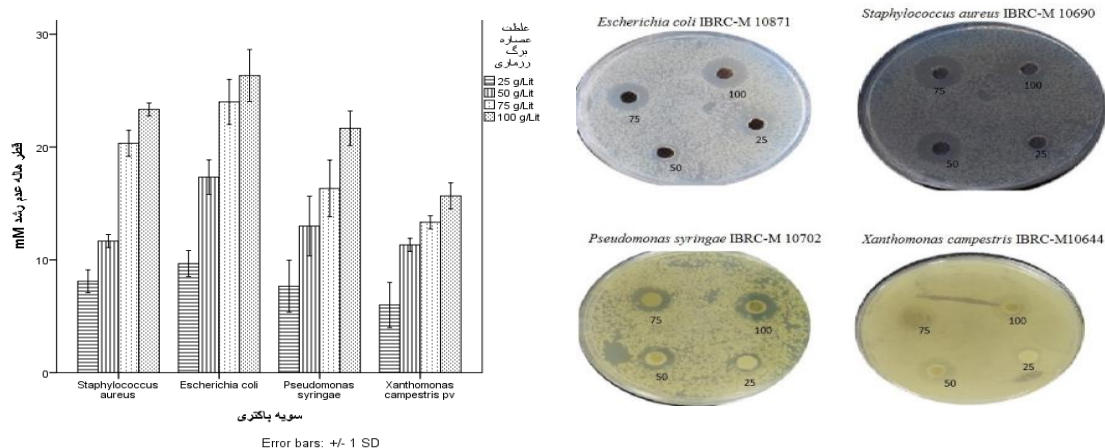
بر اساس نتایج جدول ۲ ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره رزماری شامل آلفا-پینن (۲۷/۲۷۵ درصد)، ورنون (۱۱/۹۴۴ درصد)، بورنیل استات (۸/۰۲ درصد)، کافور (۷/۰۰۸ درصد) و ترکیبات اصلی اسانس بر اساس نتایج جدول ۳ شامل: آلفا-پینن (۲۰/۱۰۷ درصد)، کافور (۹/۸۹۱ درصد)، بورنیل استات (۷/۱۰۲ درصد) و اکالیپتول (۶/۲۶۶ درصد) است. آلفا-پینن هم در عصاره و هم در اسانس بالاترین میزان درصد را داشته و بورنیل استات و کافور هم از اجزاء اصلی تشکیل دهنده هر دو

بوده ولی درصد آن ها متفاوت است. در جدول ۳ ترکیبات احتمالی موجود در اسانس برگ گیاه رزماری بر اساس آنالیز GC-Mass نشان داده شده است. در جدول ۴ مقایسه ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره و اسانس انجام شده است.

جدول ۴- مقایسه ترکیبات عصاره و اسانس رزماری
Table 4- Comparison of rosemary extract and essential oil compositions

ترکیبات اصلی	آلفا پینن	لیمونن	بورنیل استات	کامفور	اکالیپتول
عصاره (درصد)	۲۷/۲۷۵	۳/۱۰۵	۸/۰۲	۷/۸	۵/۶۸۹
اسانس (درصد)	۲۰/۱۰۷	۲/۷۶۹	۷/۱۰۳	۹/۸۹	۶/۲۶
ساختار شیمیایی					
فرمول مولکولی	C ₁₀ H ₁₆ (ترکیبات ترپنی، مونوترپن)	C ₁₀ H ₁₄ O (ترکیبات ترپنی، مونوترپن)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ (استر)	C ₁₀ H ₁₆ O (کتون)	C ₁₀ H ₁₈ O (ترکیبات مونوترپنی، اتری)

نتایج اثر ضد باکتریایی عصاره و اسانس برگ رزماری بر روی گونه های باکتریایی بیماری زای انسانی و گیاهی
نتایج اثر عصاره رزماری علیه سویه های باکتریایی به روش انتشار در دیسک



شکل ۴- اثر مهاری عصاره رزماری در برابر سویه های باکتریایی به روش انتشار دیسک

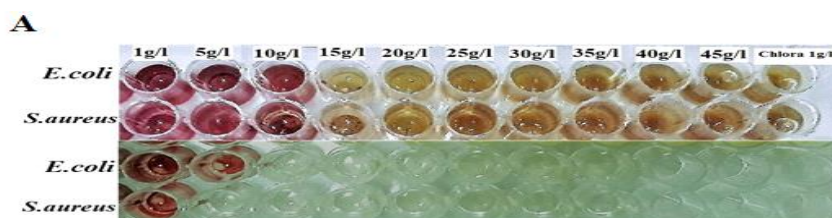
Figure 4. Inhibitory effect of rosemary extract against bacterial strains by Disk diffusion methods

شکل ۴، اثر مهاری عصاره رزماری را در برابر سویه های باکتریایی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک نشان می دهد. نتایج به دست آمده، نشان دهنده اثر مهاری عصاره رزماری در برابر سویه های مختلف باکتری های بیماری زا است. در این نمودار اثر چهار غلظت (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ گرم بر لیتر) عصاره متانولی رزماری بر درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی در مورد چهار سویه باکتری مورد مطالعه نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره در مورد هر چهار سویه، قطر ناحیه مهار افزایش نشان می دهد. عصاره متانولی رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر باکتری/شریشیا کلی

و/استافیلوکوکوس/اورئوس (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۳ تا ۲۶ میلی‌متر) نشان داد. کمترین میزان مهارکنندگی در برابر *زانتوموناس کامپستریس* (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر) بود. اثر مهاری در برابر سایر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه نیز با میانگین قطر هاله عدم رشد به اندازه ۸ تا ۲۴ میلی‌متری نشان داده شد. نتایج آنالیز واریانس مقایسه میانگین‌ها در مورد فاکتور باکتری‌های مورد بررسی (چهار باکتری) با F برابر ۴۵/۸۷۰ و در مورد فاکتور غلظت عصاره (چهار غلظت) با F برابر ۱۶۵/۲۰۴، فرضیه معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها را در مورد هر دو عامل کاملاً تأیید نموده و نشان می‌دهد از نظر آماری غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ رزماری بر مهار رشد هر چهار باکتری مورد مطالعه اثر معنی‌دار در هر دو سطح یک درصد و پنج درصد نشان می‌دهد. آزمون تعقیبی دانکن برای گروه بندی میانگین‌ها، باکتری‌ها را در سه سطح گروه بندی می‌نماید. *اشریشیا کلی* بیشترین حساسیت و *زانتوموناس کامپستریس* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره نشان می‌دهد. آزمون دانکن *استافیلوکوکوس/اورئوس* و *سودوموناس سیرینگه* را در یک سطح گروه بندی می‌نماید. از نظر فاکتور غلظت عصاره نیز آزمون دانکن میانگین‌ها را در چهار سطح گروه‌بندی نموده و اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظت عصاره برگ رزماری را تأیید می‌نماید.

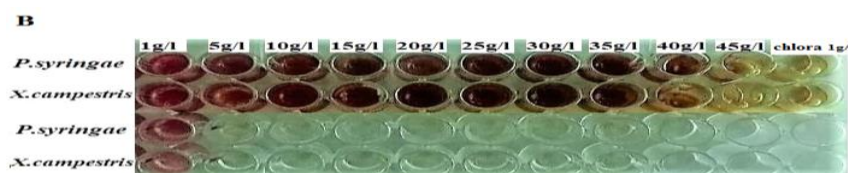
نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره و اسانس برگ رزماری

همان‌گونه که در شکل ۵ و ۶ مشخص است، هر کدام از سویه‌های باکتریایی دارای MIC مختص به خود بوده که مقادیر آن در جدول ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- تعیین میزان MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای انسانی

Figure 5. Determination of MIC of rosemary extract and essential oil against human pathogenic bacterial strains



شکل ۶ - تعیین میزان MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای گیاهی

Figure 6. Determination of MIC of rosemary extract and essential oil against plant pathogenic bacterial strains

جدول ۵ - مقایسه MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه های باکتریایی بیماری زا

Table 5. Comparison of MIC of rosemary extract and essential oil against pathogenic bacterial strains

Pathogenic bacteria	MIC (mg/ml) Extract	MIC (v/v) Essential oil
IBRC-M 10871 <i>E. coli</i>	۱۰	۵
IBRC-M 10690 <i>S. aureus</i>	۱۰	۱
IBRC-M 10702 <i>P. syringae</i>	۴۰	۱
IBRC-M 10644 <i>X. campestris</i>	۴۰	۱

ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و عصاره گونه های مختلف گیاهی با استفاده از طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی گاز (GC-MS) در پژوهش های متعددی گزارش شده است (Hcini et al., 2013). در یک تحقیق سه ترکیب ۱ و ۸ سینول، کافور و آلفا پینن به عنوان ترکیبات اصلی اسانس رزماری گزارش شده است (Takayama et al., 2016). در یک پژوهش دیگر در اسانس رزماری جمع آوری شده از (Taizhou, China) ۲۲ ترکیب شناسایی شده که ۸ سینول (درصد ۲۶/۵۴)، آلفا-پینن (۲۰/۱۴ درصد)، کامفور (۱۲/۸۸ درصد) کامفن (۱۱/۳۸ درصد) ترکیبات اصلی معرفی شده اند (Jiang et al., 2011). در پژوهشی دیگر در اسانس رزماری جمع آوری شده از Ouezzane (North-West of Morocco) ۲۹ ترکیب شناسایی شده که مونوترپن های اکسیژنه (درصد ۶۳/۷۴) و مونوترپن های هیدروکربن (۲۱/۲۳ درصد)، شامل ۱ و ۸ سینول (درصد ۲۳/۶۷)، آلفا-پینن (۱۴/۰۷ درصد)، کامفور (۱۸/۷۴ درصد) و بورنیل (۵/۴۶ درصد) ترکیبات اصلی معرفی شده اند (Bouyahya et al., 2017). نکته حائز اهمیت این است که نوع و میزان ترکیبات و به تبع آن میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس به محل کاشت گیاه وابسته است (Jordán et al., 2013).

شکل های (۲) و (۳) دیاگرام و آنالیز ترکیبات اسانس و عصاره برگ رزماری بدست آمده توسط دستگاه آنالیز GC-Mass را نشان می دهند. جداول (۲) و (۳) نیز ساختار مولکولی و ترکیبات احتمالی برآورد شده برای این اجزای شیمیایی شناسایی شده را نشان می دهند. در جدول (۴) مقایسه ترکیبات اصلی عصاره و اسانس از نظر مقدار و ساختار نشان داده شده است. نتایج جدول ۲ نشان می دهد که ۳۲ ترکیب شیمیایی موجود در عصاره متانولی برگ رزماری براساس بیشترین شباهت احتمالی به ترکیبات استاندارد معرفی شده در کتابخانه نرم افزار دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی، شناسایی و درصد و مقدار آنها نیز محاسبه شده است. آلفا-پینن (۲۷/۲۷۵ درصد)، وربنون (۱۱/۹۴۴ درصد)، بورنیل استات (۸/۰۲ درصد)، کامفور (۷/۰۰۸ درصد)، کامفن (۶/۰۸۳ درصد)، اوکالیپتول (۵/۶۸۹ درصد)، کاریوفیلین (۴/۷۹۵ درصد)، البورنیول (۳/۲۱۸ درصد)، لیمونن (۳/۱۰۵ درصد)، امیرسین (۲/۸۴۹ درصد)، بتا پینن (۲/۶۹۱ درصد)، ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در عصاره متانولی برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار است.

نتایج جدول ۳ نشان می دهد که ۳۲ ترکیب شیمیایی در اسانس برگ رزماری بر اساس بیشترین شباهت به ترکیبات استاندارد موجود در کتابخانه نرم افزار دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی و درصد و مقدار آنها نیز محاسبه شده است.

آلفا-پینن (۲۰/۱۰۷ درصد)، کامفور (۹/۸۹۱ درصد)، بورنیل استات (۷/۱۰۲ درصد)، اوکالیپتول (۶/۲۶۶ درصد)، کامفن (۴/۹۷۲ درصد)، کاریوفیلین (۲/۹۲۴ درصد)، لیمونن (۲/۷۶۹ درصد)، بتاپینن (۲/۰۸۳ درصد)، و چندین مشتق ترکیبات دو حلقه ایی ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در اسانس برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار است.

مقایسه ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره رزماری در جدول ۴ نشان می دهد که آلفا-پینن، کامفور، کامفن، اوکالیپتول، کاریوفیلین، بتاپینن، لیمونن و بورنیل استات ترکیبات عمده و شناخته شده در عصاره و اسانس رزماری هستند هرچند درصد آنها با هم متفاوت است.

هرچند تشابه قابل توجهی بین ترکیبات گزارش شده اسانس رزماری در این پژوهش با دیگر پژوهش های مرتبط مشاهده می شود تفاوت در نوع و درصد ترکیبات گزارش شده را می توان به شرایط اقلیمی، عرض و طول جغرافیایی، ارتفاع محل رویش و کشت و همچنین تا حدودی ژنوتیپ واریته و گونه مورد مطالعه مرتبط دانست.

فراورده های گیاهی طبیعی و فعال بیولوژیکی مانند اسانس و عصاره می توانند جایگزین سموم غیرطبیعی و شیمیایی سنتزی باشند و به عنوان ترکیبات جدید و مؤثر در کنترل میکروارگانیسم های بیماری زای گیاهی استفاده گردند. اسانس ها، فراورده های معطر و فرار نتیجه متابولیسم ثانویه یک گیاه معطر بوده و به طور معمول در سلول یا گروه های سلولی خاص تشکیل می شوند. اسانس ها عمدتاً از مونوترپن ها، سزکوئی ترپن ها و مشتقات اکسیژنه آنها (الکل، آلدئید، استر، کتون، فنل و اکسید) تشکیل شده اند. اثرات ضد میکروبی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی لیشمانیا (antileishmanial)، آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره رزماری در پژوهش های متعددی ارزیابی شده است. در یک بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری در برابر سه باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و سه باکتری گرم منفی (پروتئوس و لگاریس، پسدوموناس ائروجینوزا و اشریشیا کلی) و دو قارچ (کاندیدا آلبیکانس و آسپیرژیلوس نایژر) ارزیابی گردید. در مقایسه با اسانس چند گیاه مورد مطالعه و پنی سیلین، اسانس رزماری بیشترین اثر مهارکنندگی را در برابر همه سویه های باکتریایی نشان داد. همچنین اسانس رزماری در برابر قارچ کاندیدا آلبیکانس اثر ضد قارچی قابل توجه نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری در برابر همه میکرو ارگانیسم ها در محدوده ۰/۰۳ - ۱ درصد (v/v) گزارش گردیده است. بر اساس نتایج این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری ۰/۱ است در صورتی که حداقل غلظت مهارکنندگی اجزای اصلی اسانس یعنی آلفا-پینن و ۱ و ۸ سینئول ۰/۵ است (Jiang et al. 2011). در پژوهشی دیگر حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ۲mg/mL و در برابر اشریشیا کلی ۱mg/mL گزارش شده است (Bouyahya et al. 2017). در یک مطالعه دیگر میانگین قطر ناحیه مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی تحت تاثیر اسانس رزماری با روش انتشار دیسک به ترتیب ۸/۳۳ و ۱۶/۶۷ میلی متر گزارش گردیده است (Gachkar et al. 2007).

شکل ۴ اثر مهاری عصاره رزماری را در برابر سویه های باکتریایی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک نشان می دهد. با افزایش غلظت عصاره در مورد هر چهار سویه باکتری قطر هاله عدم رشد افزایش نشان می دهد که تایید کننده این است که توانایی مهار کنندگی عصاره رزماری وابسته به غلظت بوده و نسبت مستقیم با آن دارد. یعنی هرچه غلظت عصاره بیشتر می شود توانایی مهار رشد و اثر ضد باکتریایی آن افزایش می یابد. هم در غلظت های کم و هم در غلظت های زیاد عصاره رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر /شرشیاکلی نشان می دهد. در مقابل در غلظت های کم و زیاد در مقایسه با چهار سویه باکتری مورد مطالعه عصاره رزماری کمترین اثر مهار کنندگی رشد را در برابر *Z. tomentosus* کمپستریس نشان می دهد.

اسانس رزماری غنی از آلفا پینن بوده و طیف گسترده ای از فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به نمایش گذاشته است (Ojeda-Sana et al. 2013). ۱ و ۸ سینوئول با ایجاد اختلال در غشای سلولی فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتری های بیماری زای گرم منفی نشان می دهند. پتانسیل ضد میکروبی شدید اوژنول، آلفا و بتا پینن نشان می دهد که قادر به مهار رشد باکتری های گرم مثبت هستند (Leite et al. 2007). گزارش شده است که هیدروکربن های مونوترپن از نوع آلفا و بتا پینن از مواد شیمیایی شناخته شده ای هستند که دارای پتانسیل ضد میکروبی هستند (Bajpai et al. 2011). اگر چه مکانیسم عملکرد ترپن ها کاملاً درک نشده است، اما تصور می شود که اختلال غشایی توسط ترکیبات لیپوفیلی را شامل شود (Chudasama & Thaker, 2012). این ترکیبات عوامل ضد میکروبی شناخته شده ای هستند که می توانند برای کنترل عوامل بیماریزای گیاهی استفاده شوند (Silva et al, 2012). بیماری های گیاهی با کاهش کیفیت و کمیت گیاهان و محصولات گیاهی در بازار باعث خسارت اقتصادی جهانی و از بین رفتن محصولات زراعی می شوند (Vu et al. 2017). پاتووارهای از زانتوموناس شناخته شده اند که باعث ایجاد تعداد زیادی از بیماری ها در بسیاری از گیاهان مهم زراعی می شوند (De Britto et al. 2011; Babu et al., 2007). اثر ۱۱ اسانس به عنوان تیمار بذر برای کنترل *Xanthomonas perforans* در گوجه فرنگی و اثر آن بر جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. در روش های آزمایشگاهی تیمار بذر با روغن های اکالیپتوس و رزماری به طور همزمان، باعث مهار رشد *Xanthomonas perforans* و کاهش میزان و شدت BLS در تست های گیاهچه شد. بنابراین، روغن های اکالیپتوس و رزماری را می توان در تیمار بذر برای کنترل BLS در گوجه فرنگی استفاده کرد (تیمار دانه ها با روغن رزماری، نیولی و روغن اوکالیپتوس میزان و شدت BLS را در گیاهان گوجه فرنگی کاهش داد (Mbega et al. 2012). روغن اسانس رزماری فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به آلفا پینن و ۱،۸- سینئول، خصوصاً در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. به نظر می رسد روغن های اسانسی در غلظت های پایین به سطح باکتری ها متصل شده اند و با افزایش غلظت، دیواره های سلولی به تدریج آسیب دیده و سپس محتوای سلولی به بیرون نشت پیدا کرده است. این تفاوت ها در حساسیت میکروارگانیسم های مورد آزمایش به نمونه های آزمایشی می تواند به تغییر در میزان نفوذ نمونه ها از دیواره سلولی و ساختار غشای سلولی نسبت داده شود (Jiang et al. 2011). نتایج این مطالعه نیز با یافته های قبلی مطابقت دارد که نشان داده شده است که عصاره رزماری

در غلظت‌های مختلف به روش چاهک، بر روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثر بازدارنده دارد. با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش می‌یابد که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در هر دو باکتری مربوط به غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر، و کمترین مربوط به غلظت ۲۵ گرم بر لیتر است. عصاره رزماری اثر ضد باکتریایی بیشتری علیه پاتوژن‌های انسانی در مقایسه با پاتوژن‌های گیاهی نشان داده است.

میزان MIC اسانس رزماری بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *شرشیاکلی* پنج میلی گرم بر میلی لیتر بوده و نسبت به دیگر سویه‌ها کمترین توانایی مهارکنندگی را نشان می‌دهد. در مورد دیگر سویه‌ها یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* حداقل غلظت مهارکنندگی در یک میلی گرم بر میلی لیتر بوده و نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان اسانس در برابر این سه سویه است. میزان MIC عصاره رزماری بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *شرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* یکسان و برابر و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر است. در مورد دیگر سویه‌ها یعنی، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* نیز حداقل غلظت مهارکنندگی یکسان و برابر و در محدوده ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر است که نشان دهنده توانایی مهار کنندگی تقریباً یکسان عصاره در برابر این سویه‌ها است. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری در برابر پاتوژن‌های گیاهی و انسانی نشان می‌دهد که توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن‌های انسانی بطور معنی‌دار بیشتر از پاتوژن‌های گیاهی است.

به طور کلی در این بررسی با توجه به نتایج حاصل از دیسک و همچنین تعیین MIC (جدول ۴) می‌توان نتیجه گرفت فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر هر چهار سویه باکتریایی مورد مطالعه بیشتر از عصاره رزماری است. نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر باکتری‌های *شرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* نشان می‌دهد اسانس رزماری منبع خوب دارویی و مواد نگهدارنده غذا در برابر میکروارگانیسم‌ها است. در محصولات با ارزش بیماری‌های باکتریایی در برخی شرایط منجر به کاهش محصول و یا محصولات معیوب می‌شود. اقدامات مختلفی برای کنترل بیماری‌های باکتریایی صورت گرفته است اما با کارایی محدود بوده و هر یک از اقدامات دارای مزایا و معایبی است. این مطالعه نشان داد که استفاده از اسانس رزماری می‌تواند راه حلی برای مقابله با پاتوژن‌های گیاهی و سازگار با محیط زیست باشد. پیشنهاد می‌شود اثرگذاری و اثر ضد قارچی اسانس و عصاره رزماری بر انواع بیشتری از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش آلفا-پینن، کامفور، بورنیل استات، اوکالیپتول، کامفن، کاریوفیلن، لیمونن، بتاپینن و چندین مشتق ترکیبات دو حلقه ایی، ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در اسانس برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار هستند. آلفا-پینن، ورنون، بورنیل استات، کامفور، کامفن، اوکالیپتول، کاریوفیلن، ال بورنیول، لیمونن، امیرسین، بتا پینن، ده ترکیب

اصلی و شناخته شده موجود در عصاره متانولی برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار هستند. این ترکیبات ویژگی های آللوپاتی، ضدباکتریایی، آنتی اکسیدانی دارند. تفاوت قابل توجهی در درصد و نوع ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره رزماری مشاهده می شود که این تفاوت می تواند به روش های متمایز جداسازی و استخراج و تهیه اسانس و عصاره مرتبط باشد. بررسی اثر ضد باکتری به روش انتشار دیسک نشان داد که عصاره گیاه در غلظت های مختلف اثر ضد میکروبی علیه باکتری های پاتوژن گیاهی و انسانی دارد، هم در غلظت های کم و هم در غلظت های زیاد عصاره رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر /شرشیاکلی نشان داد. در مقابل هم در غلظت های کم و هم در غلظت های زیاد در مقایسه با چهار سویه باکتری مورد مطالعه عصاره رزماری کمترین اثر مهارکنندگی رشد را در برابر زانتوموناس کمپستریس نشان می دهد. عصاره گیاه اثر مهاری بیشتری بر روی پاتوژن های انسانی نسبت به پاتوژن گیاهی نشان داد. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس رزماری بر روی سویه های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد /شرشیاکلی نسبت به دیگر سویه ها کمترین توانایی مهارکنندگی را نشان می دهد. در مورد دیگر سویه ها یعنی /استافیلوکوکوس /اورئوس، سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کمپستریس حداقل غلظت مهارکنندگی نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان اسانس در برابر این سه سویه است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری بر روی سویه های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد /شرشیاکلی و /استافیلوکوکوس /اورئوس یکسان است. در مورد دیگر سویه ها یعنی سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کمپستریس نیز حداقل غلظت مهارکنندگی یکسان و نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان عصاره در برابر این سویه ها است. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری در برابر پاتوژن های گیاهی و انسانی نشان می دهد که توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن های انسانی بطور معنی دار بیشتر از پاتوژن های گیاهی است. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از دیسک و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی می توان نتیجه گرفت فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر هر چهار سویه باکتریایی مورد مطالعه در این بررسی بیشتر از عصاره رزماری است. در این مطالعه در مقایسه با مطالعات پیشین فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره علاوه بر پاتوژن های انسانی بر روی پاتوژن های گیاهی نیز مورد بررسی قرار گرفت. پیشنهاد می شود در پژوهش های بعدی ترکیبات عصاره و اسانس برگ، گل و ریشه گیاه رزماری با روش های جداسازی و شناسایی دقیق تر مانند HPLC و NMR بررسی شود. اثرات عصاره و اسانس رزماری در برابر طیف گسترده تری از عوامل بیماری زای انسانی، دامی و گیاهی و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد آفات و ضد حشرات، بررسی شده و در نهایت این اثرات ضد میکروبی در مرحله بالینی ارزیابی و زمینه ساخت و سنتز آنتی بیوتیک های طبیعی بر پایه این گیاه دارویی فراهم گردد.

منابع

- Babu, S., Satish, S., Mohana, D., Raghavendra, M. and Raveesha, K. (2007). Anti-bacterial evaluation and phytochemical analysis of some Iranian medicinal plants against plant pathogenic *Xanthomonas* pathogens. *Journal of Agricultural Technology*; 3(2): , pp.307-16.

- Bajpai, V.K., Kang, S.R., Xu, H., Lee, S.G., Baek, K.H. and Kang, S.C. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: a review. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), pp.207-224
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaui, A., Fellah, H., Abrini, J. and Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis*, 111, pp.41-49.
- Chudasama, K.S. and Thaker, V.S. (2012) Screening of potential antimicrobial compounds against *Xanthomonas campestris* from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an ecofriendly approach. *Archives of phytopathology and plant protection*.;45(7), pp.783-95.
- De Britto, A.J., Gracelin, DHS and Sebastian, SR. (2011). Antibacterial activity of a few medicinal plants against *Xanthomonas campestris* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biopesticides*.;4(1) , pp.57.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*.;64(08), pp.711-3
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), pp.898-904.
- Haidarizadeh, M., Lotfi, V. and Ghanei alvar, M. (2018). Evaluation of chemical compounds, antibacterial and allelopathic properties of cedar leaf extract (*Cupressus arizonica*). *Journal of Plant Research*, 31, (1), pp.72-81
- Haidarizadeh, M., Zareie, S., Ashengroph, M., and Maroofi, H. (2020). Chemical Composition and Biological effects of (Koma) *Ferula oopoda*. *Journal of Plant Research*, 33, (4), pp.854-863
- Hamidpour, R., Hamidpour, S. and Elias, G. (2017). *Rosmarinus officinalis* (Rosemary): a novel therapeutic agent for antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic, antidepressant, neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-obesity treatment. *Biomed J Sci Tech Res*.;1(4), pp.1-6.
- Hcini, K., Sotomayor, J.A., Jordan, M.J. and Bouzid, S. (2013). Chemical composition of the essential oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Tunisian origin. *Asian Journal of Chemistry*, 25(5), p.2601.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J. and *et al.* (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*.;32(1), pp.63-8
- Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food control*, 30(2), pp.463-468.
- Kluytmans, J., Van, Belkum A. and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*.;10(3) , pp.505-20
- Lamichhane, J.R., Messéan, A. and Morris, C.E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of general plant pathology*; 81(5), pp.331-50.
- Leite, A.M., Lima, E.O., Souza, E.L., Diniz, M.d.F.F.M., Trajano, V.N. and Medeiros, I.A. (2007). Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.;43(1), pp.121-6.

- Malakar, M. (2014). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolated from urine and stool samples of aninfected patient's in the Lakhimpur district of Assam, India.
- Mbega, E.R., Mabagala, R.B., Mortensen, C.N. and Wulff, EG. (2012). Evaluation of essential oils as a seed treatment for the control of *Xanthomonas* spp. associated with the bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. *Journal of Plant Pathology*, pp.273-281.
- Mori, M., Sogou, K. and Inoue, Y. (2019). Development of a selective medium and antisera for *Pseudomonas syringae* PV. syringe from seeds of barley and wheat. *Journal of General Plant Pathology*.;85(3), pp.211-20.
- Nicolas, O., Charles, MT., Jenni, S., Toussaint, V. and Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* PV. vitians population sizes, stomatal density, and lettuce resistance to bacterial leaf spot. *Canadian Journal of plant pathology*.:(3)40 , pp 407-39
- Ojeda-Sana, AM., van Baren, CM., Elechosa, MA., Juárez, MA. and Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*.;31(1)), pp.189-95.
- Saharkhiz, MJ. Smaeili, S. and Merikhi, M. (2010). Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. Growing in Iran. *Natural Product Research*, 24(17), pp.1598-1609.
- Takayama, C., de-Faria, FM., de Almeida, ACA., Dunder, RJ., Manzo, LP. and Socca, EAR. (2016). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*.;6(8) , pp:677-81.
- Vu, TT., Choi, GJ. and Kim, JC. (2017). Plant-derived Antibacterial Metabolites Suppressing Tomato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Research in Plant Disease*.;23(2) , pp:89-98.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and chemical toxicology*, 48(11), pp.3144-3152.

*** <https://www.cowellsgc.co.uk/rosmarinus-officinalis-miss-jessopps-upright-31>

(*Rosmarinus officinalis* L.) extract and essential oil on plant pathogens (*Xanthomonas compestris* and *Pseudomonas syringae*) and human pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)

M. Haidarizadeh^{1*}, M. Hemati², M. Ashengroph³

Received: 2021.02.16

Accepted: 2021.05.21

Abstract

 **Introduction:** Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a valuable medicinal plant. This study aimed to compare the chemical composition and antimicrobial effects of rosemary metabolic extract and essential oil against plant and human pathogens. **Methods:** the compounds of methanolic extract and rosemary leaf essential oil were identified by GC-Mass, the antibacterial effects of essential oil and extract were measured by disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of rosemary essential oil and extract was measured. Analysis of variance and Duncan's test were used for statistical evaluation of data. **Results and discussion:** Alpha-Pinene, Verbonone, Bornyl acetate, Camphor, Limonene, Caryophyllene, beta-pinene, beta-Myrcene, L-borneol, Camphene are the main constituents of the extract and alpha-pinene, camphor, bornyl acetate and eucalyptol, Camphene, Caryophyllene, Limonene, beta-pinene were the main essential oil of rosemary leaf. Rosemary extract showed the highest and lowest inhibitory effect against *Escherichia coli* and *Xanthomonas compestris*. In the case of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas syringe*, and *Xanthomonas compestris*, the results show that the essential oil has the same inhibitory ability against these three strains, and the ability of the extract to inhibit human pathogens is significantly higher than that of plant pathogens. Rosemary extract and essential oil can be used as a solution to control plant and human diseases.

Keywords: Alpha-Pinene, Antibacterial effects, Camphor, inhibition



-
1. Corresponding Author. Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran (*Corresponding author: m.haidarizadeh@uok.ac.ir Telephone)
 2. M.Sc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
 3. Associated Professor of Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

تحلیلی انتقادی بر رابطه نظریه "ژن خدا" با ایمان گروی

غلامحسین خدری^{۱*}، وحید عزیزی^۲

چکیده

مقدمه: مطالعه در حوزه های ژنتیک رفتار، نوروفیزیولوژی و نوروفلسفه و کاربرست ابزارهای تجربی برای توصیف پایه های معنویت موجب شکل گیری پرسش ها و نقدهایی درباره خاستگاه و چیستی ایمان شده است. **روش ها:** Dean Hamer (۱۹۵۱م) همبستگی معنی داری میان ژن ها با تجربیات معنوی برقرار کرد. از نظر Hamer ژن VMAT₂ یا ژن خدا در تجربیات معنوی و ایمانی نقش کلیدی دارد. این مقاله به سنجش گری و ارزیابی ربط ژن خدا با گرایش به ایمان پرداخته است. **نتایج و بحث:** در مجموع نمی توان نقش ژن ها را در بروز کنش های معناگرا و ایمانی انکار کرد و برای آن ها نقش درجه صفر قائل شد. نظریه های رقیب نظریه Hamer ثابت می کنند ایمان ریشه ژنتیک ندارد و اطلاعات موجود در پلی مورفیسم های ژنی نمی توانند تبیینی کامل از فرایندهای معنویت محور و ایمان گرا ارائه کنند بلکه توصیفات فیزیکیالیستی منحصر به جنبه های جسمانی و نه جنبه فراجسمی و معناگرایی انسان است.

واژه های کلیدی: دین هامر، ژن VMAT₂، گرایش به ایمان

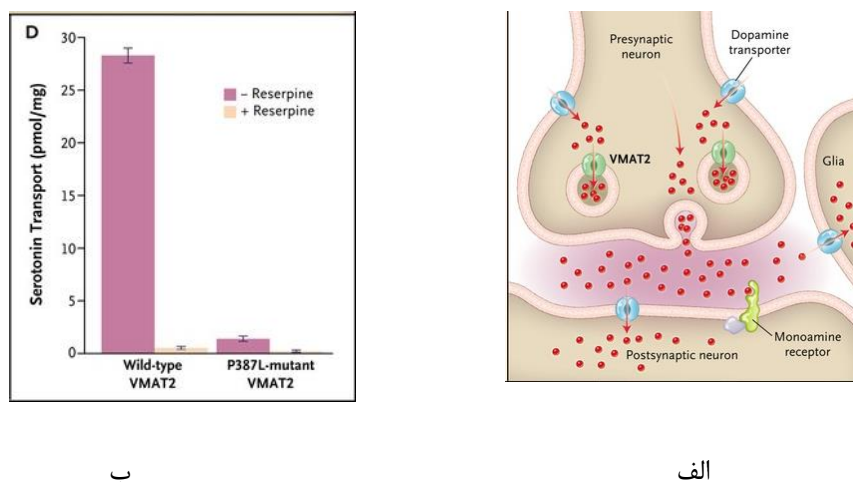
۱. دانشیار، گروه فلسفه، کلام و عرفان، دانشگاه پیام نور واحد تهران جنوب، تهران، ایران (* نویسنده مسئول: gh.khedri@pnu.ac.ir)

۲. استادیار، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران V_Azizi@sbu.ac.ir

مقدمه

نظریه ژن خدا (God gene)

در سال ۲۰۰۴ وجود ژن خدا (Vesicular Monoamine Transporter 2, VMAT₂) در انسان توسط Dean Hamer مطرح شد. آن چه او را بر وجود پیوند بین ماده و معنا متقاعد کرد وجود چند شکلی های ژنی VMAT₂ در جمعیت انسانی بود. VMAT₂ رمزکننده پروتئین انتقال دهنده انواعی از ناقلین عصبی - شیمیایی مونوآمین نظیر سروتونین و دوپامین در یاخته های عصبی مغز است (شکل ۱- الف). Hamer نشان داد در انسان هایی که تجربیات معنوی عمیق و ایمان محور دارند سطح بیان این ژن به طور معنی دار بالاتر از کسانی است که چنین تجربی را ندارند. او استعلا معنوی را برساخته چند شکلی های این قبیل ژن ها در خزانه ژنی (pool Gene) جمعیت انسانی می داند و معتقد است در صورت وقوع جهش در این خانواده ژنی می توان انتظار کاستی هایی در اعمال معناگرای انسان را داشت (Hamer, 2004). Silveira در واکاوی نظریه Hamer و این که آیا مقوله ایمان در ژن های ما جا دارد یا نه، با مطالعه روی جمعیت محدود به بررسی ارتباط سطح بیان ژن خدا و الهیات پرداخت (2008 Silveira, مطالعات مشابه ژنتیک جمعیت نشان داده اند فراوانی نسبی بیان این ژن در جمعیت هایی که تجربه های معنوی و الهیاتی دارند بیش تر از سایر جمعیت ها است (آلاله، ۱۳۹۶). به این ترتیب در اوایل قرن حاضر با ارائه نظریه ژن خدا پای دانش ژنتیک به حوزه های مطالعاتی فلسفی-الهیاتی باز شده است و اکنون در سراسر دنیا پژوهشگرانی درصدد اثبات رابطه بین ماده و معنا هستند. به موازات این قبیل مطالعات، در دهه گذشته نقش مناطقی از مغز و علوم اعصاب تجربی در حوزه دین (Schjoedt, 2009) و کارکرد سامانه های مغزی فرا شخصیتی در بروز فعالیت های دینی مورد توجه قرار گرفته است (Previc, 2006). Newberg در ۲۰۱۰ اصول الهیات اعصاب (Neurotheology) را تشریح کرد و اعمال شناختی و فیزیولوژیک مناطق مختلف مغز به هنگام فعالیت های عمیق معنوی را با هم مرتبط دانست (Newberg, 2010 & Newberg, 2003). به گواه علوم زیستی وقوع هیچ فعالیت مادی در بدن، بدون مداخله مستقیم یا غیر مستقیم ژن ها ممکن نیست؛ حال اگر مغز در هنگام کنش های معنوی و تجربه های ایمان گروانه دچار تغییراتی بشود؛ پس ژنتیک و علوم اعصاب ظرفیت بالایی در مطالعات مرتبط با علوم انسانی از جمله ایمان پژوهی خواهند داشت. لذا بهتر است که نسبت بین اعمال مغز و تجربه های معنوی، ایمان و در کلام کلی الهیات در پژوهش های بین رشته ای مورد تأمل و دقت قرار گیرد. Hamer تلاش می کند نشان دهد که جنبه زیست شناختی انسان چگونه توجیه کننده وجود تجارب ایمانی و معنوی مشترک میان بسیاری از سنت های باورمند نسبت به خدا (یا هر وجود برتر و متعلق ایمان) است (Hamer, 2004). در سلول های عصبی دارای نوع سالم و طبیعی این ژن، عملکرد سیناپس ها (محل ارتباط سلول های عصبی) در انتقال پیام عصبی عادی است اما در نوع جهش یافته این ژن، سیناپس ها فعالیت طبیعی خود را در انتقال پیام عصبی انجام نمی دهند (Hamer, 2004) (شکل ۱- ب).



شکل ۱- الف: نقش VMAT2 در ذخیره سازی مونو آمین ها در کیسه چه های سیناپسی. ب: میزان انتقال سروتونین به درون کیسه چه های غشایی در حالت طبیعی و غیر طبیعی (جهش یافته). (Rilstone, 2013).

Figure 2. A- Role of VMAT2 in storage of monoamines in synaptic vesicles. B- Serotonin transport rate into membrane vesicles in normal and abnormal (mutant) state.

Dean Hamer در نظریه خود اعلام کرد که گونه انسان امروزی (*Homo sapiens*)، استعداد و زمینه برخورداری از تجربه های معنوی را به دلیل داشتن و به ارث بردن این چند شکلی ژنی داراست. او رویکرد تلفیقی به ژنتیک رفتار (Behavior genetics)، زیست شناسی اعصاب و روان شناسی داشته است. آن چه کار Hamer را ارزشمند می کند این است که رابطی اولیه بین ماده و معنا را معرفی می کند تا زمینه های مطالعاتی مشترک بین علم طبیعی و الهیات شکل بگیرد.

چیستی ایمان

ایمان مفهومی گسترده را در بر می گیرد اما کلی ترین آن، توکل است. آن چه در متون فلسفی از آن به ایمان یاد می شود ایمان دینی خداپاورانه است اما روشن است که انسان های بی باور نسبت به وجود خداوند نیز در ذهن و روان خود می توانند به چیزی غیرخدا ایمان، اعتقاد و اعتماد داشته باشند (Bishop, 2007). در تأملات فلسفی، مؤلفه های انفعالی (Affective) و شناختی (Cognitive) در مدل های مختلف ایمان و این که آیا ایمان نوعی فعالیت مغزی-ذهنی است یا این که در دایره ای فراتر از مادیت و جسم بسط می یابد مطرح است. در مدل انفعالی، نوعی احساس اطمینان وجودی محض نسبت به مبدأ ایمان در فرد وجود دارد و این احساس درونی به گونه ای عمل می کند که فرد در پی یافتن دلیل برای وجود متعلق ایمان و اقامه ادله و شواهد برای درستی باور و کشش درونی خود نیست. اما در مدل معرفت شناختی، ایمان همانا معرفت به حقایق خاص است

که خداوند در قالب وحی و یا هرگونه گفتمانی با بشر داشته است و در واقع این مدل، خداپاورانه و دایره آن به ایمان الهی محدود است. در این پژوهش، نگارندگان درصدد بررسی ارتباط بین ایمان در مفهوم عام (و نه فقط ایمان گروی خداپاور و خدا محور) با کنشگری ژن‌های مرتبط با تجربه‌های معنوی که وجه مشترک همه انسان‌ها اعم از مؤمنان به خدا و غیر آن است در چارچوب نظریه Hamer است.

ویژگی‌های دو مدل اصلی ایمان

الف- مؤلفه انفعالی

این مؤلفه برحالت روانی انفعالی و این که نوعی احساس درونی توکل در فرد جاری است استوار است. فیلسوفانی همچون Clegg [۱] معتقد هستند که برخورد اولیه و فراگیر انسان با زندگی، زمینه شکوفایی ارزشمندی را برای او به ارمغان می‌آورد و در سرشت او رغبتی به دادن پاسخ به نوعی گرایش درون‌زا وجود دارد. متقابلاً از دست دادن ایمان با ضایعه روانی آسیب‌رسان در طول زندگی توأم است (Clegg, 1979). از منظر زیست- روان‌شناختی این قبیل خسارت‌ها، هم ایستایی (Homeostasis) _گرایش جاندار به حفظ حالت نسبتاً پایدار پیکر_ را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بقای انسان را به مخاطره می‌اندازد و بدین سبب می‌توان گفت نبود یا از دست دادن باور قلبی به متعلق ایمان با کاهش احتمال و امکان بقا مرتبط است. واضح است ارائه‌دهندگان این مدل ایمانی باید به وضع متعلق التفاتی (Intentional object) آن نیز بپردازند که در این صورت خدا ناباوران از دایره شمول این مدل خارج خواهند شد. به این سبب برخی از اندیشمندان، فروگاهی ایمان به حالت روانی صرف را خبط فلسفی و مؤلفه شناختی و معرفت محور را ضروری دانسته‌اند.

ب- مؤلفه معرفت شناختی

Calvin ایمان را معرفتی استوار و یقینی به نیک‌خواهی خدا برای انسان می‌داند که هم در حقایق و وعده صریح در مسیح بنیان نهاده شده است هم بر اذهان آدمی وحی گردیده و هم توسط روح القدس بر قلب‌ها مهر شده است. در این نگاه نوعی از معرفت‌شناسی نسبت به حقایق خاصی که خداوند به انسان وحی کرده است دیده می‌شود. از فیلسوفان معاصر Plantinga مدافع سنت اصلاح‌گرانی نظیر Calvin در این زمینه است (Baldwin, 2000). چنین تعبیری از ایمان، درون دینی تلقی می‌شود و متعلق‌های غیر الهی ایمان را در شمول خود قرار نمی‌دهد. به دلیل وجود تولید مثل جنسی و تفاوت در بسیاری از ژن‌های موجود در ژنوم، انسان‌ها با یکدیگر تفاوت‌های فردی بی‌شمار دارند. در میان این گوناگونی و کثرت جهان بینی که در ابنای بشر وجود دارد نمی‌توان انتظار داشت که همه آدمیان، ایمان در مفهوم الهیاتی آن را در ذهن یا قلب خود داشته باشند. چه بسیارند کسانی که ایمانی صادق به متعلق ایمانی غیر الهی دارند و از منظر فلسفی ایشان را نیز باید در عداد مؤمن دانست و

مواهب ایمان را_ به شرط راستین بودن_ برای آنان در نظر گرفت. در معرفت شناسی برون گرایانه (Externalist epistemology) صدق ایمان به صورت پایه ای در نظر فردِ معتقد، بدیهی و موجه است و در تجربه فرد به نحوی بی واسطه، بدیهی یافت می شود و نیاز به استنتاج عقلانی از اصول و باورهای پایه ای پیشینی ندارد (Alston 1993). Plantinga با تعریف قوه حس الهی (Sensus divinitatis) اعتقادات خداپاور را معرفت به حساب می آورد؛ چون در پیدایش آن قوه شناختی خاصی نقش دارد و طرح کارکردی آن به تولید باورهای صادق در فرد می انجامد.

در میان متکلمان اسلامی، غزالی به قوه شناختی خدادادی برتر برای برون رفت از بحران دینی و شکاکانه خود درباره داده های ادراک حسی و عقل بشری تکیه دارد و در نگاه او ایمان، معرفتی تلقی می شود که با قطعیت، تردیدها را کنار می زند (غزالی ابوحامد محمد، ۱۳۹۰). پس در این تقریرها ایمان منحصرأ از سنخ شناخت نیست بلکه آن چنان که کالوین گفت بر قلب های انسان نیز مَهر شده است.

ایمان گرایی

نخستین کاربرد اصطلاح ایمان گرایی در مکاتب الهیاتی فرانسه (Carroll, 2008) و در آثار الهی دانانی نظیر Manges (۱۸۳۸-۱۹۲۱) و Auguste Sabatier (۱۸۳۹-۱۹۰۱) سر برآورد. آنان در صدد تفکیک ایمان از باور گزاره ای و معتقد بودند رستگاری به ایمان وابسته است نه به تصدیق آموزه ای خاص. انتساب تاریخی اصطلاح ایمان گرایی به متفکرانی دور از خاستگاه این واژه همچون ترتولیانوس، منشأ خلط بسیاری شده است و ایمان گرایی به عنوان مقوله توصیفی دچار مشکل است و به نظر می رسد بیشتر جنبه کارکردی آن به یاری بشر امروز می شتابد. پس از ورود ایمان گرایی به قاموس فلسفه، جنبشی در تفکر کلیسای کاتولیک موسوم به سنت گرایی (Traditionalism) شکل گرفت که در تقابل با عقل گرایی، واسطه انتقال وحی الهی را سنت دانست. گرچه در قرن دوم میلادی ترتولیانوس آشکار شدن حقیقت مسیحیت را تنها از طریق وحی ممکن دانست اما تأکید می شود که به گواه تاریخ علم او هرگز ستیزی با عقل نداشت و دعاوی عقل را نسبت به ایمان رها نکرد و هر دو را محترم شمرد (Osborn, 2003). اما همسو با تکامل مغز انسان عصر حاضر، دو اتفاق مهم رقم خورده است. اول پرسش هایی ژرف در خصوص مسئله معنویت و ایمان گروهی و دوم ضروری دانستن این که علم باید در خدمت بشر و هم راستا با رفع نیازهای مادی و معنوی او باشد؛ در غیر این صورت سودمند نخواهد بود. هر چند آن چه اکنون بشریت را گرفتار کرده است چیرگی جنبه مادی زندگی بر وجه معنوی آن است اما این موضوع، نافی ربط بین جنبه های مادی و معنوی وجود انسان و به دیگر سخن، نسبت بین عملکرد ژن ها در تجربه های مرتبط با باورمندی به متعلق ایمان نیست. به این جهت دانشمندان متأله، فیلسوفان دین و رهبران مذهبی برای تخفیف آلام روحی و روانی و به تبع آن جسمی، بشریت را به ایمانی کارکرد محور فرا می خوانند. در این دیدگاه ایمان می تواند آسایش روح و روان و متعاقب آن سلامت جسم را تضمین کند.

قرائت مورد نظر از ایمان

همواره ایمان به عنوان یک ویژگی تفکیک‌ناپذیر همراه انسان بوده، هست و خواهد بود. شاید بتوان پذیرفت ایمانی ارزشمندتر و مفیدتر است که با عقلانیت سازگار و مستظهر به تعقل و اندیشه باشد. روشن است که عقلانیت، مبتنی بر معرفت‌شناسی و عملکرد دستگاه ادراکی و شناختی انسان است و در این میان سازوکارهای پیچیده و تکامل یافته عصبی در مغز به انسان قدرت تعقل، شناخت و نوآوری ارزانی داشته و او را از حیوان متمایز ساخته است. در این میان ژن‌ها که واحدهای مادی حیات هستند از طریق پدیده زیست‌شناختی تمایز (Differentiation) با تعیین شکل، ساختار و عملکرد سلول‌های بدن، فعالیت‌های جسمی و به تبع آن مغز و در نتیجه ذهن را راهبری می‌کنند. به این سبب، ژن‌ها با قوای حسی و ادراکی که موجب تفکر و تعقل هستند ارتباط معنی‌داری پیدا می‌کنند. به گواه علم تجربی، هنگام برقراری ارتباط معنوی به متعلق ایمان و تجربه معنوی، بیان ژن‌هایی خاص در مغز افزایش معنی‌دار پیدا می‌کند. با قرار دادن این واقعیت‌ها در کنار هم می‌توان گفت ردّ پای ماده که در نگاه فلسفی از خیریت برخوردار است در ایمان و معنویت توأم با معرفت و عقلانیت پیداست.

بیان مسئله و ضرورت پژوهش

از زمان دکارت تلاش برای "تفسیر و برقراری ارتباط بین دو شیء" وجود داشته است. نوروفیزیولوژی، ژنتیک و در سال‌های اخیر الهیات اعصاب (Neurotheology)، حالات ذهنی را محصول فرایندهای فیزیکی شیمیایی مغز می‌دانند و بر همبستگی میان ذهن - که پذیرای گرایش به ایمان و باور است - و بدن صخه می‌گذارند (سرل، ۱۳۸۸ و سرل، ۱۳۸۷). از طرفی ژنتیک یک مفهوم ایستا و پیش‌ساختی است که بهتر است به سوی مفهومی پویا میل کند تا کارآمدی لازم را در تبیین رخدادهای حیات انسان را داشته باشد. ژن‌ها جوهرهای مستقل مادی و حامل اطلاعاتی که نقشه راه حیات را ترسیم می‌کنند هستند اما باید به این مهم توجه داشت که ارتباط قراردادی بین تک‌تک ژن‌های مکان‌یابی شده بر روی جایگاه‌های کروموزومی معنای چندانی ندارد (آل محمد و رحمانی، ۱۳۷۸). بلکه زمانی می‌توان به ارزش این جوهرهای مادی مؤثر در وقایع فیزیکیوشیمیایی مرتبط با گرایش به ایمان در مغز پی برد که آثار عینی آن‌ها را در زندگی مورد سنجش قرار داد. در این پژوهش بین رشته‌ای برآن هستیم تا به نحو منصفانه به نقاط ضعف و قوت نظریه Hamer در تجربه‌های ایمان محور و معنوی بپردازیم. یکی از فرض‌های این پژوهش این است که ایمان ویژگی انحصاری بشر است. پژوهش‌های ژنتیک و علوم اعصاب نشان می‌دهند بخش‌های خاصی از مغز به هنگام بروز تجربه‌ها و میل‌کنش‌های ذهنی انسان به سمت اعمال عمیق معنوی به طور معنی‌دار سطح بالاتری از فعالیت را نشان می‌دهند (Newberg, 2003). این سطح از عملکرد مغز ممکن نخواهد شد مگر سطح بیان ژن‌های مداخله‌کننده نظیر VMAT₂ در نورون‌های این نواحی مغزی افزایش پیدا کند. البته این ژن‌ها در جانوران پست که از ایمان بی‌بهره هستند

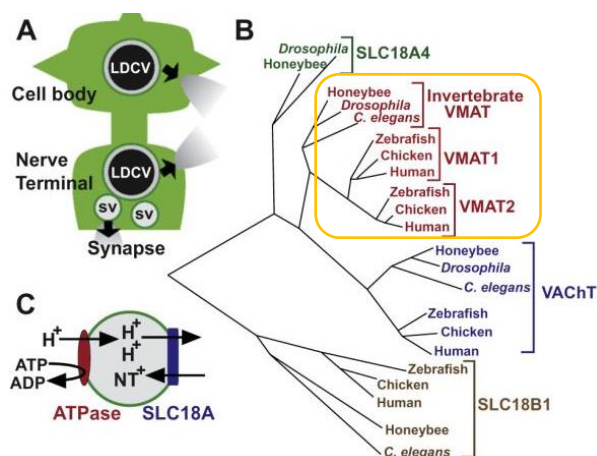
نیز وجود دارند. اساساً هر ژنی در پی وقوع جهش از ژن اجدادی خود اشتقاق حاصل کرده است و به همین دلیل چند شکلی های ژنی به وجود آمده و عملکردهای مشابهی را نشان می دهند (شکل ۲). در واقع این بخش از عالم حیات، جبر طبیعت است و انسان توان مقابله با آن و یا ایجاد انحراف در مسیر آن را ندارد و ناگزیر به پذیرش آن در روندهای تکاملی است. پس این گزاره که ایمان، اختصاصی انسان است منافاتی با فرگشت همه جانداران ندارد و نباید این گونه نتیجه گیری کرد که هر جانداري که چنین ژن هایی را دارد لزوماً باید باورمندی و ایمان داشته باشد. بر اساس تعاریف اصطلاحی فلسفی و کلامی، ایمان از جنس مقولات مغزی - ذهنی نیست بلکه ایمان گشودگی و تحولی وجودی است که شروع آن در ساحت دل و قلب انسان و در بالادست وجود جسمانی قرار دارد. علوم نوین بین تجربه های معنوی و حتی ایمانی و کنش های مغزی - ذهنی ارتباط قائل است و شواهد تجربی، عقل فعال و حرکت ذهن (Mind) را در رفتارهای ایمان گروانه کاملاً موثر بلکه ضروری و لازم می داند. می توان گفت علاوه بر تعریف فلسفی و کلامی از ایمان، تعریف جدیدی که مبتنی بر دستاوردهای زیست-روان شناختی است نیز وارد حوزه علوم کاربردی و بین رشته ای شده است که در این بحث مورد توجه قرار گرفته است. پرسش این است که اگر نظریات دانش طبیعی صرفاً در حیطه ها و ساحت های مادی بشری قابلیت تطبیق دارند یا بر ساحت های ایمانی و شهودی نیز قابلیت تعمیم و تسری دارند؟ یا این که در این حیطه های بشری ساکت هستند و نه نقش اثبات کنندگی دارند و نه انکار.

بحث و نتایج

نقد تحلیلی نظریه ژن خدا

بیش از آن که وظیفه فلسفه را پاسخ دادن به سؤالات بپنداریم باید کار آن را طرح پرسش و نقد همراه با تحلیل منطقی موضوعات بدانیم. هر چند Hamer در ارائه نظریه جنجالی خود شتابزده عمل کرد اما پرسشی اساسی را مطرح نمود. این که چگونه ایمان در ژن های ما نقش بسته است؟ قرائت دیگر این سؤال این است که آیا اطلاعات موجود در ژن ها می تواند تبیینی کامل از فرایندهای معنویت محور و ایمان گرای بشر ارائه کند و باورمندی انسان به متعلق ایمان را رمزگشایی کند؟ Dean Hamer نظریه خود را قبل از آن که در معرض دید متخصصان علوم زیستی و نیز علوم انسانی به ویژه فیلسوفان و متکلمان قرار دهد تا به چالش کشیده شود و مورد واکاوی و نقد علمی قرار گیرد به گونه ای شتابزده در کتاب "ژن خدا" به طبع رساند. نتایج حاصل از داده های زیست شناختی زمانی دارای ارزش خواهند بود که به لحاظ آماری معنی دار باشند. ضعف اساسی مطالعه او این بود که در فضای نمونه نه چندان وسیع پرسش نامه های روان شناختی که در آن بتوان تخمینی از گرایش های ایمانی - مذهبی، باورهای دینی و معنوی فرد را به دست آورد با مطالعه روی تنها یک ژن (VMAT₂) درآمیخت و متوجه همبستگی نسبی معنی دار بین آن دو شد. ایراد روش شناختی که می توان بر کار او وارد دانست فضا و تکرار کم نمونه در پژوهش او است. بالابردن سطح تکرار و انتخاب جمعیت مورد مطالعه فراوان تر در آزمایش او می توانست به استدلال او استحکام ببخشد اما او به همین

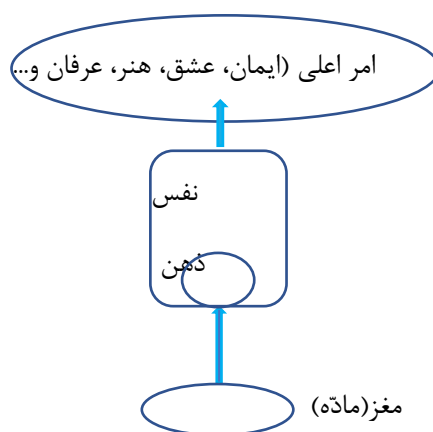
میزان بسنده و چنین استدلال و نتیجه‌گیری کرد که بین تجربه‌های معنوی و ژن‌ها رابطه وجود دارد. هر چند پس از Hamer این قبیل پژوهش‌ها در سراسر جهان (Silveira, 2008) از جمله ایران (آلاله، ۱۳۹۶) به انجام رسیده است اما داده‌های آماری هنوز به حدّ بسندگی نرسیده است و این نقطه ضعف جدّی یک پژوهش تجربی است. پیش از این اشاره شد که Newberg و همکاران در ۲۰۰۳ دریافتند نواحی خاصی در مغز به هنگام بروز تجربه‌های معنوی به طور معنی‌دار سطح بالاتری از فعالیت را نشان می‌دهند (Newberg, 2003). به موازات این تغییرات، سطح بیان ژن‌های خاصی نظیر *VMAT2* در نورون‌های این مناطق مغز افزایش می‌یابد. از طرفی این گروه از ژن‌ها در جانوران پست نیز وجود دارند. در ژنتیک تکاملی، همتایی (Molecular homology) مولکولی تأیید می‌کند که بسیاری از ژن‌ها در گونه‌های خویشاوند، مشترک و بسیار شبیه یکدیگر هستند. درخت‌های تبارزایی (Phylogenetic tree) براساس توالی نوکلئوتیدهای ژن‌ها و یا آمینواسیدهای پروتئین‌ها رسم می‌شوند و میزان خویشاوندی جانداران را با توجه به درجه همسایگی این نوع مولکول‌ها در درخت نشان می‌دهند. درباره خانواده پروتئین *VMAT* بسیاری از بی‌مهره‌ها و مهره‌داران، درخت تبارزایی خویشاوندی تکاملی را در بین جانوران مختلف نشان می‌دهد (شکل ۲). با توجه به این فرض که ایمان ویژگی انحصاری بشر است چگونه می‌توان پذیرفت که ژن خدا در این جانوران نیز وجود داشته باشد اما آن‌ها از ایمان بی‌بهره باشند؟ یعنی در عین حال که جانوران فاقد این جنبه‌ها هستند چرا این خانواده ژنی در ژنوم بسیاری از جانوران وجود دارد؟



شکل ۲- در درخت فیلوژنی هم شکل‌های مولکول *VMAT* در بی‌مهره‌ها و مهره‌داران که در همسایگی هم قرار دارند مشخص شده است (کادر زرد) (Hakeem, 2013).

Figure 2. In the phylogeny tree, the isoforms of the VMAT molecule in invertebrates and vertebrates that are located in the same neighborhood have been identified (yellow box).

تحقیقات مبتنی بر سنجش تغییرات بیان ژن نشان داده اند این ژن به طور غایی در رفتارهای جانوران نظیر رفتارهای حرکتی نقش مهمی دارد به نحوی که تخریب نورون های دوپامینرژیک (Dopaminergic neurons) هسته های خاصی در مغز باعث بروز اختلالات حرکتی می شود (Koeppen & Stanton, 2009). به این معنی که آن چه Hamer در انسان ژن خدا نامیده است کارکرد چندگانه دارد. از سوی دیگر چنین ژن مشترکی که از یک ژن نیایی مشتق شده است را حداکثر می توان یکی از ژن های متعدّد در فعالیت های مغزی باورمحور و معنی گرا - و نه دارای نقش کاملاً محوری در این قبیل فعالیت ها، آن چنان که Hamer گفته است - دانست. به طور خلاصه می توان پیشنهاد کرد که همبستگی سطح بیان این ژن (ها) و تجربه های عمیق معنوی می تواند بیانگر دخالت جوهرهای مادی در جنبه های معنوی حیات انسان باشد. طرح پیشنهادی زیر نشان می دهد بروز و ظهور امور اعلی همچون ایمان بر مبنای عملکرد ذهن (زیر مجموعه نفس) و کارکرد ذهن بر فعالیت مغز (مجموعه شبکه های عصبی و ژن ها و ...) استوار است (شکل ۳).



شکل ۳- طرح واسطه بودن ذهن بین ماده (شبکه های عصبی مغز، مولکول های میانجی عصبی و ژن های کنترل کننده ساختار و عمل نورون ها) و معنا (اعمال عالی انسان نظیر باورمندی به متعلّق ایمان، عشق و غیره).

Figure 3. The plan of the mediation of the mind between matter (nerve networks of the brain, neural mediator molecules and genes controlling the structure and function of neurons) and spirituality (excellent human actions such as believing in faith, love, etc.)

ژن های حاصل از جهش و ایزوفرم های مختلف یک مولکول یا چند شکلی های ژنی، اجزای خُرد برای وقوع فرگشت کلان هستند. در واقع این بخش از عالم حیات، دترمینیسم غیر قابل انکاری است که به نوعی جزء تفکیک ناپذیر پویشمندی و صیورورت دائمی حیات است. این گزاره صادق پیش فرضی که ایمان اختصاصی انسان است منافاتی با فرگشت همه جانداران ندارد و نباید این گونه نتیجه گیری کرد که هر جانداري که مشمول قاعده تکامل است لزوماً باید باورمندی و ایمان داشته باشد. در نقطه مقابل نظریه هامر، Haworth و همکاران با مطالعه ای مقایسه ای و جامع روی دوقلوهای همسان که از لحاظ نوع ژن ها کاملاً

یکسان هستند اعلام کردند که باورهای خاص مذهبی، ریشه در ژنتیک ندارند و توارث پذیر نیستند بلکه محصول انتقال اطلاعات و فرهنگ اجتماعی هستند که فرد را در خود پرورده است و در واقع اکتسابی هستند (Haworth, 2009). اگر آن‌ها در دو محیط و بستر فرهنگی و اجتماعی متفاوت پرورش یابند تفاوت‌های قابل‌اعتنایی را نمایش می‌دهند. به تعبیر دیگر مسایل اپی ژنتیک (که در بیرون از دایره ژنتیک قرار گرفته اند اما بر آن اثر گذار هستند) بر میزان بیان ژن‌ها و حتی نوع ژن‌های بیان شده تأثیر می‌گذارند. به بیان دیگر، ژنتیک و اپی ژنتیک در مشارکتی ناگسستنی منشأ بروز اکثر اعمال و رفتارهای انسان هستند. این مهم چندان مورد توجه هامر قرار نگرفته است و می‌تواند یکی از ایرادهای وارد بر نظریه او در نظر گرفته شود. نقد دیگر وارد بر نظریه ژن خدا این است که او با بررسی فقط ژن‌ها در واقع به جنبه آفاقی مسئله تجربه‌های معنوی پرداخته است و از سیر در انفس و جنبه‌های فرامادی مسئله غافل شده است. آن چه مسلم است در برهه‌هایی از تاریخ زندگی بشر در پهنه زمین که ایمان کارکرد محور و عملکردی در زندگی انسان‌ها رخ نموده است و مؤمنان به متعلق ایمان، باوری حقیقی و امید و اتکالی واقعی داشته‌اند به مراتب نسبت به جهان امروزی آرامش معنوی بیش تری وجود داشته است.

با فرض پذیرش دیدگاه Hamer، می‌توان در توجیه خیریت جوهرهای مادی در بروز فعل ایمانی گفت به گواه شواهد تاریخی ایمان از ابزارهای مهم ماندگاری و استمرار حیات نوع بشر است چون گرایش معنوی و باورمندی حقیقی به متعلق ایمان، تأمین‌کننده سلامت روان و کارکرد منظم جسم است و در این صورت بقای فرد تضمین می‌شود. در سایه تحقق این مهم، امکان انتقال ایزوفرم‌های ژن‌های دخیل در بروز تجربه‌های معنوی - از جمله ژن $VMAT_2$ که به دلیل نقش در فراهم‌آوری ابزار لازم برای کارکرد متناسب مغز و ذهن، بستر ساز انجام فعل ایمان گروانه در انسان است - به نسل‌های بعدی تضمین می‌شود و فراوانی نسبی آن‌ها در جمعیت رو به فزونی می‌گذارد. از آن‌جا که نظام آفرینش بر بستری قرار دارد که دائماً در حال پویش، سیوروت و نوآرایی است و همه این‌ها در جهت حرکت به سوی اکمل است در این راستا و بدین سان طبیعت با دادن شانس بقای افراد در سیر فرگشتی انسان با گزینش ژن‌های مؤثر در امور معنوی و ایمان محور فراوانی نسبی این قبیل ژن‌ها را در خزانه ژنی گونه انسان افزایش می‌دهد. این چرخه‌های کوچک در تاریخ حیات بشر بر پهنه زمین از دیرباز تا کنون تکرار شده و خواهند شد و نتیجه آن این است که ایمان به عنوان خصوصیتی مفید که ضامن حفظ بقای انسان است با تکامل گونه انسان از نوعی دینامیسم و پویایی برخوردار است و تکامل پیدا می‌کند و نتیجه آن در درازمدت - در مقیاس تکاملی - سیر از تکثر به سمت وحدت و تحقق ایمان ارزشی مبتنی بر تعقل است. از منظر فلسفه اسلامی در توجیه دخالت و نقش ژن‌ها در ایمان‌گرایی می‌توان گفت آیات و نشانه‌های الهی افزون بر آن که در خارج از وجود انسان هویدا هستند می‌توانند درون وجود انسان نیز قرار گرفته باشند. در نگاه حکمت متعالیه و فلسفه صدرایی "ماده" (نظیر ژن‌ها) از آن حیث که "وجود" دارد و ماهیت عدمی ندارد "خیر" است (افسری و همکاران، ۱۳۹۹) و در این‌جا نیز باید به خیریت مولکول‌ها و تأثیر و تأثر آن‌ها که موجب برانگیختگی و ایجاد نوعی پویش (Dynamism) در جهت پیدایش یک احساس معنوی می‌شود تا روند رو به تحول و

تکامل در زندگی بشر ایجاد شود توجه خاص نمود و حضور میانجی گرایانه ماده را صرفاً دیدگاه ماتریالیستی نپنداشت. اگر نگرشی متعادل تر داشته باشیم و برای مدارهای عصبی مغز مادی، مرتبه صفر در امور معنوی قایل نباشیم اولاً به قوه ناطقه انسان که مورد تأیید آموزه های دینی و گزاره های صادق سنت های فکری است به درستی ارج نهاده ایم و ثانیاً ایمان توأم با معرفت و پشتیبانی شده از سوی عقل را ارزشمند تر و کارآمدتر تعریف کرده ایم که این نگرش ها خود ارزش ذاتی بیشتری دارند. از نگاه فلسفی به نظر می رسد خداوند امکاناتی را که برای صیوروت و حرکت رو به تعالی موجودات، که دائماً در حال دگرگونی و تغییر هستند، در جهان مادی لازم و ضروری است را فراهم کرده است و جعل و خلق موجودات در عالم طبیعت و نظام احسن الهی، آنی و دفعتاً نبوده است. پیشنهاد کننده این که نیرویی فرا طبیعی به نحو یک جا ژن ها و سایر مولکول های زیستی را نیافریده است که اکنون از انتساب فرایندهای حاصل از عمل آن ها نظیر تجارب معنوی و امور الهیاتی و ایمانی به آن نیرو که در نظر مؤمنان خداوند است واهمه داشته باشیم. اما این بدان معنا نیست که تنها یک یا چند ژن، کنشگر یگانه ماشین مادی مغز در تجربه های معنوی هستند. آن چه گفته شد به معنای این نیست که مقوله ای به پیچیدگی معنویت و ایمان گروهی تنها به ژن ها منتسب است. افزون بر هدایتی که در شریعت مقدس با ارسال رسل (صلوات الله علیهم) و نازل کردن وحی به بشر ارزانی شده است در سایه هدایت تکوینی، در سرشت مادی انسان، کارکرد مغز به بیان ژن ها و فراورده های آن ها بستگی دارد و مآلاً جهت گیری عملی همه این ها به سمت بقای پیکر فرد و حفظ ژن های مطلوب در خزانه ژنی جمعیت است که ما نام این پدیده را "خودحفاظتی ژن ها" می گذاریم. انتقال ژن هایی که تعیین کننده ویژگی های جسمی و روان تنی (Psychosomatic) انسان هستند از والدین به فرزند(ان) صورت می پذیرد اما این به آن معنی نیست که ژن ها تعیین کننده تام و جبری اعمال انسان هستند؛ چون این حالت موجب الغای اثر محیط، آموزش، تربیت و غیره خواهد بود. نتیجه این است که عوامل وراثتی تنها علّیت استعدادی برای انجام اعمال معنوی آدمی دارند نه علّت تام.

اکنون که به نقش مغز مادی در تجربه های معنوی پرداخته ایم باید این پیش فرض را قدری تعدیل کنیم و نقش "درجه صفر" برای ژنتیک و علوم اعصاب در ساحت عقل و به تبع آن برای ایمان قائل نباشیم چون به هر صورت قوه تعقل و ناطقه انسان در دوره حیات جسمانی خود منهای کارکرد جوهر مادی مغز پذیرفتنی نیست و بدون فعالیت مغز و میانجی گری ناقلین عصبی در شبکه های عصبی آن، عمل ذهن و مآلاً امر اعلی همچون ایمان محقق نخواهد شد.

نتیجه گیری کلی

وظیفه فلسفه پاسخ دادن به پرسش ها نیست بلکه طرح پرسش در باره موضوع و به چالش کشیدن و نقد آن است. در مقاله حاضر "نظریه ژن خدا" ی Dean Hamer را در معرض نقد تحلیلی قرار دادیم و ایراداتی را بر آن وارد کردیم. اساس فلسفه معاصر، کارکرد محوری و کاربرد دستاوردهای آن در زندگی بشر است و نزدیک تر شدن مرزهای دانش زیست شناسی و

فلسفه و رویش زمینه‌های بین‌رشته‌ای مفید خواهد بود. دستاوردهای حوزه‌های بین‌رشته‌ای علم باید بتواند ضامن سلامت روان و جسم انسان‌ها، ارتقای سطح کیفی زندگی و افزایش احتمال بقای جوامع بشری باشد. بنابر همین نگرش در پژوهش حاضر سعی شد نسبت و ربط بین جنبه‌هایی از علم طبیعی (ژنتیک) با ایمان گروهی مورد مذاقه و نقد قرار گیرد. با لحاظ ناقطعی بودن برخی از دستاوردهای بشر در علوم طبیعی، پژوهش حاضر سعی کرد تا با تبیین خیریت وجود ماده در عملکرد مغز و به تبع آن کارکرد ذهن به عنوان علّیت استعدادی و نه تأمه برای ایمان گروهی مبتنی بر معرفت عقلانی، فرصت واکاوی در این زمینه‌ها را فراروی زیست‌شناسان و فیلسوفان متأله و طبیعت‌گرا قرار دهد. ازجمله تهدیدهای متصور در مقوله ایمان گروهی به تأخیر افتادن ایمان به دلیل انتظار آنان برای حصول شواهد متقن تجربی است. در نقد پیش‌گفته در این مقاله، به عنوان نتیجه به این مهم پرداخته شد که مطالعات هامر گرفتار عدم قطعیت و ضعف‌های خاص خود است و از منظر علم، نایقینی تلقی می‌شوند. با ورود اصل عدم قطعیت هاینبرگ به حوزه علم و تشکیک در علّیت قطعی پدیده‌های فیزیکی (کیانخواه، ۱۳۸۶) دانشمندان اصل مورد اشاره را تا حدود زیادی قابل تعمیم و تسری در علوم انسانی همچون فلسفه دانستند. با این توضیح، عدم قطعیت در فلسفه زیست‌شناسی می‌تواند نایقینی بودن آن چه Hamer در خصوص ژن خدا بیان داشته است را توجیه کند. به ویژه که دستاوردهای علم ژنتیک مولکولی به لحاظ محدودیت‌ها از یک سو و نوپا بودن این قبیل مطالعات به حد بسندگی نرسیده است. قبول خطاپذیری عملکرد مغز می‌تواند دیدگاه‌های مادی‌انگار باورمندی بشر را تعدیل و توجه او را به آموزه‌های صادق ادیان الهی و غیر الهی معطوف سازد. در نگرش‌های انفسی و دیدگاه‌های شهودی-اشراقی به مسئله ایمان می‌توان کاستی‌های مطالعات آفاقی همچون پژوهش Hamer را تقلیل داد و این نقطه ضعف فلسفه تکامل‌گرای زیست‌شناختی را تا حدودی برطرف کرد. در این صورت هم ایستایی جسم و روان انسان‌ها تأمین و بقای آنان تضمین می‌شود. احتمال بقای انسان ایمانی واقعی در سایه باورمندی خود افزایش می‌یابد و فرصت انتقال جوهرهای مادی نظیر ژن $VMAT_2$ مؤثر در حیات معنوی و باورمندی به متعلق ایمان که همان ژن‌های مرتبط با معنویت هستند به نسل‌های بعدی فراهم می‌شود. اما واقعیت عینی این است که علی‌رغم دستاوردهای خیره‌کننده انسان امروزی در زمینه دانش و تکنولوژی که موجبات رفاه او را در زندگی فراهم آورده است، کم‌رنگ شدن ایمان در زندگی انسان عصر حاضر سبب برهم خوردن تعادل روحی و روانی او شده و با تأثیر بر جسم، آدمی را دچار امراض روان-تنی نموده است. به بیان دیگر به مدد ارتقای سطح عقلانیت انسان تکامل یافته امروزی، کیفیت ایمان و باورمندی در مؤمنان زیاد اما شمار مؤمنان واقعی کاهش یافته است. در مجموع در آستانه راهی ایستاده ایم که آگاهی ما نسبت به آن اندک است. آن چه مسلم است این است که بشر امروز سخت محتاج گرویدن به ایمان است و احتمالاً اگر چنین ایمانی مبتنی بر عقلانیت باشد از ارزشمندی بیش‌تری برخوردار خواهد بود. نتیجه دیگر این پژوهش این است که در ربط عمل ژن‌ها به عنوان جوهرهای مادی و مسئله ایمان گروهی گفته شود برای کارکرد منظم مغز در تجربه‌های معنوی برای ژن‌هایی نظیر ژن خدای

Dean Hamer نقش "درجه صفر" قائل نباشیم چون به هر صورت قوای ناطقه انسان در دوره حیات جسمانی او متکی به جوهر مادی مغز است و فعالیت های مغزی عمل ذهن و به طور غایی بروز تجربه های معنوی و ایمانی را در پی خواهد داشت.

منابع:

- افسری، ل.، طاهری، س.، صلواتی، ع. (۱۳۹۹). تبیین مراتب و عوالم هستی از منظر علامه طباطبائی با تکیه بر آرای فلسفی، قرآنی و عرفانی ایشان. مجله عرفان اسلامی (ادیان و عرفان): ۱۶: ۶۳: ۱۵۱-۱۳۹.
- آلاله، م. (۱۳۹۶). بررسی پلی مورفیسم ژن VMAT₂ در افراد جامعه ایران به منظور بررسی فرضیه ژن خدا. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۲۶ص.
- آل محمد، س. ع.، رحمانی، م. (۱۳۷۸). مبانی ژنتیک مولکولی. انتشارات فاطمی، ۱۸۰ص.
- سرل، ج. آر. (۱۳۸۷). فلسفه ذهن (ترجمه: امیر یزدی). نشر نوید، ۱۸۸ص.
- سرل، ج. آر. (۱۳۸۸). ذهن، مغز و علم (ترجمه: امیر دیوانی). انتشارات بوستان، ۲۰۴ص.
- غزالی، ا. م. (۱۳۹۰). المنقذ من الضلال (ترجمه: سید ناصر طباطبائی). انتشارات مولی، ۱۶۰ص.
- کیانخواه، ل. (۱۳۸۶). بررسی تعارض قانون علیت و اصل عدم قطعیت. نشریه حکمت سینوی: ۱۱: ۳۷-۳۶.
- Alston, W.P. (1993). Perceiving God: The Epistemology of Religious Experience. Duke University Press, Pp. 230-232 & 283.
- Baldwin, E. D. (2000). Plantinga and warranted Christian belief: A probabilistic defeater based on multiple theistic extensions of the extended A/C model. California State University, Long Beach.
- Bishop, J. (2007). Believing by Faith: An Essay in the Epistemology and Ethics of Religious Belief, Oxford, Clarendon press.
- Carroll, T. D. (2008). The traditions of fideism. Religious Studies, 44(1), 1-22.
- Clegg, J. S. (1979). Faith. American Philosophical Quarterly, 16(3), 225-232.
- Hakeem, O., Lawal and David E. Krantz. (2013). SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. Molecular Aspects of Medicine, 34: 2-3: 360-372.
- Hamer, D. (2004). The God gene. How Faith is Hardwired into Our Genes. New York: Pp.248. Doubleday (ISBN-0-385-50058-0).
- Haworth, C. M. A., Wright, M.J & Martin Nicolas W. (2009). A twin study of the genetics of high cognitive ability selected from 11,000 twin pairs in six studies from four countries. Behavior Genetics, 39: 4: 359-70.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2009). Berne & Levy Physiology, Updated Edition E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Newberg, A., Pourdehnad, M. (2003). Cerebral blood flow during meditative prayer: preliminary findings and methodological issues. Perceptual and Motor Skills, 97: 2: 625-630.

- Newberg A., Wintering, N. (2010). Waldmanb Meditation Effects on Cognitive Function and Cerebral Blood Flow in Subjects with Memory Loss: A Preliminary Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20: 517–526.
- Osborn, E. (2003). *Tertullian, first theologian of the West*. Cambridge University Press.
- Previc, F.H. (2006). The role of extrapersonal brain systems in religious activity. *Consciousness and Cognition*, 15: 500-39.
- Rilstone J., Alkhater RA, Minassian BA. (2013). Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *New England Journal of Medicine*, 368(6):543-50. doi: 10.1056/NEJMoa1207281.
- Schjoedt, U. (2009). The religious brain: A general introduction to the experimental neuroscience of religion. *Method & Theory in the Study of Religion*, 21(3), 310-339.
- Silveira, L. A. (2008). Experimenting with spirituality: analyzing The God Gene in a nonmajors laboratory course. *CBE—Life Sciences Education*, 7(1), 132-145.

A critical analysis of the relationship between the "God gene" theory and faithism

G.H. Khedri^{1*}, V. Azizi²

Received:2022.01.11

Accepted:2022.03.12

Abstract

Introduction: Study of behavioral genetics, neurophysiology and neurophilosophy as well as comprehensive applications of empirical tools for describing the foundations of spirituality beings have posed serious questions and ambiguities about the origin and nature of faith. **Methods:** Dean Hamer (1951-) aimed to identify meaningful correlations between behavioral genes and profound experiences. According to Hamer, the VMAT2 gene or God's gene plays a key role in spiritual and faith experiences. The present paper seeks to measure and evaluate the theory of God gene and tendency towards faith. **Results & discussion:** Overall, the role of genes in the functioning of the mind in the occurrence of semantic and faith actions cannot be denied and gave it a zero degree role. There are competing theories set forth against Hamer's theory, proving that basic beliefs and faiths are not genetically rooted nor inherited whatsoever. The available information on gene polymorphisms cannot provide a complete explanation of the processes of personality and faith-oriented spirituality. Rather, physicalist descriptions are exclusive to the physical aspects and not the extracorporeal and semantic aspects of human.

Keywords: *Dean Hamer, faithism, VMAT2 gene*



1. Associate Professor, Department of Philosophy, Theology and Mysticism, Payam Noor University, South Tehran Branch, Tehran, Iran (*Corresponding author: gh.khedri@jonoub.tpmu.ac.ir)

2. Assistant Professor, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran V_Azizi@sbu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵

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

doi 10.22051/JAB.2021.34309.1398

ارزیابی تأثیر پروبیوتیک Bio-Aqua® بر شاخص های رشد و بازماندگی، کیفیت لاشه ماهی، اندیس های خونی و بیوشیمیایی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و متغیرهای فیزیکیوشیمیایی آب محیط پرورش

امید رمضان نژاد^۱، *صابر وطن دوست^۲، *رضا چنگیزی^۳، حامد منوچهری^۴، رضا صفری^۵

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک بیوآکوا بر شاخص های رشد، کیفیت لاشه و مولفه های خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور نقره ای و همچنین مولفه های فیزیکیوشیمیایی آب محیط پرورش انجام شد. برای این منظور ماهیان کپور نقره ای به ترتیب با میانگین وزنی اولیه $0.5 \pm 1/1$ گرم با تیمارهای آزمایشی منتخب برای ۴ ماه پرورش داده شدند. تیمارها شامل شاهد (تیمار شاهد)، T1 (۲۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا)، T2 (۳۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا) و T3 (۴۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا) که به آب استخرهای حاکی اضافه شدند. بر اساس نتایج، میزان نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ رشد روزانه (DGR)، وزن اکتسابی (WG)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، درصد بازماندگی و شاخص های خونی و بیوشیمیایی در تیمار ۳ (۴۵۰ گرم/هکتار) نسبت به گروه شاهد و تیمارهای ۱ (۲۵۰ گرم در هکتار) و ۲ (۳۵۰ گرم در هکتار) اختلاف معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). همچنین اختلاف معناداری در ترکیبات شیمیایی لاشه (درصد پروتئین خام و درصد رطوبت) ماهیان کپور نقره ای تیمارهای ۲ و ۳ در مقایسه با تیمارهای شاهد و ۱ وجود داشت ($p < 0.05$). علاوه بر آن، استفاده از ۴۵۰ گرم بیوآکوا/هکتار (در تیمار ۳) موجب کاهش معنی دار مقادیر TSS، BOD، COD، نیتريت و فسفات آب در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی

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

۲. استادیار گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران (* نویسنده مسؤول: s.vatandoust@gmail.com)

۳. استادیار گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران (* نویسنده مسؤول: changizi@baboliau.ac.ir)

۴. استادیار گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۵. دانشیار گروه تغذیه، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

شد ($p < 0.05$). نتیجه گیری شد، اثرات پروبیوتیک بیواکوا، به ویژه در $T3$ (45°C گرم در هکتار) بر شاخص های رشد، بازماندگی، کیفیت لاشه، شاخص های خونی و بیوشیمیایی و همچنین شاخص های فیزیکیوشیمی آب مطلوب بوده و می توان از آن در سایت های پرورش ماهیان گرمابی با هدف بهینه سازی رشد و محیط پرورش استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک بیواکوا، ترکیب لاشه، کپور نقره ای، شاخص های رشد، اندیس های فیزیکیوشیمیایی، شاخص های خونی

مقدمه

از نظر اقتصادی ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) یکی از مهمترین ماهی ها است که در آسیا و ایران به طور گسترده پرورش می یابد (Asadian et al., 2015).

پرورش به روش متراکم، تنش محیطی بالقوه ای را برای ماهی ها ایجاد می کند که منجر به حساسیت زیاد به عوامل مختلف بیماری از جمله باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها و انگل ها می شود و متعاقب آن نیز خسارات اقتصادی زیادی را در پی خواهد داشت. اخیراً، به دلیل افزایش مقاومت بیشتر باکتری های عفونی و همچنین خطرات جدی محیطی، استفاده از آنتی بیوتیک ها ممنوع شده است (Lazado & Caipang, 2014, Wang et al., 2014). به همین دلیل، استفاده از مواد افزودنی خوراکی که به عنوان محرک رشد و تحریک کننده سیستم ایمنی در غذاهای آبی استفاده می شوند، بسیار توصیه می شود. پروبیوتیک ها، میکروارگانیسم هایی مانند قارچ ها و باکتری ها هستند و وجود آنها در اندام های گوارشی بویژه روده عاملی ارزشمند است که منجر به ایجاد تعادل میکروبی می گردد. *Bifidobacter*، *Enterococcus*، *Leuconostoc*، *Lactococcus*، *Lactobacillus*، *Clostridium* و *Shewanella*، *Carnobacterium*، *Bacillus*، *Aeromonas*، *Vibrio*، *Enterobacter*، *Pseudomonas*، *Saccharomyces* پروبیوتیک های رایجی هستند که در آبی پروری استفاده می شوند (Nayak, 2010). اثرات مثبت پروبیوتیک ها به عنوان یک افزودنی خوراکی بر عملکرد رشد، سیستم ایمنی ذاتی، میکروفلور روده، تنش و مقاومت در برابر بیماری و بهبود کیفیت آب در بسیاری از گونه های ماهی مانند کپور معمولی، کپور سرگنده و کپور نقره ای تأیید شد (Kumar et al., 2006, Wang, 2011, Adel et al., 2015, Asadian et al., 2015). پروبیوتیک ها با تنظیم ژن های پیش التهاب سیتوکین و افزایش فعالیت فاگوسیتیک لکوسیت ها، می توانند سیستم ایمنی ماهی را تحریک کنند. مکمل پروبیوتیکی بیواکوا یک پروبیوتیک تجاری (پروبیوتیک چند سویه) از جمله *Bacillus sp.*، *Lactobacillus sp.* و *Bifidobacterium bifidum* و *Saccharomyces cerevisiae* است که در میان کاندیداهای اصلی به عنوان ماده ایمن برای بهبود تغذیه افراد سالم شناخته می شود (Renuka et al., 2013). مطالعه Akbari Nargesi و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که استفاده از مکمل پروبیوتیکی بیواکوا (رژیم ۲ گرم بر کیلوگرم) در رژیم غذایی قزل آلا رنگین کمان باعث افزایش مولفه های رشد از جمله افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و وزن نهایی می شود.

اهداف اصلی این مطالعه ارزیابی اثرات مکمل غذایی پروبیوتیکی بیوآکوا بر عملکرد رشد، ترکیب لاشه، شاخص های خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور نقره ای و مولفه های فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش بوده است.

مواد و روش ها

تهیه ماهی

ماهی کپور نقره ای سالم بر اساس مشخصات ظاهری و مورفولوژی و عدم مشاهده ضایعات جلدی به تعداد ۲۴۰۰ قطعه با میانگین وزن 0.05 ± 0.1 گرم از یکی مزارع پرورش ماهی در استان مازندران تهیه گردید. به منظور سازگاری، ماهیان به مدت ۲ هفته در استخرهای خاکی (۵۰۰ متر مکعب) نگهداری شدند. سپس ماهیان به طور تصادفی در ۱۲ استخر خاکی (۲۰۰ قطعه در استخر) توزیع شده و به مدت دو هفته با جیره غذایی تجاری (تغذیه آبزیان، مازندران، ایران) تغذیه شدند.

آماده سازی رژیم های غذایی پروبیوتیک و آزمایشگاهی

مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا از شرکت زیست دارمن ماهان (تهران، ایران) به دست آمد. این مکمل حاوی: *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus* (باکتری *acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* و *Saccharomyces crevisiae*) (۳×۱۰^۶CFU/g). در این مطالعه تیمار شامل: شاهد (۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا)، T1 (۲۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا)، T2 (۳۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا) و T3 (۴۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک بیوآکوا) که به آب استخرهای خاکی اضافه شدند. در دو ماه دوم، مقادیر این مکمل دو برابر شد (Al-Fargi et al., 2013). ماهیان با اکستروید مازندران (۴٪ از وزن بدن) چهار بار در روز و به مدت ۱۲۰ روز تغذیه شدند. جیره غذایی ماهی شامل ۳۸/۷ ± ۱/۵٪ پروتئین خام، ۹/۱ ± ۰/۴٪ چربی خام، ۹/۲ ± ۰/۵٪ رطوبت، ۷/۰ ± ۰/۲٪ خاکستر و ۴۵۲۱/۳ ± ۲۰۸/۱ کالری/گرم انرژی بود.

ترکیب تقریبی ماهی

در پایان تعداد ۹ ماهی از هر تکرار از هر استخر خاکی به طور تصادفی انتخاب شدند. ترکیب تقریبی مطابق با روش های استاندارد توصیف شده توسط روش استاندارد (AOAC 2005) انجام شد. رطوبت با خشک کردن نمونه ها در کوره هوای گرم (Behr, Germany) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. چربی خام، پروتئین و خاکستر به ترتیب با استخراج کلروفرم

متانول (نسبت حجمی ۱ به ۲)، روش کج‌دال ($N \times 25/6$) و سوزاندن در کوره در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت تعیین شد (AOAC 2005).

زیست سنجی

تغذیه تمام ماهیان ۲۴ ساعت قبل از توزین و اندازه گیری قطع شد و مولفه های زیر در پایان دوره تغذیه بعد از ۴ ماه اندازه گیری شد.

وزن اکتسابی (WG) = وزن اولیه - وزن نهایی (گرم) (Tacon, 1990)

جایی که W1 وزن اولیه است، W2 وزن نهایی است (Tacon, 1990).

نرخ رشد روزانه (DGR) = (وزن اولیه - وزن نهایی) / طول دوره پرورش (Tacon, 1990)

جایی که $\ln$ = لگاریتم طبیعی، W2 = وزن نهایی در زمان t2، W1 = وزن اولیه در زمان t1. (Tacon, 1990)

ضریب تبدیل غذای (FCR) = (افزایش وزن / غذای خورده شده) (Tacon, 1990)

ضریب رشد ویژه (SGR) = ((لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن ثانویه) / (زمان ثانویه - زمان اولیه)) $\times 100$ (Tacon, 1990)

نرخ بقا (درصد بازماندگی) = (تعداد اولیه ماهیان - تعداد ماهیان موجود) $\times 100$ (Tacon, 1990)

نمونه برداری خون

بعد از ۱۲۰ روز، غذای ماهی ها ۲۴ ساعت قبل از نمونه گیری قطع شد و قبل از نمونه برداری، ماهیها با اسانس گل میخک (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) بیهوش شدند (Soltani et al., 2017). نمونه های خون (حدود ۱ میلی لیتر) از ورید ساقه دمی گرفته شده و بلافاصله برای جمع آوری سرم به لوله های غیر هپارینیزه منتقل شدند (۳۰ قطعه ماهی در هر گروه). نمونه های خون هفت ماهی از هر مخزن بلافاصله به دو قسمت تقسیم شدند. نیمی برای مطالعه آنالیز خون به لوله های حاوی ضد انعقاد (هپارین) منتقل و نیمی دیگر برای انجام مطالعات بیوشیمیایی به لوله های غیر هپارینیزه منتقل شدند. نمونه های سرم ها پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ g گرم در دمای ۴ درجه سانتیگراد توسط نمونه های خون انعقادی به دست آمدند و تا زمان استفاده در دمای منهای ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد (Binaii et al., 2014)

در انتهای دوره ۴ ماهه، جهت ارزیابی تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک بیواکوا بر برخی شاخص های خون و مقایسه بین تیمارهای مختلف، ماهیان ابتدا با اسانس گل میخک بیهوش شده (Adel et al., 2017). در ادامه از هر تیمار ۹ نمونه (هر تکرار ۳ نمونه) خون محیطی از ورید ساقه دمی به صورت تصادفی انجام شد و به ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین، منتقل شد (۱)

قطره هپارین به ازای ۱ میلی لیتر خون). سپس نمونه ها در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه خون شناسی و ایمنی شناسی استاندارد منتقل و شمارش گلبول قرمز (RBC)، شمارش گلبول سفید (WBC)، میزان هماتوکریت (Hct) و غلظت هموگلوبین (Hb) صورت گرفت.

اندازه گیری مولفه های خونی

گلبول های قرمز خون ($RBC: 10^6 \text{ mm}^{-3}$) و گلبول های سفید خون ($WBC: 10^3 \text{ mm}^{-3}$) توسط لام هماسیتومتر Neubauer با استفاده از مایعات رقیق کننده Hayem و Turck شمارش شدند (Blaxhall & Daisley, 1973). هماتوکریت (Ht%) با استفاده از روش میکروهماتوکریت استاندارد اندازه گیری و به صورت درصد بیان شد. اندازه گیری هموگلوبین ($Hb, g \text{ dl}^{-1}$) مطابق روش سیانومت هموگلوبین انجام شد. بعلاوه، سلول های لکوسیت با تهیه اسمیرهای آغشته به گیمسا اندازه گیری شدند. به منظور شمارش تعداد سلول های خونی، اسمیرهای خون توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش با استفاده از لام نئوبار گلبول قرمز را در ۵ خانه از ۲۵ خانه مربوط به گلبول های قرمز را شمرده و سپس مجموع گلبول های قرمز شمارش شده در ۵ خانه را در عدد $10/000$ ضرب کرده تا تعداد گلبول قرمز در یک میلیتر مکعب خون محاسبه گردد. برای شمارش گلبول سفید، ۴ مربع ۱۶ تایی مربوط به گلبول های سفید شمارش شده و مجموع گلبول های سفید شمارش شده در عدد ۵۰ ضرب گردید. (Blaxhall & Daisley, 1973).

آنالیز بیوشیمیایی

فعالیت های آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، میزان آلبومین و پروتئین کل با استفاده از کیت های تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) و آنالیزر اتوماتیک بیوشیمیایی (Eurolyser, Belgium) تعیین شد. (Adel *et al.*, 2015)

آنالیز فیزیکیوشیمیایی آب استخرهای پرورش ماهی

نمونه برداری از آب استخرهای منتخب به صورت هفتگی انجام شد. بدین منظور ۴ نمونه از هر استخر (با سه تکرار) انجام گرفت. نمونه ها در حداقل زمان در کنار جعبه های یخ (۴ درجه سانتی گراد) به آزمایشگاه آب منتقل شدند همچنین دما به وسیله دماسنج جیوه ای، اکسیژن محلول به روش وینکلر اندازه گیری شد و مقدار اسیدیته آب، به کمک pH متر قابل حمل با الکتروود حساس (مدل WTW-320) تعیین گردید (APHA, ۲۰۰۵). کل مواد جامد محلول (TDS) و کل مواد جامد معلق (TSS) از طریق روش وزنی، نیاز اکسیژن شیمیایی (COD) از طریق روش تیتراسیون، نیاز اکسیژنی بیولوژیک (BOD) از طریق دستگاه

BOD Track، قلیائیت و فسفات محلول از روش تیتراسیون، آمونیوم و نیتريت با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد (Boyd & Gross, 1998).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار نسخه ۲۰ SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)، با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way analysis of variance) و به دنبال آن آزمون های چند دامنه ای دانکن انجام شد. مقدار $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. تمام داده ها در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

نتایج

فاکتورهای رشد

نتایج مربوط به فاکتورهای رشد تیمارهای مختلف کپور نقره ای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا در انتهای دوره در جدول ۱ آمده است. بر اساس این نتایج میزان نرخ رشد ویژه (SGR)، وزن اکتسابی (WG) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمار ۳ (۴۵۰ گرم در هکتار) نسبت به گروه شاهد و تیمارهای ۱ (۲۵۰ گرم در هکتار) و ۲ (۳۵۰ گرم در هکتار) اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). مطابق با نتایج به دست آمده با افزایش مقادیر بیوآکوا از ۲۵۰ به ۴۵۰ گرم در هکتار به میزان فاکتورهای مورد مطالعه (به استثنای FCR) افزوده شده است ($P < 0.05$). همچنین بیشترین میزان زنده مانی در تیمار ۳ مشاهده شد که تفاوت معناداری با تیمارهای شاهد و ۱ داشت ($P < 0.05$).

جدول ۱. تأثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا بر روی شاخص های رشد ماهی کپور نقره ای
Table 1: The effect of different amounts of Bioaqua probiotic on silver carp growth indices

مولفه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اکتسابی (WG)	۴۰/۲۷±۰/۸ ^b	۴۳/۱۲±۰/۷ ^b	۴۸/۴۷±۰/۵ ^a	۵۰/۱۳±۰/۶ ^a
نرخ رشد ویژه (SGR)	۱/۲۷±۰/۰۳ ^c	۱/۴۳±۰/۰۲ ^b	۱/۷۴±۰/۰۱ ^a	۱/۸±۰/۰۲ ^a
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	۲/۲۲±۰/۲ ^a	۲/۱۶±۰/۱ ^a	۲/۰۲±۰/۴ ^a	۱/۸۲±۰/۳ ^b
درصد بازماندگی	۷۲/۱±۳ ^c	۸۴±۱/۸ ^b	۹۱±۱ ^a	۹۳±۱/۵ ^a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P < 0.05$).

The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

نتایج ترکیبات شیمیایی لاشه

در جدول ۲ آنالیز ترکیب شیمیایی بدن ماهیان کپور نقره ای تغذیه شده با مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا در انتهای دوره نشان داده شده است. بررسی آماری نشان دهنده آن است که اختلاف معناداری در ترکیبات شیمیایی لاشه (درصد پروتئین خام و درصد رطوبت) میان ماهیان کپور نقره ای تغذیه شده با جیره ۳ (۴۵۰ گرم در هکتار) و ۲ (۳۵۰ گرم در هکتار)

با تیمارهای شاهد و ۱ (۲۵۰ گرم بیواکوا در هکتار) وجود دارد ($P < 0.05$). هر چند اختلاف معنی داری از نظر درصد چربی خام و خاکستر بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۲- تاثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیواکوا روی ترکیبات شیمیایی لاشه کپور نقره ای
Table 2: The effect of different amounts of Bioaqua probiotic on silver carp body composition

مولفه (%)	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
پروتئین خام	۱۴/۳±۰/۱ ^b	۱۴/۹±۰/۲ ^b	۱۵/۱±۰/۳ ^{ab}	۱۵/۹±۰/۲ ^a
چربی خام	۲/۳±۰/۲ ^a	۲/۲±۰/۱ ^a	۲/۲±۰/۲ ^a	۲/۰±۰/۱ ^a
خاکستر	۲/۴±۰/۱ ^a	۲/۳±۰/۱ ^a	۲/۳±۰/۱ ^a	۲/۱±۰/۱ ^a
رطوبت	۷۹/۳±۰/۸ ^a	۷۸/۷±۰/۹ ^a	۷۸/۳±۰/۴ ^{ab}	۷۷/۶±۰/۵ ^b

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P < 0.05$).

The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

مشخصات خون شناسی

تعداد گلبول های سفید خون در تیمارهای پروبیوتیکی بیواکوا به طور قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0.05$) (جدول ۳). بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار T3 مشاهده شد که از نظر آماری تفاوت معنی داری با سایر تیمارها، به ویژه شاهد داشت ($P < 0.05$). بر اساس نتایج، اختلاف معنی داری در درصد نوتروفیل و مونوسیت، هموگلوبین، مقدار هماتوکریت و تعداد RBC در T2 و T3 در مقایسه با شاهد و درمان T1 وجود داشت ($P < 0.05$). اختلاف معنی داری در درصد ائوزینوفیل در تیمارهای مورد مطالعه مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳- تاثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیواکوا بر روی شاخص های خونی کپور نقره ای
Table 3: The effect of different amounts of Bioaqua probiotic on silver carp hematological factors

مولفه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
RBC ($\times 10^6$)	۱/۱۹±۰/۰۲ ^b	۱/۲۴±۰/۰۵ ^{ab}	۱/۲۷±۰/۰۳ ^a	۱/۳۳±۰/۰۴ ^a
WBC ($\times 10^3$)	۲۲/۴۳±۰/۷ ^d	۲۴/۱۶±۰/۰۵ ^c	۲۷/۵۹±۰/۰۳ ^b	۲۹/۰۶±۰/۰۸ ^a
HCT (%)	۲۶/۵۲±۰/۶۵ ^b	۲۶/۶۳±۱/۱۳ ^b	۲۸/۷۷±۱/۴۴ ^a	۲۹/۳۵±۱/۹۴ ^a
Hb (g/dl)	۷/۵۵±۰/۷ ^b	۷/۷۲±۰/۱۸ ^b	۸/۰۲±۰/۱۶ ^{ab}	۸/۳۱±۰/۲۳ ^a
مونوسیت %	۳/۲۸±۰/۰۶ ^b	۳/۳۸±۰/۰۴ ^b	۳/۷۰±۰/۰۵ ^{ab}	۴/۱۴±۰/۰۴ ^a
لنفوسیت %	۷۱/۰۹±۱/۱۷ ^a	۶۷/۴۲±۱/۵۸ ^b	۷۰/۸۰±۱/۳ ^a	۶۸/۳۲±۱/۳ ^b
نوتروفیل %	۲۳/۴۲±۱/۲ ^b	۲۲/۵۷±۰/۸ ^b	۲۴/۱۸±۱/۰ ^a	۲۵/۱۶±۱/۱ ^a
ائوزینوفیل %	۰/۵۲±۰/۰۸ ^a	۰/۴۸±۰/۰۲ ^a	۰/۵۳±۰/۰۳ ^a	۰/۵۰±۰/۰۳ ^a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P < 0.05$).

The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

مولفه های بیوشیمیایی

نتایج تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی در جدول ۴ نشان داده شد. بر اساس این نتایج، تفاوت معنی داری در فعالیت ALT ماهی کپور نقره ای در بین همه گروه های مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۴). با این حال، تفاوت معنی داری در فعالیت ترانس آمیناز آسپارات (AST) و سطح آلومین سرم در T3 (۴۵۰ g/ha) با سایر تیمارها، به ویژه گروه شاهد وجود داشت ($P < 0.05$).

همچنین اختلاف معنی داری بین T3 (۴۵۰ g/ha) و T2 (۳۵۰ g/ha) با شاهد و T1 (۲۵۰ g bioacoustics / ha) از نظر مقدار پروتئین کل وجود داشت ($P < 0.05$).

جدول ۴- تأثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا بر روی شاخص های بیوشیمیایی کپور نقره ای

Table 4: The effect of different amounts of Bioaqua probiotic on silver carp biochemical factors

مولفه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
آسپارات آمینوترانسفراز (AST)	۳۱۸±۴/۲ a	۳۱۵±۳/۱ a	۳۰۱±۲/۷ b	۲۸۷±۱/۵ c
آلانین آمینوترانسفراز (ALT)	۸/۳۴±۰/۸۲ a	۸/۴۲±۰/۱۶ a	۸/۱۶±۰/۱۹ a	۸/۴۱±۰/۱۴ a
آلبومین (گرم/دسی لیتر)	۰/۶۷±۰/۲ b	۰/۷۲±۰/۱ b	۰/۸۱±۰/۲ b	۰/۹۴±۰/۱ a
پروتئین تام (گرم/دسی لیتر)	۳/۸±۰/۲ b	۳/۷±۰/۱ b	۳/۹±۰/۱ ab	۴/۳±۰/۱ a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P < 0.05$).

The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

مولفه های فیزیکیوشیمیایی آب استخرهای محیط پرورش

تأثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا بر روی مولفه های فیزیکیوشیمیایی آب استخرهای پرورشی به صورت خلاصه در جدول ۵ آمده است. نتایج نشان داد که استفاده از ۴۵۰ گرم بیوآکوا در هکتار (در تیمار ۳) موجب کاهش معنادار مقادیر TSS، COD، BOD، نیتريت و فسفات آب در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی شده است ($P < 0.05$). اگرچه نتایج نشان دهنده آن است که مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا بر روی شاخص های دما، pH، شوری، TDS و آمونیاک آب استخرهای پرورشی تأثیر معناداری نداشته است ($P > 0.05$).

جدول ۵- تأثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا روی مولفه های فیزیکیوشیمیایی آب استخرهای پرورش

Table 5: The effect of different amounts of Bioaqua probiotic supplement on the physicochemical parameters of carp culture pond water

مولفه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
دما (درجه سانتیگراد)	۳۱/۲±۰/۳ a	۳۱/۵±۰/۵ a	۳۱/۵±۰/۲ a	۳۱/۶±۰/۴ a
pH	۸/۵±۰/۱ a	۸/۳±۰/۲ a	۸/۴±۰/۱ a	۸/۶±۰/۱ a
شوری (ppt)	۳/۱±۰/۰۷ a	۳/۲±۰/۰۸ a	۳/۴±۰/۰۵ a	۳/۲±۰/۰۸ a
TDS (ppt)	۲/۴۸±۰/۰۳ a	۲/۵±۰/۰۱ a	۲/۶۱±۰/۰۲ a	۲/۳۶±۰/۰۳ a
TSS (میلی گرم/لیتر)	۲۷۹/۰±۵/۲ a	۲۶۸/۵±۸/۳ b	۲۲۸/۵±۷/۴ c	۲۱۰/۰±۵/۰ d
BOD (میلی گرم/لیتر)	۴/۰±۰/۱ a	۳/۷۵±۰/۱۲ ab	۳/۵۵±۰/۰۵ ab	۳/۱±۰/۰۵ b
COD (میلی گرم/لیتر)	۱۴/۰±۰/۸ a	۱۳/۳±۱/۲ a	۱۲/۵±۱/۲ ab	۱۰/۱۷±۱/۲ b
آمونیاک (میلی گرم/لیتر)	۰/۱۹±۰/۰۲ a	۰/۲±۰/۰۱ a	۰/۱۹±۰/۰۱ a	۰/۱۸±۰/۰۱ a
نیتريت (میلی گرم/لیتر)	۰/۰۹±۰/۰۲ a	۰/۱۰±۰/۰۱ a	۰/۰۷±۰/۰۱ ab	۰/۰۶±۰/۰۱ b
فسفات (میلی گرم/لیتر)	۰/۰۶۲±۰/۰۲ a	۰/۰۶۰±۰/۰۲ a	۰/۵۷۰±۰/۰۲ a	۰/۰۳۴±۰/۰۲ b

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه است ($P < 0.05$).

The different lowercase letter shows a significant difference ($p < 0.05$)

بحث

بهینه سازی فاکتورهای تغذیه‌ای و ایمنی می‌تواند باعث سازگاری اکولوژیکی، رشد بهتر و کاهش تلفات سنگین در طی دوره پرورش در آبزیان گردد. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها، افزایش ارزش غذایی و نیز بهبود مولفه‌های رشد میزبان است. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح مختلف مکمل پروبیوتیکی بیواکوا به آب استخرهای خاکی تأثیر قابل توجهی بر عملکرد رشد ماهیان کپور نقره ای دارد. در انتهای مطالعه، تیمار T3 (۴۵۰ گرم در هکتار) بالاترین افزایش وزن، فاکتور رشد خاص و میزان بقا را دارد. در مطالعه مشابه Akbari Nargesi و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که استفاده از پروبیوتیک تجاری بیواکوا به میزان ۲ گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل آلا رنگین کمان منجر به بهبود شاخص های رشد ماهیان مانند افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و میانگین وزن نهایی، می‌شود. همچنین نشان داده شده اند که استفاده از اسپورهای باسیلوس های پروبیوتیکی *Bacillus latrospores* و *Bacillus licheniformis* که به آب مخزن پرورش داده می شود، رشد و بقای کپور نقره را بهبود می بخشد (Sahandi et al., 2019). نتایج مشابهی توسط محققان دیگر در ماهی کپور گزارش شده است (Renuka et al., 2014, Wang et al., 2013, Safari et al., 2016). نشان داد که تجویز پروبیوتیک *Enterococcus casseliflavus* در بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان 10^8 و 10^9 CFU/g، به طور قابل توجهی عملکرد رشد ماهی کفشک را افزایش می دهد. Sahandi و همکاران (۲۰۱۹) تایید کردند که سویه های بیفیدوباکتریوم می تواند در بچه ماهی قزل آلا باعث افزایش هضم و استفاده از مواد مغذی شود و عملکرد رشد ماهی را بهبود بخشد. پروبیوتیک ها با تولید ترکیبات بازدارنده، سهم آنزیمی در هضم، افزایش جمعیت باکتری های مثبت مانند LAB و تعدیل پاسخ های ایمنی و بهبود کیفیت آب می توانند عملکرد رشد ماهی را بهبود بخشند (Al-Faragi & Al-Saphar, 2013, Morshedi et al., 2015, Zorriehzahra et al., 2016). نتایج این مطالعه نشان داد که مکمل پروبیوتیکی بیواکوا میزان بقای کپور نقره را افزایش می دهد. بالاترین سطح میزان بقا در تیمار T3 مشاهده شد که تفاوت معنی داری با تیمارهای شاهد و T1 داشت. دلایل این افزایش ممکن است مربوط به از بین بردن باکتری های مضر توسط باکتری های مفید در این پروبیوتیک چند سویه به خصوص لاکتوباسیلوس پلانتاروم *L. plantarum*، لاکتوباسیلوس کازی *L. casei*، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *L. acidophilus* و لاکتوباسیلوس رامنوسوز *L. rhamnosus* باشد. Wang (۲۰۱۴) نشان داد که باکتری های اسید لاکتیک ترکیباتی مانند باکتریوسین تولید می کنند و با جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مضر در روده عمل می کنند. شاخص های خون شناسی به عنوان شاخص های زیستی ارزشمندی که نشان دهنده پاسخ به تنش های فیزیولوژیکی و همچنین وضعیت سلامت عمومی هستند، بکار می روند. بر اساس نتایج، اختلاف معنی داری در درصد نوتروفیل و مونوسیت، هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد RBC و WBC در تیمارهای T2 و T3 در مقایسه با شاهد و درمان T1 وجود داشت ($P < 0.05$). این نتایج بهبود سیستم ایمنی کپور نقره ای پرورش داده شده در آب غنی شده حاوی سطوح مختلف مکمل پروبیوتیکی بیواکوا پس از ۴ ماه است. در مطالعه مشابه، تعداد گلبول های قرمز (RBC)، هماتوکریت و هموگلوبین ماهی

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در گروه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم بالاتر از گروه شاهد بود (Soltani et al., 2017). مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که استفاده از باسیلوس سوبتیلیس به عنوان پروبیوتیک در کپور ماهی هندی (*Labeo rohita*) موجب تأثیر معنادار در تعداد گلبول های سفید خون، شاخص های ایمنی و افزایش بازماندگی ماهی در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا می گردد. Al-dohail و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند اضافه کردن پروبیوتیک *L. acidophilus* به جیره گربه ماهی آفریقایی، *Clarias gariepinus*، باعث افزایش سطح همتوکریت، هموگلوبین و هم چنین تعداد کل گلبول های قرمز و سفید شد. پروتئین تام پلاسما شامل پروتئین های آلبومین و گلوبولین است. تصور می شود که افزایش میزان آلبومین، گلوبولین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان باشد (de Paiva-Maia et al., 2013). در مطالعه حاضر افزایش معنی داری بین تیمار ۳ (۴۵۰ گرم در هکتار) و ۲ (۳۵۰ گرم در هکتار) با تیمارهای شاهد و ۱ (۲۵۰ گرم بیواکوا در هکتار) از نظر میزان پروتئین تام سرم مشاهده شد ($P < 0.05$). افزایش سطح پروتئین های سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی مطرح می باشد. در مطالعه مشابه، Soltani و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ماهیان کپور تغذیه شده با غلظت های مختلف *L. plantarum* دارای سطح بالاتری از پروتئین کل سرم در مقایسه با شاهد است. Safari و همکاران (۲۰۱۶) تعداد نوتروفیل ها به طور قابل توجهی در تمام گروه های پروبیوتیک (*Enterococcus casseliflavus*) بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان در مقایسه با شاهد افزایش داشت. در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم های کبدی (ALT و AST) تحت تأثیر مقادیر مختلف مکمل پروبیوتیکی بیواکوا قرار نگرفته است. به طور کلی، افزایش فعالیت های ترانس آمیناز آلانین (ALT) و (AST) معمولاً به عنوان شاخص آسیب کبدی در نظر گرفته می شود (Sheikhzadeh et al., 2012). بنابراین، این نتایج نشان می دهند که مکمل پروبیوتیکی بیواکوا برای سلامت کبد سمی نبوده است. در گزارش مشابه، اختلاف معنی داری در سطح آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) ماهی کپور تغذیه شده با غلظت های مختلف لاکتوباسیلوس پلانتاروم *L. Plantarum* دیده نشد.

بر اساس نتایج حاضر، تفاوت معنی داری در ترکیب شیمیایی ماهی کپور نقره ای (درصد پروتئین خام و میزان رطوبت) در T2 و T3 در مقایسه با شاهد و T1 وجود داشت ($P < 0.05$). در مطالعه مشابه، Jafarian و همکاران (۲۰۱۴) تایید کردند که باسیل و *S. cerevisiae* جدا شده از روده بلوگا (*Huso huso*) به طور قابل توجهی باعث افزایش پروتئین لاشه در مقایسه با گروه کنترل می شوند. Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که جنس باسیلوس جدا شده از روده ماهی کپور به عنوان پروبیوتیک باعث افزایش پروتئین خام راهو، *Labeo rohita* می شود. Weifen و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که پروبیوتیک ها احتمالاً سطح چربی لاشه را کاهش می دهند و از طریق افزایش قابلیت هضم چربی و پروتئین کیفیت آنها را افزایش می دهند. در آبی پروری کیفیت آب نقش مهمی در سلامت ماهی، رشد و بقاء آن ایفا می کند. از جمله مزایای پروبیوتیک ها در استخرهای آبی پروری افزایش تجزیه مواد آلی، بهبود رشد جلبکی، افزایش اکسیژن محلول، کنترل آمونیاک، نیتريت و سولفید

هیدروژن و کاهش شیوع بیماری و در نهایت افزایش تولید است (Boyd & Gross, 1998). در مطالعه حاضر بیوآکوا، در تیمار T3 به طور قابل توجهی TSS، BOD، COD، نیتريت و فسفات آب استخر پرورشی را در مقایسه با سایر تیمارها کاهش داد (P < 0.05). علت این امر وجود باکتری هایی با ویژگی پروبیوتیک در بسته تجاری بوده که وقتی که در غلظت های بالاتر مورد استفاده قرار می گیرند باعث تغییرات معنی دار در مولفه های شیمیایی آب می شوند. این باکتری ها بواسطه تولید آنزیم های مختلف باعث تجزیه نیتريت شده و یا آنکه با فعالیت بالایی که نشان می دهند میزان BOD و COD آب را کاهش می دهند. پروبیوتیک ها با تسريع فرایندهای طبیعی همچون نیتريفیکاسیون، آمونیفیکاسیون، دنتریفیکاسیون، اکسیداسیون سولفیدها و تجزیه ترکیبات سمی سبب بهبود کیفیت آب می شوند (Boyd & Gross, 1998). Zhou و همکاران (۲۰۰۹) و Wang و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک های تجاری میزان نیتروژن و فسفر استخر پرورشی را به طور قابل توجهی کاهش می دهند و ویژگی های کیفیت آب را بهبود می بخشند. Paiva-Maia و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک تجاری در آب استخرهای خاکی میگو پرورشی وانامی موجب افزایش تعداد کلی باکتری های هتروتروف محیط پرورشی می شوند. نتایج ذکر شده همسو با نتایج فعلی و تایید کننده اثرات مثبت مکمل پروبیوتیکی پروآکوا است. در نتیجه مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا به ویژه در غلظت ۴۵۰ گرم در هکتار بر روی شاخص های رشد، تغذیه، بازماندگی و ترکیبات لاشه کپور نقره ای و مولفه های فیزیکوشیمیایی آب پرورشی اثرات معنی داری دارند و استفاده از آن به پرورش دهندگان کپور ماهیان توصیه می شود. با این حال، برای بررسی تأثیر مکمل پروبیوتیکی بیوآکوا بر سیستم ایمنی بدن، مقاومت در برابر بیماری ها و فعالیت آنزیم های روده ماهی کپور نقره ای، مطالعات بیشتری لازم است.

References

- Adel, M.;Lazado, C. C.;Safari, R.;Yeganeh, S. and Zorriehzahra, M. J. (2017). Aqualase®, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 48(4): 1815-1826.
- Adel, M.;Safari, R.;Pourgholam, R.;Zorriehzahra, J. and Esteban, M. Á. (2015). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1): 623-629.
- Akbari Nargesi, E.;Falahatkar, B. and Mohammadi, M. (2019). Growth performance and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exclusive study of probiotic effect on male broodstock. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28(3): 101-112
- Al-Dohail, M. A.;Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40(14): 1642-1652.
- Al-Faragi, J. and Al-Saphar, S. (2013). Effect of local probiotic on common carp *Cyprinus Carpio* growth performance and survival rate. . *Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation*, 1(2): 89-96.

- Asadian, M.;Shahsavani, D. and Kazerani, H. (2015). Growth promoting effects of a multi-strain probiotic on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 7(2): 63-74.
- Binaii, M.;Ghiassi, M.;Farabi, S. M. V.;Pourgholam, R.;Fazli, H.;Safari, R.;Alavi, S. E.;Taghavi, M. J. and Bankehsaz, Z. (2014). Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish & shellfish immunology, 36(1): 46-51.
- Boyd, C. and Gross, A. 1998. Use of probiotics for improving soil and water quality in aquaculture ponds. *Advances in shrimp biotechnology*. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,.
- de Paiva-Maia, E.;Alves Modesto, G.;Otavio-Brito, L.;Olivera, A. and Vasconcelos-Gesteira, T. C. (2013). Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. Latin american journal of aquatic research.
- Kumar, R.;Mukherjee, S. C.;Prasad, K. P. and Pal, A. K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, 37(12): 1215-1221.
- Lazado, C. C. and Caipang, C. M. A. (2014). Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. *Aquaculture*, 424-425: 53-62.
- Morshedi, V.;Nafisi Bahabadi, M.;Azodi, M.;Modaresi, M. and Cheraghi, S. (2015). Effects of dietary probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on body composition, serum biochemical parameters and liver enzymes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Journal of Marine Science and Technology*, 14(2): 1-14.
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.
- Renuka, P.;Venkateswarlu, M.;Ramachandra, T. and Murthappa, P. (2013). Influence Of Probiotics On Growth Performance And Digestive Enzyme Activity Of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Current Research*, 5: 1696-1700.
- Safari, R.;Adel, M.;Lazado, C. C.;Caipang, C. M. A. and Dadar, M. (2016). Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 52: 198-205.
- Sahandi, J.;Jafaryan, H.;Soltani, M. and Ebrahimi, P. (2019). The Use of Two *Bifidobacterium* Strains Enhanced Growth Performance and Nutrient Utilization of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3): 966-972.
- Sheikhzadeh, N.;Karimi Pashaki, A.;Nofouzi, K.;Heidarieh, M. and Tayefi-Nasrabadi, H. (2012). Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(3): 407-410.
- Soltani, M.;Abdy, E.;Alishahi, M.;Mirghaed, A. T. and Hosseini-Shekarabi, P. (2017). Growth performance, immune-physiological variables and disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) orally subjected to different concentrations of *Lactobacillus plantarum*. *Aquaculture International*, 25(5): 1913-1933.
- Tacon, A. G. J. (1990). *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*, Argent Laboratories Press.

- Wang, F.-H.;Qiao, M.;Su, J.-Q.;Chen, Z.;Zhou, X. and Zhu, Y.-G. (2014). High Throughput Profiling of Antibiotic Resistance Genes in Urban Park Soils with Reclaimed Water Irrigation. *Environmental Science & Technology*, 48(16): 9079-9085.
- Wang, Y.-B.;Xu, Z.-R. and Xia, M.-S. (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science*, 71(5): 1036-1041.
- Wang, Y. (2011). Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 17(2): e372-e378.
- Weifen, L.;Xiaoping, Z.;Wenhui, S.;Bin, D.;Quan, L.;Luoqin, F.;Jiajia, Z.;yue, W. and Dongyou, Y. (2012). Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6): 1585-1592.
- Zhou, X.-x.;Wang, Y.-b. and Li, W. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287: 349-353.
- Zorriehzahra, J.;Delshad, S.;Adel, M.;Tiwari, R.;Karthik, K.;Dhama, K. and Lazado, C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update in their multiple modes of action: A review. *The Veterinary quarterly*, 36.

Evaluation of Bio-Aqua probiotic on growth performances and survival, carcass quality, chemical composition, blood and biochemical parameters of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and physico-chemical factors of pond water

O.Ramzannezhad¹, S. Vatandoust^{2*}, R. Changizi^{3*}, H. Manouchehri⁴,
R. Safari⁵

Received:2021.07.06

Accepted:2022.02.07

Abstract

This study was performed to investigate the effect of Bio-Aqua ® probiotic on growth performances, proximate factors, hematological and biochemical indices of silver carp and also physicochemical parameters of pond culture. Fish weighting 1 ± 0.1 g were reared in different ponds include 3 doses of Bio Aqua in each one during 4 months. The treatments were Control, (T1:250 g/ha), (T2:350 g/ha) and (T3:450 g/ha). The obtained results showed that SGR (Specific Growth Rate), DGR (Daily Growth Rate), WG (Weight Gain), FCR (Feed Conversion Ratio) and (Survival Rate) and blood and biochemical indices were significantly higher in treatment 3 (450 g/ha) ($p<0.05$). There was also a significant difference in carcass chemical composition (percentage of crude protein and moisture content) of silver carp in treatments 2 and 3 compared to the control and 1 ($p<0.05$). In addition, the use of 450 g of Bio-Aqua ® / ha (in treatment 3) caused a significant reduction in TSS, BOD, COD, nitrite and water phosphate compared to other experimental treatments ($p<0.05$). It was concluded that the effects of Bio-Aqua ® probiotics, especially in T3 (450 g/ha) on growth indices, survival, carcass quality, blood and biochemical indices as well as physicochemical indices of water are desirable and can be used in fish farming sites.

Keywords: *BioAqua probiotics, Blood parameters, Body composition, Growth performances, Silver carp*

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

2. Department of Aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran (*corresponding author: s.vatandoust@gmail.com)

3. Department of Aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran (*corresponding author: changizi@baboliau.ac.ir)

4. Department of Aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

5. Department of Feeding, Caspian Sea Ecological Research Center, Sari, Iran

حفاظت طولانی مدت ژرم پلاسما ارزن دانه‌ای (*Panucum miliaceum* L.)

بومی شمال غرب ایران

مهدی کاکایی^{۱*}، طیبہ بساکی^۲

چکیده

مقدمه: حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با استفاده از تکنیک نگهداری بذری در دمای فراسرد، می‌توان بذری را به طور طولانی مدت و با هزینه بسیار کمتر ذخیره‌سازی کرد. در پژوهش حاضر حفاظت انجمادی بذری گیاه ارزن به روش شیشه‌ای شدن مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** آزمایش در قالب فاکتوریل (با دو فاکتور، فاکتور اول در دو سطح محلول شیشه‌ای کردن (*PVS2* و *PVS3*) و فاکتور دوم زمان‌های شیشه‌ای کردن طی پنج سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه)) و با آرایش طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام پذیرفت. **نتیجه و بحث:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلیه صفات (طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی) از نظر زمان تیمار در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. همچنین، نوع محلول برای صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه و اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول تنها برای صفت طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تیمار بذری ارزن با محلول‌های محافظت‌کننده به مدت ۶۰ دقیقه، بیشترین میزان جوانه‌زنی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. نتایج نشان داد که بذری تیمار شده با محلول *PVS3* دارای ساقه‌چه با طول کمتر ولی ریشه‌چه با طول بیشتری نسبت به محلول *PVS2* بودند. **نتیجه‌گیری کلی:** به طور کلی می‌توان روش حفاظت انجمادی را یک روش مناسب به منظور حفاظت از ژرم پلاسما گیاه ارزن تلقی نمود. محلول *PVS3* در زمان ۶۰ دقیقه دارای بیشترین میانگین درصد جوانه‌زنی بود که بهترین ترکیب تیماری برای نگهداری طولانی مدت ارزن به شمار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: ارزن، حفاظت انجمادی، ژرم پلاسما، شیشه‌ای شدن، محلول حفاظت‌کننده.

۱. دانشیار و اصلاح‌نباتات، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران (* نویسنده مسئول: M_Kakaei@pnu.ac.ir)

۲. استادیار اصلاح‌نباتات، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران.

مقدمه

جنس *Panucum* با نام فارسی ارزن متعلق به تیره‌ی گندمیان (Poaceae) است و در نواحی خشک به ویژه در آسیا و آفریقا به خوبی رشد می‌کند. ارزن از مهم‌ترین منابع انرژی و پروتئین برای میلیون‌ها انسان خصوصاً در مناطق گرم و خشک جهان است (Amadou et al., 2011 & Habiyaemye et al., 2017). ارزن به دلیل داشتن مواد غذایی فراوان شامل پروتئین، اسیدهای چرب ضروری، فیبر غذایی، ویتامین B، مواد معدنی مانند کلسیم، آهن، روی، پتاسیم و منیزیم از غلات بسیار مغذی محسوب می‌شود. این گیاه با تاثیر بر کاهش سطح قندخون (دیابت)، تنظیم فشار خون، تیروئید و بیماری‌های قلبی عروقی دارای ارزش دارویی نیز است (Dayakar et al., 2017). نگهداری از منابع ژنتیکی گیاهی به منظور حفظ امنیت غذایی و تنوع زیستی ضروری است. همچنین حفظ تنوع ژنتیکی امکان انتخاب و اصلاح گیاهان زراعی جدید و پرمحصول و مقاوم به تنش را فراهم می‌نماید (Rao, 2004). امروزه با توجه به کشت‌وکار پی‌درپی برخی گونه‌های گیاهی و همچنین تنش‌های زیستی و غیرزیستی با معضل کاهش تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی روبرو هستیم؛ بنابراین، حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (Ghaffarzadeh-Namazi et al., 2015). از جمله روش‌هایی که برای حفظ ژرم‌پلاسما گیاهان وجود دارد، می‌توان به حفاظت در رویشگاه و یا حفاظت در خارج از رویشگاه اشاره کرد (Hawksworth & Bull, 2007). حفاظت گیاه در رویشگاه می‌تواند بسیار پرهزینه باشد (Li & Pritchard, 2009) اما در بین روش‌های حفاظت گیاه در خارج از رویشگاه، استفاده از توانمندی‌های بیوتکنولوژی راهکاری منحصر به فرد برای حفاظت از گونه‌های گیاهی هست که به سرعت در حال توسعه است. یکی از این توانمندی‌ها، نگهداری بذر ها و اندام‌های رویشی در شرایط فراسرد است (Lambardi et al., 2005). در این روش به منظور ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی از ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه‌ی سلسیوس استفاده می‌شود (Benson, 2008 & Popov et al., 2006). با توقف تقسیم سلولی و فرآیندهای متابولیکی در دمای ازت مایع امکان نگهداری طولانی مدت در آنها ایجاد می‌گردد (Suzuki et al., 2005). از جمله راه‌های مؤثر در افزایش کارایی مراقبت و زنده‌مانی مواد گیاهی در شرایط انجماد، روش شیشه‌ای شدن به کمک محلول‌های مرتبط گیاهی است. طی این روش، آب از حالت مایع وارد یک فاز شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. بنابراین در این روش نگهداری از بافت‌های گیاهی در ازت مایع بدون تشکیل کریستال‌های یخ امکان‌پذیر خواهد بود (Gale et al., 2008). حفاظت ژرم‌پلاسما بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی به روش انجماد انجام شده و در برخی موارد جوانه‌زنی غیرعادی و یا مرگ به علت آسیب‌های درونی گزارش شده است. اغلب این مشکلات، به دلیل خصوصیات بذر مانند اندازه، رطوبت و ترکیبات شیمیایی بوده است. در پژوهشی Ghaffarzadeh-Namazi و همکاران (۲۰۱۴) شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذر گونه مرزه (*Satureja spicigera*) را در پاسخ به دمای فراسرد، جهت بررسی کارآمدی فناوری فراسرد به عنوان یک روش جایگزین و مقرون به صرفه برای ذخیره کردن بلندمدت بذر گیاهان در مراکز ژرم‌پلاسمی مورد بررسی قرار دادند. در پژوهشی Mansouri و همکاران (۲۰۱۳)، در مطالعه‌ای با عنوان مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا به روش شیشه‌ای شدن، اثر

متقابل زمان تیمار با نوع محلول حفاظت کننده در سطح احتمال ۵ درصد را مورد بررسی قرار دادند. در اثر کاهش دما، مقداری از آب موجود در سلول ها از طریق دهیدراسیون (آبگیری) اسمزی خارج می شود و در صورتی می توان انواع سلول ها را به شکل موفقیت آمیز منجمد نمود که کریستاله شدن آب باقیمانده در سلول صدمات جبران ناپذیری را به سلول وارد نسازد (Keivanloo & Sudagar, 2012). اگرچه مواد ضد انجماد باعث کاهش تشکیل کریستال های یخی درون سلول شده و از این طریق صدمات سلولی را به حداقل می رسانند، با این وجود اکثر این مواد بدلیل سمیت شدید و ایجاد صدمات اسمزی می توانند سبب بروز صدمات و آسیب های سلولی شوند (Pillai et al., 2001).

نظر به اهمیت زراعی، خوراکی و دارویی گیاه ارزن، در تحقیق حاضر به منظور یافتن روشی مطلوب برای حفاظت از ژرم پلاسما این گیاه، بذور گیاه ارزن تحت تیمار با محلول های مورد استفاده در حفاظت انجمادی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

ابتدا بذور ارزن از مزارع شهرستان اسدآباد- (همدان) جمع آوری و تهیه شد. به منظور یافتن روش مناسب حفاظت انجمادی ژرم پلاسما بذور گیاه ارزن، ابتدا بذور با کمک هیپوکلریت سدیم ۳ درصد برای مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس با آب مقطر شستشو و با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه مجدداً استریل شدند و در نهایت با آب مقطر سه بار شستشو صورت پذیرفت. پس از خشک شدن، تعداد ۱۰ بذور در دمای آزمایشگاه به ویال (ظروف کوچک استوانه ای) های انجمادی ۲ میلی لیتری منتقل شدند و با استفاده از محلول های حفاظت کننده تیمار شدند. محلول های استفاده شده دو محلول پر کاربرد در حفاظت انجمادی بافت گیاهی به اسامی PVS2 (شامل ۳۰٪ گلیسرول، ۱۵٪ اتیلن گلایکول، ۱۵٪ دی متیل سولفو کساید با زمینه محیط کشت مایع MS سوکروز ۴/۰ مولار) و PVS3 (شامل ۴۰٪ گلیسرول و ۴۰٪ ساکارز (WV)) بودند. این محلول ها با کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شدند. بذور ارزن در زیر هود لامینار با کمک محلول های مذکور، تیمار شدند. به منظور آبگیری، تیمار بذور با مواد مذکور در دمای آزمایشگاه و در ۵ سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه، مدت زمان تیمار با مواد ذکر شده) صورت گرفت. پس از اتمام زمان های یاد شده، محلول های قبلی از ویال های مربوط خارج گردید و محلول تازه به مقدار ۰/۵ میلی لیتر در ویال قرار گرفت. سپس به مدت ۵۰ ساعت در فراسرد (تانک نیتروژن) قرار داده شدند. ویال ها بعد از طی مدت زمان مربوطه در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰ درجه سلسیوس و پس از ۱۵ دقیقه در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعدی محلول های حفاظت کننده از ویال ها خارج گردیده و جهت تمیز کردن نمونه های بذری از محلول های حفاظت کننده، نمونه ها با یک محلول غلیظ (ساکارز ۰/۵ مولار) شستشو شدند. سپس، بذرها با آب مقطر استریل چند بار شستشو و در نهایت در پتری دیش های ۱۰ سانتی متری روی کاغذ صافی کشت و با آب مقطر تغذیه شدند (شکل ۱). کلیه این فعالیت ها جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی و انجام دقیق آزمایش در شرایط سترون انجام گرفت. جوانه زنی بذور در سطوح زمانی مذکور یادداشت برداری گردید و صفات طول ریشه چه، طول ساقه چه و درصد جوانه زنی مورد اندازه گیری قرار گرفت. در کلیه آزمون های این تحقیق

تیمار شاهد بدون استفاده از محلول‌های PVS2 و PVS3 مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (در هر پتری‌دیش ۱۰ عدد بذر قرار گرفت). عملیات آماری برای سه صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 صورت پذیرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل 2016 ترسیم گردید.



شکل ۱- A: تیمار نمونه‌های بذر ارزن با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی، B و C: نمونه‌های بذر ارزن کشت شده و جوانه زده در درون پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی.

Figure 1: (A) Treatment of Millet seeds with different protective solutions before cryopreservation, (B), (C) Millet seed samples cultured in Petri dishes containing the filter paper after cryopreservation.

نتایج

در بررسی اثر دمای فراسرد روی جوانه‌زنی بذور گیاه ارزن زمان تیمار برای صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین نوع محلول برای صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار و برای درصد جوانه‌زنی غیر معنی‌دار مشاهده گردید (جدول ۱). اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول فقط برای صفت طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). جدول ۲، مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور با محلول محافظت‌کننده روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذر ارزن را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است در زمان ۴۰ و ۸۰ دقیقه بیشترین رشد مربوط به صفت طول ساقه‌چه بوده است. همچنین، صفت طول ریشه‌چه متناسب با صفت طول ساقه‌چه، دارای بیشترین میزان در بازه‌های زمانی مذکور هستند که بر اساس روش مقایسه میانگین توکی بی در یک گروه آماری قرار دارند. جدول (۳) میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی بذور گیاه ارزن و همچنین شرایط تیمار شاهد را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه مربوط به تیمار شاهد است که مورد انتظار نیز است.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تیمار و نوع محلول محافظت کننده روی درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه در بذر گیاه ارزن

Table 1- Variance Analysis of the effect of Treatment time and type of Protective Solution on Germination percentage, Root Length and Shoot length in Millet Seeds

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد جوانه زنی	طول ریشه چه	طول ساقه چه
زمان تیمار	۴	۱۶/۶۳**	۲/۰۴ **	۱/۱۵**
نوع محلول	۲	۴/۲۸ ns	۲۸/۹۷ **	۴/۳۳ **
زمان تیمار × نوع محلول	۸	۱/۷۳ ns	۰/۰۸ ns	۰/۲۴**
اشتباه	۴۳۵	۱/۴۰	۰/۱۷	۰/۰۴
ضریب تغییرات		۱۹/۷۹	۹/۸۶	۸/۸۲

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪، ns: غیر معنی دار
* and **: Significant at level of 5% and 1%, ns: none significant

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر مدت زمان تیمار بر روی درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه بذر ارزن
Table 2- Mean Comparison of effect of Treatment duration on Germination percentage, Root length and shoot length of Millet seeds

زمان اعمال تیمار (دقیقه)	درصد جوانه زنی	طول ریشه چه (سانتی متر)	طول ساقه چه (سانتی متر)
20	0.45 ± 0.00 c	3.98 ± 0.05 b	۲/۲۰ ± 0.02 c
40	0.51 ± 0.00 bc	4.31 ± 0.05 a	2.38 ± 0.03 a
60	0.81 ± 0.00 a	4.33 ± 0.05 a	2.30 ± 0.03 b
80	0.62 ± 0.00 b	4.32 ± 0.05 a	2.43 ± 0.03 a
100	0.58 ± 0.02 bc	4.13 ± 0.01 ab	2.17 ± 0.00 c

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت کننده روی صفت طول ریشه چه و ساقه چه گیاه ارزن
Table 3- Comparison of the Average effects of type of Protective Solution on the Root and Shoot length traits of Millet Plants

صفت	نوع محلول		
	Control	PVS3	PVS2
طول ریشه چه	4.69 ± 0.03 a	3.84 ± 0.03 c	4.09 ± 0.03 b
طول ساقه چه	2.48 ± 0.02 a	2.23 ± 0.02 b	2.16 ± 0.01 c

جدول ۴ و ۵ به ترتیب میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر ارزن را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۴، بیشترین میزان طول ریشه‌چه در زمان‌های مختلف و با تیمارهای مختلف، مربوط به تیمار شاهد و زمان‌های ۴۰ و ۶۰ دقیقه بوده است. میزان طول ساقه‌چه برای بذور تیمار شده با محلول‌های PVS2، PVS3 و نمونه شاهد در زمان‌های مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است. براساس این جدول بیشترین مقدار طول ساقه‌چه مربوط به نمونه شاهد و زمان‌های ۴۰ و ۸۰ دقیقه است. همچنین پس از این تیمارها، بیشترین مقدار مربوط به تیمار PVS3 و زمان ۸۰ دقیقه بوده است. به طور کلی جدول ۴ نشان می‌دهد که مقادیر طول ریشه‌چه برای بذور تیمار شده با محلول PVS3 بیشتر از بذور تیمار شده با محلول PVS2 بوده است. جدول ۶، میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت جوانه‌زنی در بذر ارزن را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های این جدول، بذور تیمار شده با محلول PVS3 در زمان ۸۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار درصد جوانه‌زنی بوده و پس از آن بیشترین مقادیر مربوط به بذور تیمار شده با نمونه شاهد و PVS2 است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه در بذر ارزن
Table 4- Comparison of the Average double Interaction effects of Treatment time and type of Protective Solution on the Trait of Root length in Millet seeds

زمان اعمال تیمار (دقیقه)					نوع محلول
100	80	60	40	20	
3.81b	3.94ab	3.96a	3.97a	3.52c	PVS2
4.01b	4.22a	4.16ab	4.15ab	3.92c	PVS3
4.58b	4.77ab	4.82a	4.81a	4.49c	Control

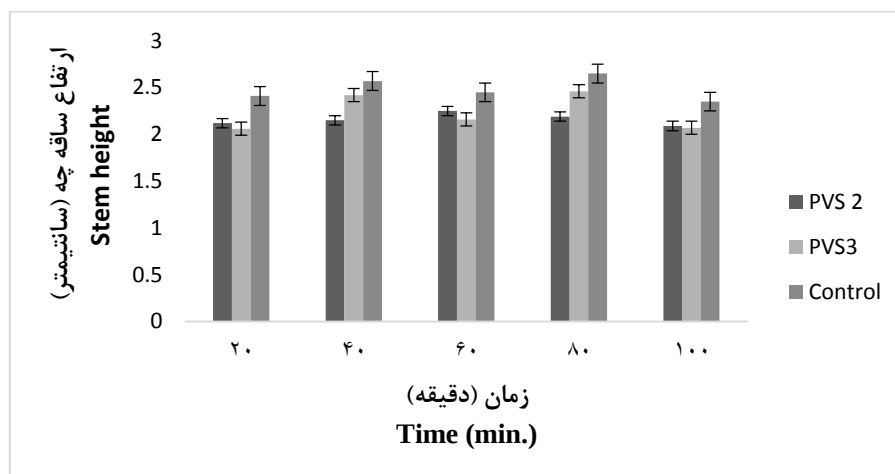
جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ساقه‌چه در بذر ارزن
Table 5- Comparison of the Average interaction effects of Treatment time and the type of Protective Solution on the Shoot length Trait in Millet Seeds

زمان اعمال تیمار (دقیقه)					نوع محلول
100	80	60	40	20	
2.09c	2.19ab	2.25a	2.15b	2.12bc	PVS2
2.07c	2.46a	2.16b	2.42ab	2.06c	PVS3
2.35c	2.65a	2.45b	2.57ab	2.41b	Control

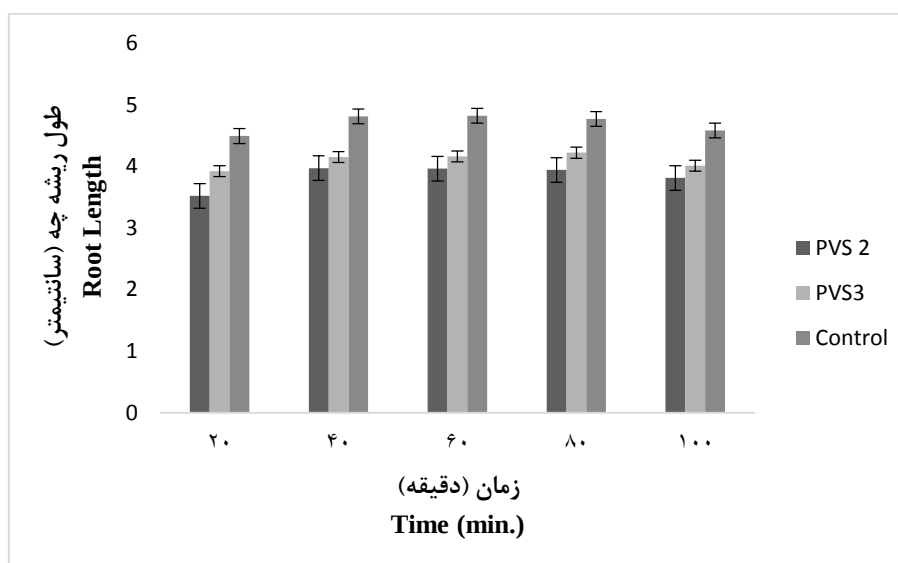
جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت درصد جوانه‌زنی در بذر ارزن
Table 6- Comparison of the Average double Interaction effects of Treatment time and type of Protective Solution on the Germination Percentage trait of Millet Seeds

زمان اعمال تیمار (دقیقه)					نوع محلول
100	80	60	40	20	
0.56b	0.53b	0.80a	0.40c	0.43bc	PVS2
0.60b	0.70ab	0.83a	0.46c	0.36d	PVS3
0.60c	0.63bc	0.80a	0.66b	0.56d	Control

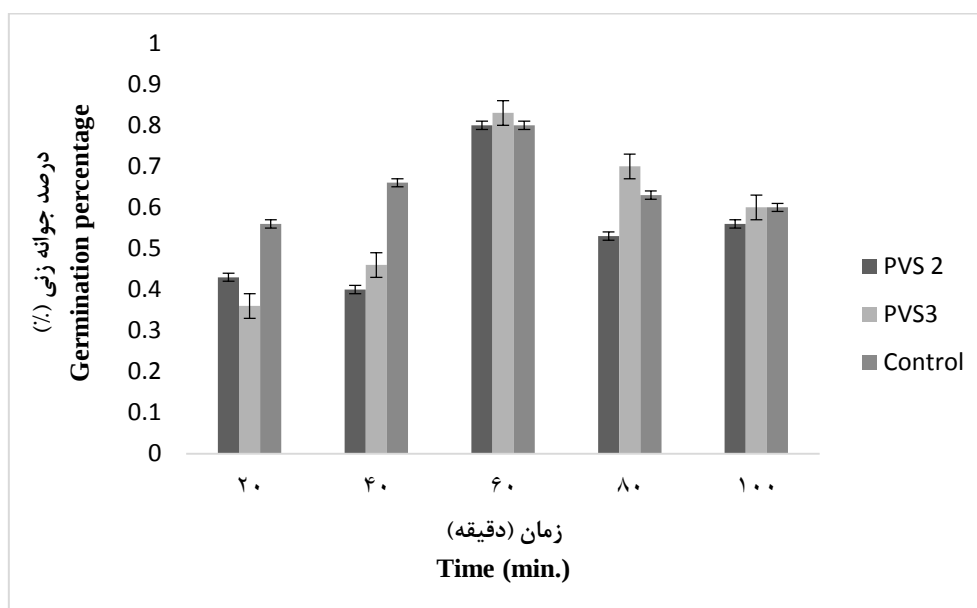
نتایج نشان داد که بذور گیاه ارزن با استفاده از روش شیشه‌ای شدن و در مدت زمان‌های بررسی شده، قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی دارد. شکل ۲، ۳ و ۴ به ترتیب مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت طول ساقه‌چه‌ی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده، مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت طول ریشه‌چه‌ی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده و مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت درصد جوانه‌زنی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده را نشان می‌دهد.



شکل ۲- مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت طول ساقه‌چه‌ی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده
Figure 2- Comparison of the effect of time on the Shoot Length Trait of millet seeds Treated by two types of Protective Solutions



شکل ۳- مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت طول ریشه‌چه‌ی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده
Figure 3- Comparison of the effect of time on the Root length of Millet seeds Treated by two types of Protective Solutions



شکل ۴- مقایسه‌ی اثر زمان بر روی صفت درصد جوانه‌زنی بذور ارزن تیمار شده توسط دو نوع محلول محافظت‌کننده

Figure 4- Comparison of the effect of time on the Germination Percentage of Millet Seeds treated by two types of Protective Solutions

بحث

استفاده از تکنیک حفاظت انجمادی به روش پوشش‌دار کردن و آبیگری، تکنیکی کاربردی جهت حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهی است (Mansouri *et al.*, 2013) که البته این پژوهش کارآیی آن را اثبات می‌کند. بر اساس این پژوهش، از نظر خصوصیت جوانه‌زنی نمونه‌ی شاهد در قیاس با بذور تیمار شده با محلول‌های حفاظت‌کننده مطلوب‌تر بودند و از جمله علل این نتیجه این است که تیمار بذور با مواد ضد انجماد آسیب بذور را به همراه دارد. بانک‌های ژنی بر مبنای حفاظت انجمادی و تکنیک‌های مبتنی بر زیست فناوری در دنیا رو به گسترش است و نگهداری و استفاده بهینه از ذخایر ژنتیکی در اکثر نقاط دنیا از اهمیت بسزایی برخوردار است (Mansouri *et al.*, 2013). بر اساس نتایج این آزمون، بذور تیمار شده با محلول‌های حفاظت‌شده نسبت به بذور شاهد دارای اندکی آسیب بودند. به طور معمول، به نظر می‌رسد مدت زمان انجماد تأثیری بر حفاظت انجمادی از راه شیشه‌ای کردن ندارد (Rong & Hua 2009). چنانچه نمونه بتواند در ازت مایع زنده بماند، اختلاف محسوسی در مدت زمان‌های متنوع نگهداری در ازت مایع وجود ندارد؛ چرا که با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی، مسئله مدت زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌گردد (Shatnawi, 2011). در این دمای پایین، کلیه تقسیمات سلولی و فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی ریزنمونه‌های گیاهی متوقف می‌شود (Suzuki *et al.*, 2005). جهت حفاظت از ژرم پلاسما گیاه ارزن، حفاظت انجمادی تکنیکی مطلوب است.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که روش حفاظت انجمادی روشی سودمند جهت نگهداری بذور این گیاه است. شیشه ایی شدن یک روش ساده و سریع جهت حفاظت انجمادی است که از تشکیل کریستال های یخ در هنگام انجماد جلوگیری می کند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلیه صفات (طول ریشه چه، طول ساقه چه و درصد جوانه زنی) از نظر زمان تیمار در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند. همچنین، نوع محلول برای صفات طول ریشه چه و طول ساقه چه و اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول تنها برای صفت طول ساقه چه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. تیمار بذور ارزن با محلول های محافظت کننده به مدت ۶۰ دقیقه، بیشترین میزان جوانه زنی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. نتایج نشان داد که بذور تیمار شده با محلول PVS3 دارای طول ساقه چه کمتر ولی طول ریشه چه بیشتری نسبت به محلول PVS2 بودند. به طور کلی می توان روش حفاظت انجمادی را یک روش مناسب به منظور حفاظت از ژرم پلاسما گیاه ارزن تلقی نمود. محلول PVS3 در زمان ۶۰ دقیقه دارای بیشترین میانگین درصد جوانه زنی بود که بهترین ترکیب تیماری برای نگهداری طولانی مدت ارزن به شمار می رود.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از امکانات دانشگاه پیام نور انجام شده است ضمن تشکر، از تمامی کسانی که در مسیر انجام این گزارش، اینجانبان را یاری کردند قدردانی می گردد.

منابع

- Amadou, I., Gbadamosi, O. S., and Guo-Wei, L. (2011). Millet-based traditional processed foods and beverages- A review. *Cereal Food World*, 56(3), 115-121.
- Benson E. E. (2008). Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27, 141-219.
- Dayakar, R. B., Bhaskarachary, K., Arlene, C.G.D., Devi, S., Vilas, G., and Tonapi, A. (2017). Nutritional and Health benefits of Millets”, ICAR Indian Institute of Millets Research (IIMR), Rajendranagar, Hyderabad.
- Gale, S. A., John, K., Harding, K., and Benson, E. (2008). Developing cryopreservation for *Picea sitchensis* (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. *Cryo Letters*, 29, 135-144.
- Ghaffarzadeh-Namazi, L., Babaeian, N., Ghamari-zare, A., and Nematzadeh, Gh. (2014). Cryopreservation of *Satureja spicigera* seeds. *Journal of Biosafety*. 7 (1): 45-52.
- Ghaffarzadeh-Namazi, N. N., Babaeian, A., Ghamari-zare, A., and Nematzadeh, G. H. (2015). Cryopreservation the seeds of the medicinal plant *Satureja bachtiarica* Bunge. *International Journal of Biosciences*, 6(2), 24-29.
- Habiyaremye, C. Matanguihan, J. B., D'Alpoim Guedes, J., Ganjyal, G. M., Whiteman, M. R., Kid wellK, K., and Murphy, K. M. (2017). Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) and Its Potential for Cultivation in the Pacific Northwest, U.S.: A Review. *Frontiers in plant science*, 7, 1961.
- Hawksworth, D. L., and Bull, A. T. (2007). *Plant Conservation and Biodiversity*. Springer, Volume 6, 420 p.

- Keivanloo, S., and Sudagar, M. (2012). Cryoprotectant toxicity in fish embryos. *Journal of Conservation and Utilization of Natural Resources*, 1(2), 73-84.
- Lambardi, M., Benelli, C., and Decarlo, A. (2005). Cryopreservation as a tool for the long-term conservation of woody plant germplasm: development of the technology at the CNR/INVALSA Institute of Florence. *The Role of Biotechnology*, 181-182.
- Li, D. Z., and Pritchard, H.W. (2009). The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14, 614-621.
- Mansouri, M., Kakaei, M., Abdolahi, M. R., and Sharifi, Sh. (2013). Study of Cryopreservation in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seeds via Vitrification Method. *Journal of Biotechnology in Agriculture*. 12 (2), 33-39.
- Pillai, B. R., Rao, K. J., and Mohanty, J. (2001). Toxicity of selected Cryoprotectants to the first zoeal stages of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (de Man). *Ashian fisheries science*, 14, 1-8.
- Popov, A. S., Popova, E. V., Nikishina, T. V., and Vysotskaya, O. N. (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29, 403-410.
- Rao, N. K. (2004). Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3, 136-145.
- Rong, H. S., and Hua, Y. M. (2009). High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99, 217-226.
- Shatnawi, M. A. (2011). Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification. *World Applied Sciences Journal*, 15, 318-325.
- Suzuki, M., Ishikawa, M., and Akihama, T. (2005). Cryopreservation of encapsulated gentian axillary needed to increase recovery of tips after cryopreservation buds following 2 step preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 115-121.

Long-term Protection of Germplasm Millet (*Panicum miliaceum* L.) Native to the Northwest of Iran

M. Kakaei^{*1}, T. Basaki²

Received: 2022. 02 . 21

Accepted: 2022.06. 25

Abstract

Introduction: Preservation of plant genetic resources is of particular importance. By applying ultra-cold seed storage techniques, seeds can be stored for a long time at a much lower cost. In the present study, the cryopreservation of millet seeds by a verification method was investigated. **Materials and Methods:** The experiment in factorial format (with two factors, the first factor in two levels of dewatering solution (PVS2 and PVS3) and the second factor in dewatering times in five- time levels (20, 40, 60, 80, and 100 minutes) and with a completely randomized design and it was done with three repetitions. **Result and Discussion:** The results of the analysis of variance showed that all traits (root length, stem length, and germination percentage) were significant in terms of treatment time at the level of 1% probability. Also, the type of solution was significant for root length and shoot length and the interaction effect of treatment time in solution type was significant only for shoot length at the level of 1% probability. Treatment of millet seeds with protective solutions for 60 minutes indicated the highest germination rate compared to other treatments. The results showed that seeds treated with PVS3 solution had shorter stem length but longer root length than PVS2 solution. **Total Resulting:** In general, cryopreservation can be considered as an appropriate method to protect the germplasm of millet. PVS3 solution had the highest average germination percentage at 60 minutes, which is the best treatment composition for long-term storage of millet.

Keyword: Cryopreservation, Germplasm, Millet, Preservative Solution, Verification.

1. Respectively, Associate Professor Assistant Professor Plant Breeding, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran-Iran. (*Corresponding Author: M_Kakaei@pnu.ac.ir)

2. Assistant Professor Plant Breeding, Department of Agricultural Science, Payame Noor University

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹

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

doi 10.22051/JAB.2021.34309.1398

شناسایی و سنجش محتوای اسیدهای فنلی در قارچ‌های اندوفیت جدا شده از *avellana*

Corylus L.

نرجس محمدی بلکوتی^۱، فائزه قناتی^{۲*}، سعیده وزیری فر^۳

چکیده

مقدمه: سینامیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید، کافئیک اسید از جمله مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید هستند. این ترکیبات فنلی دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی هستند. گزارشات اندکی در مورد محتوا و نوع آنها در قارچ‌های اندوفیت ثبت شده است. تحقیق حاضر به شناسایی و معرفی قارچ‌های اندوفیت از گیاه فندق (*Corylus avellana*) و نوع و محتوای اسیدهای فنلی آنها پرداخته است.

مواد و روش‌ها: شناسایی مولکولی قارچ‌ها براساس آغازگرهای ITS حضور و مقدار تولید مشتقات سینامیک اسید به روش HPLC/نجام شد.

نتایج و بحث: ۱۲ قارچ اندوفیت سنتز کننده اسیدهای فنلی شناسایی و مقدار تولید هر کدام از ترکیبات ذکر شده در محیط درون سلولی و برون سلولی اندازه‌گیری شد. قارچ *Alternaria sp.* بیشترین مقدار سینامیک اسید و کافئیک اسید (به ترتیب $303 \mu\text{g/g Fw}$ و $17 \mu\text{g/g Fw}$) را تولید کرد. همچنین درصد رهاسازی اسیدهای فنلی به محیط در دو قارچ *Fusarium sp.* و *Stemphylium sp.* صد در صد بود که حاکی از آسانی و راندمان بالا در فرایند استخراج در مقیاس تجاری است.

واژه های کلیدی: فرولیک اسید، قارچ‌های اندوفیت، کافئیک اسید، کوماریک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید

۱. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (نویسنده مسئول: ghangia@modares.ac.ir)
۳. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

اسیدهای فنلی که جزء حیاتی رژیم غذایی انسان محسوب می‌شوند دارای طیف وسیعی از خواص آنتی اکسیدانی، بیولوژیکی و دارویی مانند ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد حساسیتی، ضد ویروسی، محافظ کبدی، افزودنی غذایی می‌باشند (Wahle et al., 2010). اصطلاح "اسیدهای فنلی" به طور کلی به ترکیبات فنلی دارای یک گروه کربوکسیلیک اسید اشاره دارد و به طور عمده به دو زیر گروه هیدروکسی بنزوئیک اسید و هیدروکسی سینامیک اسید تقسیم می‌شوند (Pereira et al., 2009). اخیراً خواص آنتی اکسیدانی هیدروکسی سینامیک اسیدها علاوه بر فراوانی در طبیعت و پتانسیل بالای آنها در مهار رادیکال‌های آزاد مورد توجه قرار گرفته است، ترکیباتی مانند اسیدهای فرولیک، کافئیک، کوماریک و سیناپیک در گروه هیدروکسی سینامیک اسید قرار دارند (Khoddami et al., 2013). فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای فنلی طبیعی به تعداد و موقعیت نسبی گروه‌های هیدروکسیل بر روی حلقه وابسته است. برای مثال کافئیک اسید به علت دی هیدروکسیله بودن نسبت به مونوفنلی‌هایی مانند کوماریک اسید قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری دارد (Rice-Evans et al., 1996). از دو دهه گذشته استفاده از منابع طبیعی برای توسعه، کشف دارو(ها) و تولید در مقیاس تجاری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این بین قارچ‌های اندوفیت که بدون ایجاد علامت بیماری‌زا درون بافت زنده گیاه کلونی تشکیل می‌دهند، مورد توجه بسیاری از محققان بوده است. قارچ‌ها قادر به تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع هستند (Shen, 2015). با توجه به رشد سریعتر قارچ‌ها نسبت به گیاهان، استخراج آسان و کم‌هزینه‌تر متابولیت‌های تولید شده توسط آنها، این میکروارگانیسم‌های بالقوه می‌توانند منابع مناسب-تری برای تولید متابولیت‌ها در مقیاس تجاری باشند (Kusari & Spiteller 2011). با این وجود، تنها ۰/۷۵-۱/۵ درصد از گونه‌های گیاهی شناخته‌شده برای شناسایی اندوفیت‌های آنها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Christenhusz & Byng 2016). فندق با نام علمی *Corylus avellana* / *زخانو/ده* Betulaceae درختچه‌ای است به ارتفاع تقریبی دو متر که در شرایط مساعد تا ارتفاع شش متر نیز رشد می‌کند. براساس آخرین تحقیقات سیتوژنتیکی مشخص شده‌است که فندق دارای سه مرکز تنوع جدا از هم در ایران، مدیترانه و ترکیه است که در ایران این رویشگاه‌های طبیعی شامل مناطق شمال و شمال غربی کشور است (Ghaderi et al., 2009). از آنجایی که مطالعه جامعی بر روی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده اسیدهای فنلی گیاه فندق صورت نگرفته است لذا در این تحقیق سعی بر آن است تا با شناسایی و معرفی قارچ‌های اندوفیت جدید جداشده از فندق بتوان از آنها به عنوان منابع جدید با پتانسیل عظیم صنعتی برای تولید اسیدهای فنلی (کافئیک اسید، فرولیک اسید، سالیسیلیک اسید، سینامیک اسید و کوماریک اسید) استفاده کرد. از این رو در این مطالعه حضور اسیدهای فنلی در جنس‌های مختلف از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق به روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

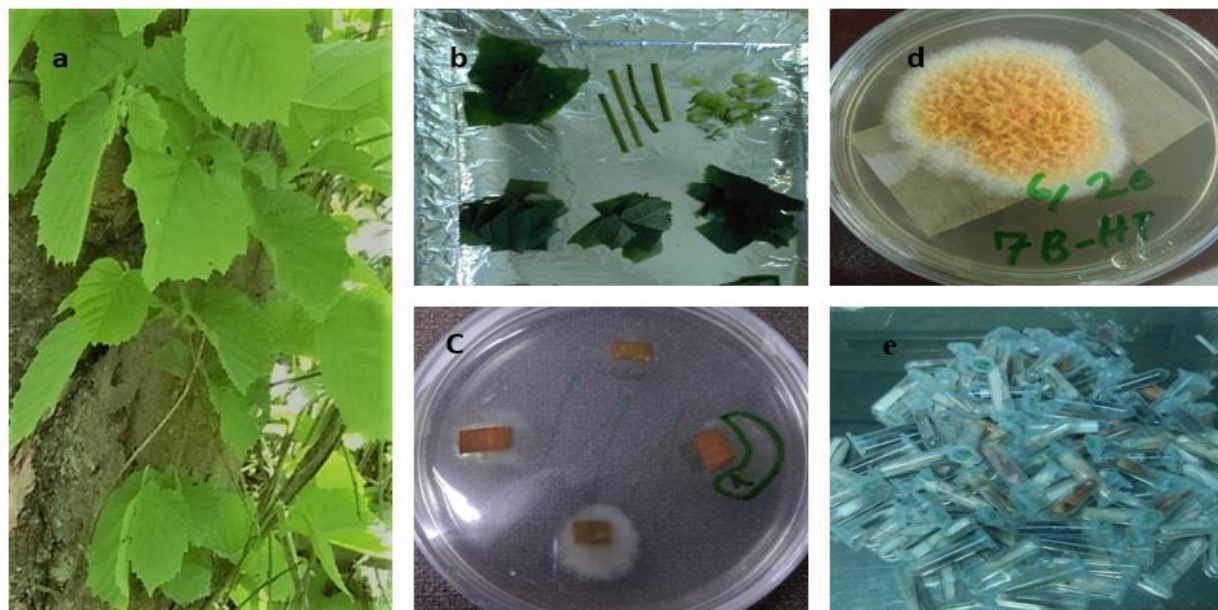
مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری در شش نقطه از ایران (اشکورات گیلان، فندقلوی اردبیل، طارم زنجان، الموت قزوین، وشنوه قم) و از بخش‌های سالم و بدون نشانه بیماری شامل برگ، ساقه و پوست گیاه فندق انجام شد. نمونه‌ها از درختان بالغ انتخاب و در کیسه‌های پلاستیکی برروی یخ قرار داده شده به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان جداسازی اندوفیت‌های آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت

جداسازی قارچ‌های اندوفیت از نمونه‌های گیاهی به روش گونزالس و تلو (González & Tello 2011) با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا نمونه‌های گیاهی جهت ضدعفونی کردن سطحی با هدف زدودن قارچ‌های اپی‌فیت، پس از شستشو با مواد شوینده، با آب جاری به مدت ۱۵ دقیقه آب‌کشی شد. سایر مراحل به صورت متوالی در زیر هود لامینار انجام شد. قطعات برید شده به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، سپس در هیپوکلریت سدیم حاوی ۵ درصد کلرین فعال به مدت ۵ دقیقه و در نهایت پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل بر روی کاغذ صافی استریل شده قرار داده شد تا آب اضافی آنها گرفته شود. نمونه‌های استریل شده به قطعات کوچک (۵/۵×۵/۵ سانتی‌متر) بریده شد و پوست رویی نمونه‌ها توسط اسکالپل جدا و بخش داخلی بافت روی محیط کشت جامد PDA (Potato Dextrose Agar) قرار داده شد. پلیت‌ها در تاریکی و در دمای 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. خالص‌سازی اندوفیت‌ها با استفاده از نوک هیف‌های قارچ‌های رشد یافته بر روی محیط کشت جامد انجام شد. سپس از قارچ‌های خالص برش‌هایی به ابعاد ۱×۱ سانتیمتر مربع تهیه و به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت (Potato Dextrose Broth) PDB انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۱ روزه بر روی شیکر با دور rpm ۱۲۰ قرار گرفت. هم‌چنین به منظور ذخیره‌سازی ایزوله‌های قارچی، از روش کاغذ صافی استریل استفاده شد (Strobel et al., 1996). جداسازی قارچ‌های رشد یافته از محیط کشت مایع با کمک پمپ خلا انجام و تا زمان انجام آنالیزهای مربوطه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱).



شکل ۱: مراحل مختلف کشت و جداسازی قارچ‌های اندوفیت از قسمت‌های مختلف گیاه فندق *a*: گیاه فندق، *b*: استریل کردن بخش‌های مختلف گیاه، *c*: کشت بر روی محیط PDA، *d-e*: رشد و ذخیره‌سازی ایزوله‌های قارچی.

Figure 1: Different stages of cultivation and isolation of endophytic fungi from different parts of the Hazel plant. a: Hazel plant, b: Sterilization of different parts of the plant, c: Cultivation on PDA medium, d-e: Growth and storage fungal isolates

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های قارچی با استفاده از بافر CTAB انجام شد. و شناسایی مولکولی آنها براساس آغازگرهای ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') انجام شد (White *et al.*, 1990). پس از انجام واکنش PCR، ژن‌های ITS به منظور بررسی صحت انجام واکنش PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز بارگذاری و محصول واکنش PCR توسط شرکت ژنتیک کدن (ایران) تعیین توالی شد.

استخراج اسیدهای فنلی

برای استخراج اسیدهای فنلی ابتدا ۴۰ درصد متانول حاوی ۰/۵ درصد استیک اسید تهیه شد. سپس به ۰/۵ گرم میسلوم قارچ، ۴ میلی لیتر از حلال ذکرشده اضافه و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف و برای سنجش به دستگاه HPLC (Waters, e2695, USA) تزریق شد. ستون مورد استفاده C18-ODS3 با طول ۲۵۰ میلی متر و قطر ۴/۶ میلی متر بود و آنالیز در دو طول موج ۲۷۸ و ۳۰۰ با گرادیانی از متانول ۳۰ تا ۸۰ درصد انجام شد. محاسبه غلظت اسیدهای

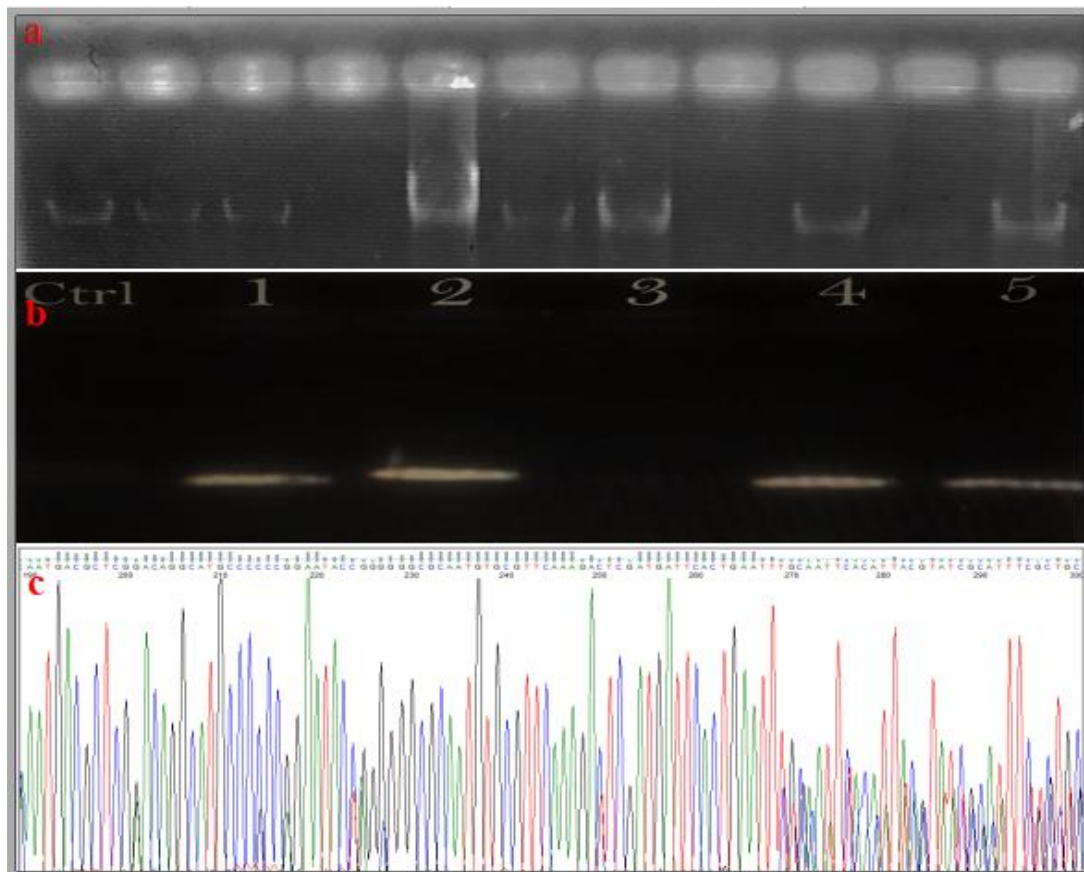
فنلی موجود در عصاره قارچ با مقایسه پیک ها با نمونه‌های استاندارد سینامیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید و سالیسیلیک اسید (USA, Sigma) انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولیدکننده اسیدهای فنلی براساس تجزیه و تحلیل توالی ITS ژنومی و مطابقت با توالی‌های

ثبت شده در پایگاه داده NCBI انجام شد (شکل ۲). براساس نتایج در مجموع ۱۲ ایزوله قارچی جداسازی و خالص شد که

شامل قارچ‌های *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Auxarthron* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cryptosporiopsis* sp., *Epicoccum* sp., *Melanconium* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Phoma* sp., *Stemphylium* sp. است.



شکل ۲: مراحل مختلف a: استخراج DNA قارچی، b: واکنش PCR، c: توالی‌یابی نواحی ITS قارچ‌های اندوفیت.

Figure 2: Different steps a: Extraction of fungal DNA, b: PCR reaction, c: Sequencing of ITS regions of endophytic fungi.

جنس‌های شناسایی شده به همراه مقدار اسیدهای فنلی درون سلولی (باقی مانده در میسلیم قارچ) (جدول ۱) و برون

سلولی (رها شده به محیط کشت) (جدول ۲) تولید شده توسط هر کدام از قارچ‌های اندوفیت ارائه شده است. بررسی درصد

آزادسازی این ترکیبات به محیط نشان داد که در اکثر قارچ‌ها بخش زیادی از این ترکیبات به محیط رها شدند، به طوری که در دو قارچ *Fusarium sp.* و *Stemphylium sp.* صد درصد ترکیبات به محیط آزاد شد که این امر تأکیدی بر فرایند آسان و کم هزینه استخراج فنلیک اسیدها از قارچ‌های اندوفیت دارد. گزارش‌های بسیار کمی در مورد قارچ‌های اندوفیت سنتز کننده اسیدهای فنلی ثبت شده است. حضور کومارین به مقدار ۳/۶ میلی گرم بر گرم در قارچ *Alternaria sp.* گزارش شده است (Umashankar et al., 2015). در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، پس از شناسایی ژن‌های فرویل استراز در قارچ *Aspergillus sp.* و انتقال آن به گیاه گندم تولید فرولیک اسید و کوماریک اسید در این گیاه تا ۶ برابر افزایش یافت (Dilokpimol et al., 2017). قارچ‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر، به عنوان قارچ‌های اندوفیت سنتز کننده هیدروکسی سینامیک اسید برای نخستین بار معرفی می‌شوند. قارچ‌های مختلف پتانسیل متفاوتی در تولید هر کدام از ترکیبات از خود نشان داده‌اند. به طوری که قارچ *Alternaria sp.* بهترین عملکرد را در تولید کافئیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید و سینامیک اسید از خود نشان داد که نه تنها نسبت به سایر قارچ‌های شناسایی شده بالاترین مقدار تولید را داشت بلکه نسبت به مقادیر گزارش شده این ترکیبات در بسیاری از نمونه‌های گیاهی نیز بسیار بالاتر بود (Alvarado et al., 2003). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ بر روی فندق انجام شد که نشان داد در تمام عصاره‌ها، هم به صورت آزاد و هم به صورت استری اسید گالیک فراوان‌ترین اسید فنلی بود (Prosperini et al., 2009). بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از کوماریک اسید به عنوان تنها منبع کربن برای ساختن کافئیک اسید استفاده کنند. برای مثال باکتری‌هایی مانند *Streptomyces griseus* و قارچ‌های رشته‌ای مانند *Gliocladium deliquescens* کوماریک اسید را به کافئیک اسید و ترکیبات مربوطه تبدیل می‌کنند (Torres & Rosazza, 2001). اما تنها تعداد کمی از قارچ‌های اندوفیت قادرند که با استفاده از هیدروکسیلاسیون کوماریک اسید به کافئیک اسید دست یابند. در این مطالعه چهار قارچ *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Epicoccum sp.* کافئیک اسید را در مقادیر قابل توجه تولید کردند. هم چنین تولید سینامیک اسید در قارچ *Alternaria sp.* به میزان ۳۰۳ $\mu\text{g/g Fw}$ نشان داد که قارچ‌های اندوفیت می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب برای تولید این ترکیبات آنتی اکسیدانی باشند. بررسی درصد آزادسازی این ترکیبات به محیط نشان داد که در اکثر قارچ‌ها بخش زیادی از این ترکیبات به محیط رها شد، به طوری که در دو قارچ *Fusarium sp.* و *Stemphylium sp.* صد درصد ترکیبات به محیط آزاد شد. این امر تأکید مجددی بر فرایند آسان و کم هزینه استخراج اسیدهای فنلی از قارچ‌های اندوفیت دارد.

جدول ۱. اسیدهای فنلی تولید شده از بخش درون سلولی قارچ‌های اندوفیت

Table 1. produced Phenolic acids from the intracellular part of endophytic fungi

قارچ‌های اندوفیت	سینامیک اسید μg/g Fw	سالیسیلیک اسید μg/g Fw	فرولیک اسید μg/g Fw	کوماریک اسید μg/g Fw	کافئیک اسید μg/g Fw
<i>Alternaria</i> sp.	۱۷۹	-	۸۴۵	۸/۵	-
<i>Arthrimum</i> sp.	-	۵/۶	-	-	-
<i>Auxarthron</i> sp.	-	-	۶	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	۱/۵	-	۱۰	-	۲/۵
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	۲/۵	-	۱۰/۳	-	-
<i>Epicoccum</i> sp.	۵/۱	۷	۵	-	۴
<i>Melanconium</i> sp.	-	۴/۲	۰/۲	۰/۴	-
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	-	۵/۵	۲/۵	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	۳	-
<i>Stemphylium</i> sp.	-	-	-	-	-

جدول ۲. محتوای اسیدهای فنلی رها شده به محیط برون سلولی

Table 2. The content of released phenolic acids into the extracellular culture

قارچ‌های اندوفیت	سینامیک اسید g/g μFw	سالیسیلیک اسید μg/g Fw	فرولیک اسید μg/g Fw	کوماریک اسید μg/g Fw	کافئیک اسید μg/g Fw	درصد رها سازی به محیط (%)
<i>Alternaria</i> sp.	۱۲۴	-	-	۱۴۰/۵	۱۷	۲۱/۴
<i>Arthrimum</i> sp.	-	-	-	-	-	۰
<i>Auxarthron</i> sp.	۵/۲	-	-	۲	-	۵۵/۳
<i>Fusarium</i> sp.	۵/۱	۷	۵	-	۴	۱۰۰
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	۰
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	۶/۲	-	-	-	-	۳۲/۶
<i>Epicoccum</i> sp.	-	-	-	-	-	۰
<i>Melanconium</i> sp.	-	-	-	-	-	۰
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	۴	۲۳/۳	-	-	-	۷۷/۳

<i>Phoma</i> sp.	-	-	۱۶/۵	-	-	۸۴/۶
<i>Stemphylium</i> sp.	۱۲۴	-	-	۱۴۰/۵	-	-

نتیجه گیری کلی

نتایج نشان داد که قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق پتانسیل بالایی در تولید بسیاری از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید از جمله کافئیک اسید، سینامیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید و سالیسیلیک اسید دارند. در میان اندوفیت های جدا شده، قارچ *Alternaria* sp. بیشترین مقدار سینامیک اسید (۳۰۳ µg/g Fw) و کافئیک اسید (۱۷ µg/g Fw) ، فرولیک اسید (۸۴۵ µg/g Fw) و کوماریک اسید (۱۴۹ µg/g Fw) و قارچ *Neopestalotiopsis* sp. بیشترین مقدار سالیسیلیک اسید (۲۸/۸ µg/g Fw) را تولید کردند. از آنجا که قارچ‌های اندوفیت قابلیت تولید این ترکیبات ارزشمند را در طی یک دوره رشدی کوتاه مدت و در مقادیر بالا داشتند می توان آنها را به عنوان منبع مناسبی برای تولید این ترکیبات در مقیاس تجاری معرفی کرد.

منابع

- Alvarado, I.E., Navarro, D., Record, E., Asther, m., Asther, M., Lesage-Meessen, L. (2003). Fungal biotransformation of p-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 157-160.
- Christenhusz, M.J. and Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261: 201-217.
- Dilokpimol, A., Mäkelä, M., Mansouri, S., Belova, O., Waterstraat, M., Bunzel, M., de Vries, R., Hildén, K. (2017). Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. *New biotechnology*, 37: 200-209.
- Ghaderi, A., Omid, M., Athena, O. (2009). Feasibility study of secondary metabolite engineering in hazelnut plant *Corylus avellana*. *Regional Conference on Food and Biotechnology*, 1-6
- González, V. and Tello, M.L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47: 29-42.
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.
- Kusari, S. and Spiteller, M. (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural product reports*, 28: 1203-1207.
- Owen, R., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 703-717.

- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology, Molecular Diversity Preservation International. [Molecules](#), 14: 2202–2211
- Prosperini, S., Ghirardello, D., Scursatone, B., Gerbi, V., Zeppa, G. (2009). Identification of soluble phenolic acids in hazelnut (*Corylus avellana* l.) Kernel. Acta Horticulturae. 845: 677-680
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, 20: 933-956.
- Shen, B. (2015). A new golden age of natural products drug discovery. Cell, 163: 1297-1300.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology, 142: 435-440.
- Torres, y. Torres, J.L., Rosazza, J.P. (2001). Microbial Transformations of p-Coumaric Acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. Journal of natural products, 64: 1408-1414.
- Umashankar, T., Govindappa, M., Ramachandra, Y.L., Chandrappa, C.P., Padmalatha R.S., Channabasava, R. (2015). Isolation, purification and in vitro cytotoxicity activities of coumarin isolated from endophytic fungi, *Alternaria* species of *Crotalaria pallida*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 5: 926-936.
- Wahle, K.W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S.D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Bio-Farms for Nutraceuticals, 36-51.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18: 315-322.

Identification and quantitation of phenolic acids of endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

N. Mohammadi Ballakuti¹, F. Ghanati^{2*}, S. Vazirifar³

Received: 2021.09.13

Accepted: 2022.05.09

Abstract

Introduction: Cinnamic acid, coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid are of hydroxy-cinnamic acid derivatives with strong antioxidant properties. A few reports are available on the content and types of phenolic acids in endophytic fungi. The present study has been focused on the isolation of endophytic fungi from hazelnut (*Corylus avellana* L.), identification and measurement of their phenolic acids.

Materials and methods: Molecular identification of the fungi was achieved based on ITS primers and the presence of cinnamic acid derivatives was studied by HPLC method.

Results and discussion: Twelve phenolic acid-producing endophytic fungi were isolated and intracellular and extracellular amounts of above-mentioned compounds was monitored. Among the isolated endophytes, *Alternaria* sp. showed the highest amount of cinnamic acid (303 µg / g Fw) and caffeic acid (17 µg / g Fw). It was also noteworthy that one hundred percent of phenolic acids produced by *Fusarium* sp. and *Stemphylium* sp., was released into the media of these fungi. Regarding to the cost effective and fast growth of endophytes, they can be introduced as alternative resources for commercial-scale production and extraction process of phenolic acids.

Keywords: *Caffeic acid, Coumaric acid, Endophytic fungi, Ferulic acid, Hydroxy cinnamic acid*

1. PhD of plant physiology, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(*Corresponding author: ghangia@modares.ac.ir)

3. PhD of plant physiology, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۸

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

doi 10.22051/JAB.2021.34309.1398

بررسی ترکیبات فنولی و خواص بیولوژیکی اندام‌های رویشی گیاه *Lepidium vesicarium* L.

سعید ملائی^{۱*}، مهناز اسلامی^۲، مصطفی عبادی^۳

چکیده

با وجود تاریخچه‌ای طولانی در استفاده‌ی دارویی گیاه *Lepidium vesicarium*، مطالعه ترکیبات فنولی و خواص بیولوژیکی اندام‌های مختلف آن صورت نگرفته است. بدین منظور، بعد از به دست آوردن عصاره تام متانولی اندام‌های مختلف (ریشه، برگ، ساقه، شاخه و بذر) گیاه، محتوای کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با روش اسپکتروفتومتری و خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی به ترتیب با روش‌های DPPH و MTT مورد بررسی قرار گرفتند و در ادامه، فنولیک اسیدهای آزاد و استری آنها با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج، عصاره‌های متانولی ساقه و برگ گیاه دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی بودند و بیش‌ترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به عصاره‌ی ساقه و بذر گیاه بود. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلول بر علیه سلول‌های سرطانی MCF-7 نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره متانولی بذر گیاه بود و عصاره‌های ساقه و بذر بیشترین خاصیت سمیت سلولی را داشتند. نتایج حاصل از آنالیز فنولیک اسیدها نیز نشان داد که کافئیک اسید به ترتیب با مقادیر $0.16 \pm 1/44$ و $0.09 \pm 1/11$ میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه، عمده‌ترین فنولیک اسید آزاد موجود در عصاره‌های برگ و شاخه است. همچنین، سالیسیلیک و m-کوماریک اسید فنولیک اسیدهای استری عمده موجود در عصاره‌های ریشه و شاخه گیاه به ترتیب با مقادیر $0.07 \pm 1/98$ و $0.07 \pm 1/95$ میلی گرم بر گرم وزن خشک بودند. بنابراین، بر اساس نتایج به دست آمده، بذر گیاه دارای بیشترین ترکیبات فنولی از جمله کافئیک اسید، فرولیک اسید و گالیک اسید است و با توجه به پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی می‌تواند در صنعت داروسازی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، سمیت سلولی، کافئیک اسید، گالیک اسید، *L. vesicarium*

۱. استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳. استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

مقدمه

از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مختلف به چند دلیل عمده از جمله عملکرد مناسب، قابلیت دسترسی و مسائل زیست‌محیطی بسیار معمول و رایج بوده است (Bolatito, 2010). در این خصوص سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) طرحی اتخاذ نموده که طبق آن مقرر گردیده از سال ۲۰۱۴ تا سال ۲۰۲۳ مطالعات علمی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی منجر به بهبود کیفی طب سنتی گردد (Mondiale de la Santé, 2013). در حال حاضر جداسازی و شناسایی ترکیبات طبیعی گیاهی یکی از موضوعات مهم و جالب در اغلب مطالعات علمی است. لازم به ذکر است ترکیبات شیمیایی با منشا گیاهی که تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه از آنها یاد می‌شود مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد سرطان، ضد التهاب و غیره هستند (Kakate, 1997). برخی ترکیبات آروماتیکی استخراج شده از گیاهان معطر به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند و با توجه به اهمیت اقتصادی و زیست‌محیطی آنها، این ترکیبات می‌توانند جایگزین مناسبی برای مواد سنتزی و سمی باشند.

آنتی‌اکسیدان به ترکیبی اطلاق می‌شود که سلول را در برابر رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کند. اگر بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها تعادل وجود نداشته باشد، تنش اکسیداتیو حاصل می‌شود که منجر به آسیب سلول‌ها می‌شود و در نهایت باعث ایجاد بیماری‌هایی چون سرطان، سکته، پارکینسون و آلزایمر و غیره خواهد شد. فنول‌ها و سایر ویتامین‌ها از بروز چنین بیماری‌های پیشگیری می‌کنند. ترکیبات فنولی گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در اکثرا موجودات زنده از جمله گیاهان یافت می‌شوند و دارای خواص ضدسرطانی می‌باشند. این ترکیبات از طریق توقف چرخه سلولی، مهار کانال‌های سیگنال انکوژنیک کنترل کننده تکثیر سلولی، تقویت پروتئین‌های سرکوب کننده تومور، آنژیوژنز و آپوپتوز، مدلوسیون سطوح ROS و افزایش تمایز و تغییر شکل در سلول‌های طبیعی خواص ضدسرطانی از خود نشان داده‌اند (Fresco et al., 2010). همچنین، به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک در ترکیبات فنولی، این ترکیبات دارای نقش آنتی‌اکسیدانی بوده و می‌توانند رادیکال‌های آزاد را پاکسازی کرده و مانع تبدیل هیدروکسیدها به رادیکال آزاد که عامل اساسی ایجاد سرطان در انسان است، شوند (Lin et al., 2016).

سرده ترتیزک (*Lepidum L.*) با دارا بودن بیش از ۲۵۰ گونه یکی از بزرگترین سرده‌های تیره شب‌بو (Brassicaceae) است. گونه‌های این سرده دارای پراکنش جهانی به ویژه نواحی معتدل و جنب حاره‌ای می‌باشند (Al-Shehbaz, 2012). از دیرباز گونه‌های مختلف سرده ترتیزک کاربردهای داروئی فراوانی داشته و در این ارتباط، مطالعات زیادی در راستای خواص دارویی آنها نظیر افزایش عملکرد جنسی، افزایش باروری در زنان، کاهش علائم قاعدگی، افزایش عملکرد حافظه، خاصیت ضدسرطانی و خاصیت ضدافسردگی گزارش شده است (Bramara et al., 2017; Asnaashari et al., 2018; Wang & Zhu, 2019). مطالعات نشان می‌دهد متابولیت‌های ثانویه مختلفی به ویژه ترکیبات فنولی مسئول ایجاد چنین خاصیت‌هایی هستند.

گونه *Lepidium vesicarium* L. گیاهی علفی، یکساله یا دوساله بوده و پراکنش اصلی این گونه آسیای مرکزی و آناتولی است. این گیاه در ایران به فراوانی در مراتع، کنار جاده‌ها و حاشیه مزارع گندم، جو، نخود و عدس یافت می‌شود (Shimi & Termeh, 2004). از ویژگی‌های بارز این گیاه می‌توان به بادکردگی یا تورم ساقه در محل انشعابات اشاره کرد. بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای، تحقیقات کمی بر روی متابولیت‌ها و خواص بیولوژیکی این گیاه انجام گرفته است. کشاورز و همکاران (۱۳۹۶) ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی *L. vesicarium* را مورد بررسی قرار دادند و موفق به جداسازی و شناسایی چهار ترکیب فنولی، یک ترکیب قندی و ۱۹ ترکیب فرار گردیدند. همچنین، فراکسیون‌های ۴۰٪، ۶۰٪ و عصاره متانولی قویترین خاصیت جاروبرگری رادیکال‌های آزاد و همچنین بیشترین محتوای فنول و فلاونوئید را داشتند. Asnaashari و همکاران (۲۰۱۸) ترکیبات فرار اندام هوایی گیاه *L. vesicarium* را با GC و GC-MS مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که بنزیل‌سیانید، ایزوتیو سیانیک اسید و بنزیل‌ایزوتیو سیانات عمده‌ترین ترکیبات آن است. همچنین، این عصاره فرار فاقد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بود. همچنین، بر اساس مطالعه Karimi و همکاران (۲۰۱۹)، عصاره دی‌کلرومتانی این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی متعادل بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و *Candida albicans* بوده و عصاره هگزانی و متانولی نیز خاصیت ضدباکتریایی ضعیفی از خود نشان داد.

با توجه به اینکه گیاهان منبع بالقوه‌ای برای استخراج ترکیبات مختلف با اهداف دارویی، غذایی و بهداشتی هستند لذا بررسی فیتوشیمیایی گیاهان مختلف در راستای دستیابی به منابع و ترکیبات جدید بسیار حائز اهمیت است. سهولت دسترسی آسان و ارزان به گیاه *L. vesicarium*، از طریق رویشگاه‌های طبیعی و همچنین عدم وجود مطالعه جامع در ارتباط با ترکیبات فنولی این گیاه و خاصیت‌های بیولوژیکی آنها، موجب انجام این پژوهش گردید. بنابراین در این تحقیق، فنول و فلاونوئید کل و بررسی خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره تام متانولی اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium* و در ادامه اندازه‌گیری کیفی و کمی فنولیک‌اسیدهای آزاد و استری موجود در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاه *L. vesicarium* در فصل بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ از اطراف آذرشهر، واقع در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد و توسط دکتر مصطفی عبادی (عضو هیات علمی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان) مورد شناسایی قرار گرفت و نمونه‌ای از آن در هرباریوم دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به شماره ASM40101 نگهداری شد. اندام‌های مختلف گیاه از هم جدا شده و در اتاق به دور از آفتاب خشک شدند. پس از آن به صورت یکنواخت، به ذرات ریز خرد شدند.

مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده برای فرآیند عصاره‌گیری و انجام تست‌های بیولوژیکی از شرکت مرک خریداری شدند. همچنین، تمام حلال‌های مورد استفاده در HPLC، HPLC grade بودند.

عصاره تام متانولی

حدود ۶۰ میلی‌لیتر از حلال متانول به ۴ گرم از اندام‌های مختلف گیاه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک قرار گرفت. عصاره‌های به دست آمده با استفاده از سانتریفیوژ (۶۰۰۰ rpm و ۵ دقیقه) جدا گردیدند و به وسیله‌ی دستگاه تبخیرکننده‌ی مدور تغلیظ شدند. عصاره‌های تغلیظ شده جهت بررسی فنول و فلاونوئید کل، خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی در دمای ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از روش فولین-سیکالتیو استفاده شد (Singleton & Rossi, 1965). در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تام متانولی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین-سیکالتیو (۱۰٪ حجمی/حجمی) مخلوط گردید و پس از گذشت ۵ دقیقه، محلول سدیم کربنات (۰.۷٪) به آن‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در فضای تاریک تکان داده شدند. نهایتاً، جذب هر کدام از نمونه‌ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از منحنی استاندارد گالیک‌اسید محاسبه شد و بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک بیان شدند.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ها توسط روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد (Hazrati et al., 2019). در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تام متانولی (با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۵۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلرید (۲٪ متانولی) و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استات آمونیوم (۱ مولار) مخلوط شد. پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی هم زده شد و سپس جذب هر کدام از نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۴۲۶ نانومتر خوانده شد و مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید و بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بیان گردید.

استخراج فنولیک اسیدهای آزاد

به عصاره تام متانولی به دست آمده از مرحله قبلی، اسید کلریدریک ۶ مولار اضافه گردید و به کمک دستگاه pH متر، pH محلول در ۲ تنظیم شد. پس از آن محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۶۰۰۰ rpm و ۵ دقیقه) گردید. در ادامه، فاز محلول و فاز جامد تفکیک شدند (فاز جامد برای استخراج فنولیک اسیدهای استری در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت). فاز محلول به همراه n-هگزان با نسبت ۱:۱ (حجمی-حجمی) و با کمک قیف جداکننده هم زده شد. سپس، به فاز آبی تفکیک شده، دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات با نسبت ۱:۱ (حجمی-حجمی) اضافه گردید و با کمک قیف جداکننده هم زده شد. در آخر، فاز آلی توسط دستگاه تبخیر کننده‌ی مدور، حلال پرانی شده و عصاره‌ی حاصل که حاوی فنولیک اسیدهای آزاد بودند در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

استخراج فنولیک اسیدهای استری

به فاز جامد حاصل از مرحله قبل، ۲۰ میلی‌لیتر سدیم‌هیدروکسید ۴ مولار اضافه شد. پس از ۴ ساعت، pH محلول به وسیله‌ی اسیدکلریدریک ۳۷ درصد در ۲ تنظیم گردید. محلول آبی حاصل، توسط روش حلال-حلال با کمک حلال n-هگزان تا حدی خالص گردید و در ادامه فاز آبی با حلال دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات مورد استخراج قرار گرفت. فاز آلی به وسیله‌ی دستگاه تبخیرکننده‌ی مدور حلال پرانی شد و عصاره‌ی حاصل که حاوی فنولیک اسیدهای استری بودند در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

جداسازی و شناسایی فنولیک اسیدها

برای جداسازی و شناسایی فنولیک اسیدهای عصاره‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (ساخت شرکت Knauer، برلین، آلمان) استفاده شد. شویش گرادیانی با حلال‌های متانول اسیدی و آب HPLC گرید با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه صورت گرفت و ستون کروماتوگرافی C18 از نوع تجزیه‌ای و فازمعکوس با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و خلل و فرج ۵ میکرومتر بود. از حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر و آشکارساز UV در ۲۷۵ نانومتر بهره گرفته شد؛ ابتدا نمونه‌ها در متانول حل گردیده و سپس به دستگاه HPLC تزریق شدند.

اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تام متانولی اندام‌های مختلف گیاه از طریق اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی ۲,۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت (Blois, 1958). مقدار ۱ میلی گرم از عصاره‌ها وزن گردید و در ۱ میلی لیتر متانول حل شد. پس از آن، غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تهیه شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از محلول‌های تهیه شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۲ میلی مولار مخلوط شدند و به مدت نیم ساعت در تاریکی هم زده شدند. جذب محلول‌های حاصله و شاهد (حاوی مواد شیمیایی یکسان، بجز نمونه) بعد از نیم ساعت و در طول موج ۵۱۷ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (ساخت شرکت Biotek آمریکا) خوانده شد. درصد مهار کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} = \text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد}$$

در این فرمول A_{sample} و A_{blank} به ترتیب بیانگر میزان جذب کنترل و نمونه است. مقدار IC_{50} (غلظتی که موجب کاهش ۵۰٪ ظرفیت رادیکالی DPPH) به وسیله‌ی آنالیز همبستگی خطی به دست آمده از مقادیر درصد مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های نمونه تعیین شد. نتایج به دست آمده با بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) به عنوان کنترل مثبت مورد مقایسه قرار گرفت.

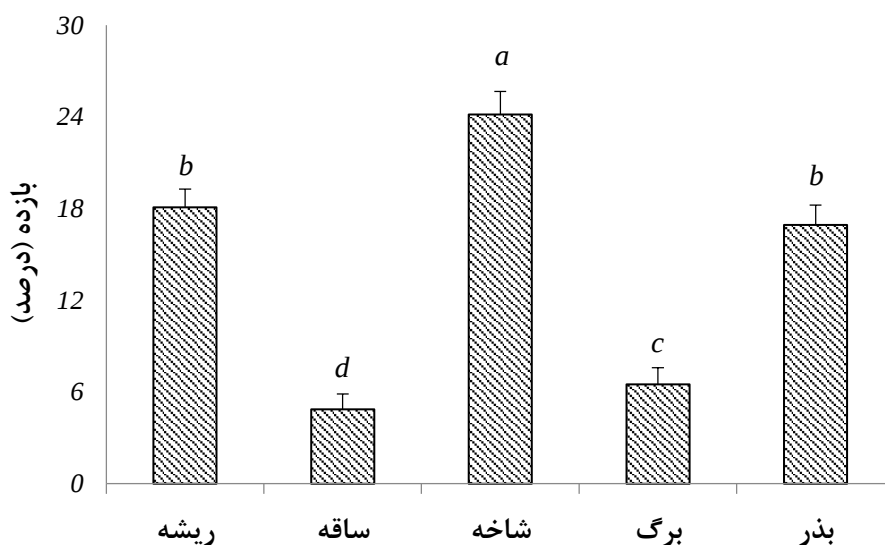
آزمون سمیت سلولی

برای اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی عصاره تام متانولی اندام‌های مختلف گیاه در رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) از آزمون رنگ‌سنجی MTT استفاده شد (Asnaashari et al., 2019). سلول‌های MCF-7 از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی ۱۰٪ به همراه آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنیسیلین کشت و پاساژ داده شدند تا از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند. سلول‌های چسبنده، توسط تریپسین-EDTA (Gibco BRL, Scotland) از سطح فلاسک جدا شدند و بعد از شمارش سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (دارای 1×10^4 سلول) به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی انتقال داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵٪ و رطوبت ۱۰۰٪ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تیمار شدند و بعد از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت، به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه، جذب نمونه‌ها در طیف جذب ۵۷۰ نانومتر خوانده شدند و بر حسب فرمول مربوطه میزان زنده مانی محاسبه شد.

نتایج

مطالعات فیتوشیمیایی

نتایج میانگین بازده استخراج عصاره اندام‌های مختلف گیاه در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره برگ (۲۴/۱۶ درصد) بود و عصاره‌های ریشه و ساقه نیز دارای کمترین بازده بودند.



شکل ۱: میانگین بازده عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون-

های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.



Figure1.

برای محاسبه محتوای کل ترکیبات فنولی موجود در اندام‌های مختلف گیاه از منحنی استاندارد گالیک اسید و معادله به دست آمده از آن، $Y=0.0029X + 0.38$; $R^2=0.99$ ، استفاده گردید. شکل ۲ محتوای کل ترکیبات فنولی موجود در یک گرم از اندام‌های مختلف گیاه خشک را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره‌های برگ، ساقه و بذر (به ترتیب برابر با ۰/۱۱ و ۰/۱۰ و ۰/۰۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک) بودند و عصاره ریشه گیاه نیز با مقادیر ۰/۰۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک نیز دارای کمترین میزان ترکیبات فنولی بود.

شکل ۲: میانگین محتوای کل ترکیبات فنولی عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Figure 2.

شکل ۳ نتایج حاصل از فلاونوئید کل موجود در یک گرم از اندام‌های مختلف گیاه خشک را نشان می‌دهد. از منحنی استاندارد کوئرستین و معادله به دست آمده از آن یعنی $Y=0.0037X - 0.03$; $R^2=0.99$ برای تعیین میزان فلاونوئید کل استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده، بیش‌ترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به عصاره‌ی ساقه گیاه (۰/۰۴ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) و کمترین آن مربوط به ریشه گیاه با مقادیر ۰/۰۰۰۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک است.

شکل ۳: میانگین میزان فلاونوئید کل عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium* آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

فنولیک اسیدهای آزاد و استری

فنولیک اسیدهای آزاد و استری موجود در عصاره‌های شاخه، ساقه، برگ، ریشه و بذر گیاه استخراج گردید و با کمک دستگاه HPLC جداسازی شدند و به کمک استاندارد، مورد شناسایی قرار گرفتند. شکل ۴ کروماتوگرام HPLC مربوط به استاندارد فنولیک اسیدها و عصاره‌ی حاوی فنولیک اسیدهای آزاد استخراج شده از بذر گیاه را نشان می‌دهد. مقادیر کمی فنولیک اسیدهای استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه به کمک سطح زیر پیک آنها و معادله کالیبراسیون به دست آمده از استاندارد آنها محاسبه گردید و نتایج در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۱)، بیشترین میزان فنولیک اسیدهای آزاد مورد مطالعه مربوط به عصاره‌های بذر و شاخه با مقادیر به ترتیب ۴/۷۴ و ۴/۲۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود و عصاره فنولیک اسیدهای آزاد برگ گیاه دارای کمترین میزان ترکیبات فنولیک اسیدی (۰/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود. ترکیبات گالیک اسید، m-هیدروکسی بنزوئیک-اسید و m-کوماریک اسید در تمام اندام‌های مورد مطالعه، شناسایی و تعیین مقدار شده‌اند. بر اساس نتایج، بیشترین ترکیب فنولیک اسید آزاد، کافئیک اسید است که مقادیر آن در عصاره بذر و شاخه به ترتیب $0/16 \pm 1/44$ و $0/09 \pm 1/11$ میلی گرم بر گرم وزن خشک است. همچنین، ساقه گیاه دارای مقادیر قابل توجه از گالیک اسید ($0/03 \pm 0/65$ میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود. بعلاوه، سینامیک اسید و رزمارینیک اسید در هیچ یک از اندام‌ها شناسایی نشدند. ترکیب سالیسیلیک اسید با مقادیر $0/09 \pm$

۰/۹۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک تنها در عصاره فنولیک اسیدهای آزاد ریشه شناسایی گردید. پاراکوماریک اسید نیز تنها در شاخه ها موجود بود.

جدول ۲ نیز مقادیر فنولیک اسیدهای استری موجود در اندام های مختلف گیاه را نشان می دهد. بر اساس نتایج، بیشترین میزان فنولیک اسیدهای استری مربوط به عصاره های شاخه، بذر و ریشه بود و مقادیر آنها به ترتیب ۱/۶۰ و ۱/۵۹ و ۱/۰۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک می باشد. m-هیدروکسی بنزوئیک اسید تنها فنولیک اسیدی بود که در تمام اندام های مورد مطالعه شناسایی و تعیین مقدار شد. بر اساس نتایج، بیشترین ترکیب فنولیک اسید استری، سالیسیلیک اسید، m-کوماریک اسید و گالیک-اسید بود و مقادیر آنها به ترتیب 0.07 ± 0.098 ، 0.07 ± 0.095 و 0.08 ± 0.087 میلی گرم بر گرم وزن خشک بود. همچنین، شاخه گیاه دارای مقادیر قابل توجهی از گالیک اسید (0.05 ± 0.061 میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود.

جدول ۱- مقادیر کمی فنولیک اسیدهای آزاد استخراج شده از اندام های مختلف گیاه *L. vesicarium* (میلی گرم بر گرم وزن خشک $\pm$ انحراف معیار)

ردیف	ترکیبات	زمان جداسازی	بذر	برگ	شاخه	ساقه	ریشه
(دقیقه)							
۱	گالیک اسید	۸/۲۰	0.05 ± 0.087	0.01 ± 0.07	0.04 ± 0.087	0.02 ± 0.034	0.02 ± 0.019
۲	m-هیدروکسی بنزوئیک اسید	۱۵/۴۰	0.03 ± 0.042	0.01 ± 0.07	0.03 ± 0.023	0.02 ± 0.014	0.01 ± 0.008
۳	کافئیک اسید	۲۳/۳۰	0.16 ± 0.044	۰	0.09 ± 0.011	0.03 ± 0.065	0.03 ± 0.052
۴	رزمارینیک اسید	۲۴/۴۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	p-کوماریک اسید	۲۵/۱۰	۰	۰	0.04 ± 0.060	۰	۰
۶	فرولیک اسید	۲۷/۰۰	0.21 ± 0.037	۰	0.04 ± 0.050	۰	۰
۷	سالیسیلیک اسید	۲۸/۲۰	۰	۰	۰	۰	0.09 ± 0.098
۸	m-کوماریک اسید	۲۹/۳۰	0.04 ± 0.064	0.02 ± 0.021	0.08 ± 0.094	0.01 ± 0.016	0.02 ± 0.059
۹	سینامیک اسید	۳۸/۴۰	۰	۰	۰	۰	۰
مجموع			۴/۷۴	۰/۳۵	۴/۲۳	۱/۲۸	۲/۳۷

جدول ۲- مقادیر کمی فنولیک اسیدهای استری استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium* (میلی گرم بر گرم وزن خشک $\pm$ انحراف معیار)

Table 2.

ردیف	ترکیبات	زمان جداسازی (دقیقه)	بذر	برگ	شاخه	ساقه	ریشه
۱	گالیک اسید	۸/۲۰	0.08 ± 0.08	۰	۰	۰	۰
۲	m-هیدروکسی بنزوئیک اسید	۱۵/۴۰	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
۳	کافئیک اسید	۲۳/۳۰	0.07 ± 0.07	0.23 ± 0.02	0.61 ± 0.05	0.22 ± 0.02	۰
۴	رزمارینیک اسید	۲۴/۴۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	p-کوماریک اسید	۲۵/۱۰	0.01 ± 0.00	۰	۰	۰	۰
۶	فرولیک اسید	۲۷/۰۰	0.08 ± 0.04	۰	۰	۰	۰
۷	سیالسیلیک اسید	۲۸/۲۰	۰	۰	۰	0.39 ± 0.04	0.98 ± 0.07
۸	m-کوماریک اسید	۲۹/۳۰	۰	0.22 ± 0.02	0.95 ± 0.07	0.16 ± 0.02	۰
۹	سینامیک اسید	۳۸/۴۰	۰	۰	۰	۰	۰
	مجموع		۱/۵۹	۰/۴۷	۱/۶۰	۰/۷۹	۱/۰۲

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

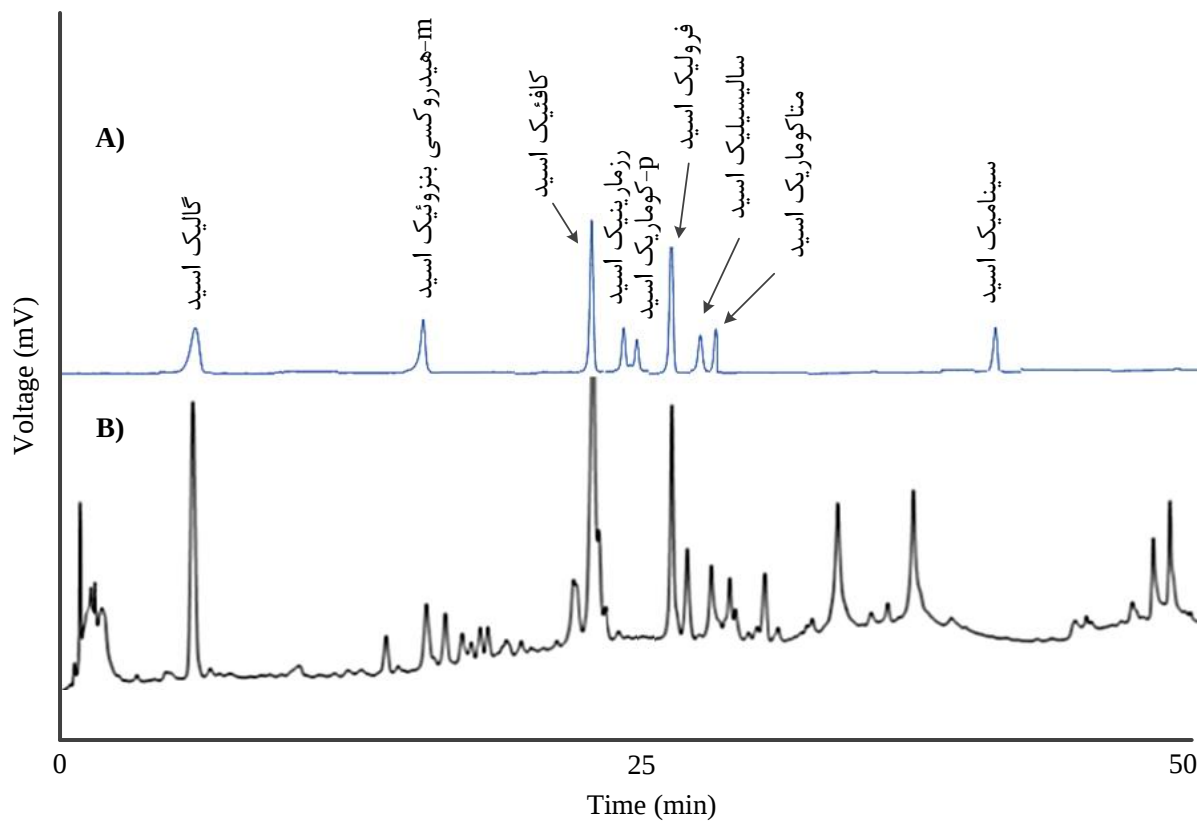
برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تام متانولی اندام‌های مختلف گیاه از روش DPPH استفاده گردید. در این

مقاله در آزمایش‌ها، آنتی‌اکسیدان بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) به عنوان رفرنس استفاده گردید و نتایج به صورت IC_{50}

(میکروگرم بر میلی لیتر) بیان گردید. بر اساس نتایج مشاهده شده (شکل ۵)، درصد مهارکنندگی وابسته به غلظت بوده و با

افزایش غلظت، افزایش می‌یابد و بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به اندام‌های بذر و ریشه با مقدار IC_{50} برابر

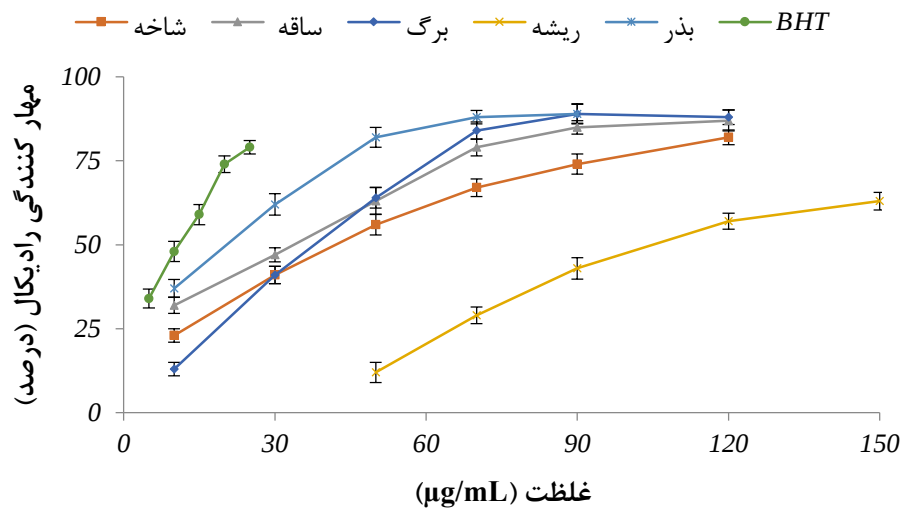
با ۲۵/۴ و ۹۹/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر است.



شکل ۴_ کروماتوگرام HPLC مربوط به (A) استاندارد فنولیک اسیدها، (B) عصاره‌ی حاوی فنولیک اسیدهای آزاد استخراج شده از بذر

گیاه *L. vesicarium*

Figure 4.

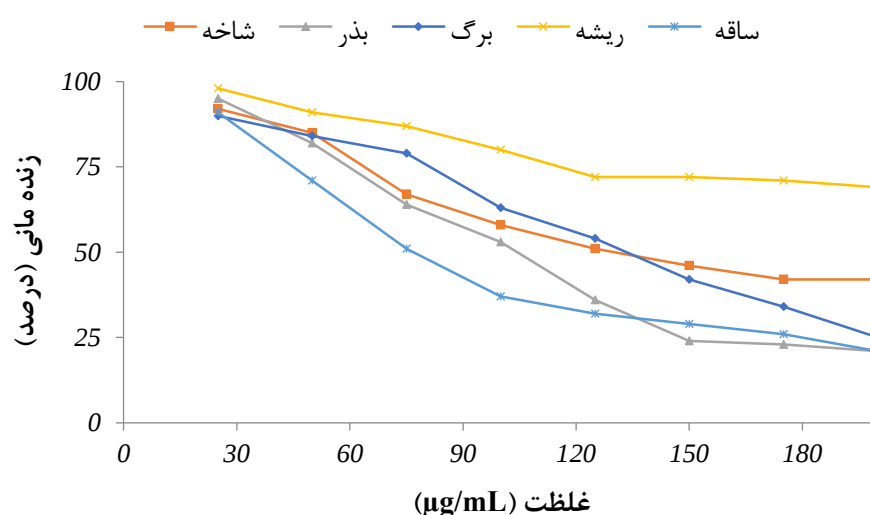


شکل ۵ - درصد مهارکنندگی رادیکالی عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و میله‌های روی ستون‌ها نشان‌دهنده انحراف از میانگین می‌باشد.

Figure 5.

بررسی سمیت سلولی

از آزمون MTT جهت بررسی خاصیت سمیت سلولی عصاره تام متانولی اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium* در محیط *In vitro* استفاده گردید. شکل ۶ نتایج حاصل از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها در زمان‌های ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت عصاره‌ها بوده و با افزایش غلظت درصد سلول‌های MCF-7 زنده، کاهش یافته و از قابلیت پرولیفراسیون سلول‌ها جلوگیری می‌شود. IC_{50} عصاره اندام‌های مختلف بر روی رده سلولی MCF-7 محاسبه گردید و مقادیر آن برای ساقه، بذر، شاخه، برگ و ریشه به ترتیب برابر با ۹۸/۶۲، ۱۳۲/۴۱، ۱۳۳/۹۴ و < ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و بر اساس نتایج، سمیت سلولی در بین نمونه‌های مورد مطالعه، با توالی ساقه < بذر < شاخه < برگ < ریشه کاهش نشان داد.



شکل ۶: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) در اثر تیمار با عصاره اندام‌های مختلف گیاه *L. vesicarium*

Figure 6.

مباحث

در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی، به دلیل اثرات مضر داروهای سنتزی، تحقیق بر روی ترکیبات طبیعی افزایش یافته است تا از این طریق بتوانند جایگزینی برای داروهای سنتزی باشند (Wannes et al., 1970; Djeridane et al., 2006). طبق بررسی‌ها، ترکیبات فنولی، توکوفرول‌ها (ویتامین E) و آسکوربیک اسید (ویتامین E) جزء مهم‌ترین ترکیبات ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Velioglu et al., 1998). همچنین، از میان ترکیبات مذکور، ترکیبات فنولی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی بالاتری نسبت به توکوفرول‌ها و آسکوربیک اسید هستند (Karami et al., 2013). این ترکیبات جزء متابولیت ثانویه هستند که معمولاً در گیاهان یافت می‌شوند و به گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند که از بین گروه‌های مختلف، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی بدلیل دارا بودن طیف وسیعی از فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضدآلرژی، دارای اهمیت

فراوانی هستند (Montoro et al., 2005). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که گیاه *L. vesicarium* دارای محتوای بالای ترکیبات فنولی و از جمله فلاونوئیدها در ساقه و بذر می باشد (شکل ۲ و ۳). نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی در پژوهش حاضر نشان داد که عصاره ساقه و بذر گیاه مورد مطالعه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به سایر اندام گیاه است. همچنین، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها وابسته به غلظت بود و غلظت های بالاتر قدرت مهارکنندگی بیشتری در برابر رادیکال های آزاد نشان دادند. نتایج حاصل از برخی مطالعات انجام شده نشان دهنده همبستگی محتوای ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان است (Siddique et al., 2010). در نتیجه، طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی اکسیدانی بالای عصاره بذر گیاه *L. vesicarium* مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن است و میزان فنول و فلاونوئید کل در این تحقیق می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره بذر گیاه را توجیه نماید.

مطالعات مربوط به ارتباط بین عصاره های حاوی ترکیبات فنولی با خواص ضدسرطانی نشان می دهد که عصاره هایی با بیشترین میزان ترکیبات فنولی عملکرد ضد سرطانی بهتری در مقایسه با سایر عصاره ها دارند. این ترکیبات فنولی، اثر ضدسرطانی خود را از طریق جلوگیری از آنزیم های متابولیک دخیل در فعال سازی عوامل سرطان زا و یا توقف سیکل سلول سرطانی بروز می دهند (Abdelhady & Aly, 2012). نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت سمیت سلول بر علیه سلول های سرطانی MCF-7 در پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین سمیت سلولی مربوط به عصاره های ساقه و بذر گیاه مورد مطالعه بود. همچنین، نتایج آنالیز فنولیک اسیدها نشان داد که این عصاره ها دارای مقادیر بیشتری از کافئیک اسید و گالیک اسید نسبت به سایر عصاره ها است. بر اساس تحقیقات انجام گرفته، کافئیک و گالیک اسید نقش مهمی را در مهار سلول های سرطانی دارند. مطالعه Zarlaha و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که کافئیک اسید بر روی سلول های سرطانی تخمدان اثر گذاشته و بررسی های مولکولی نیز تایید کردند که این ماده دارای بیشترین خاصیت ضدسرطانی است. همچنین، کافئیک اسید دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است و منجر به مهار تکثیر سلول های سرطانی سینه و کبد نیز می شود (El-Refaei & El-Naa, 2011). همچنین، مطالعه بر روی عصاره های حاوی گالیک اسید نشان داد که این عصاره ها باعث کاهش تکثیر سلول های سرطان کلون HT-29 در یک دوره ی ۲۴ ساعته می شوند. این ماده به عنوان القاکننده آپوپتوز است که با تولید گونه های اکسیژن فعال و توقف سلول ها در مرحله G2/M مانع تکثیر سلول های سرطانی می شود (Korekar et al., 2011; Verma et al., 2013; Cassiem & Kock, 2019). در نتیجه، طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، شاید بتوان حدس زد که سمیت سلولی بالای عصاره های ساقه و بذر گیاه *L. vesicarium* مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن از جمله کافئیک اسید و گالیک اسید باشد.

بنابراین، بر اساس نتایج به دست آمده، بذر گیاه *L. vesicarium* دارای بیشترین ترکیبات فنولی از جمله کافئیک اسید، فرولیک اسید و گالیک اسید است و با توجه به اینکه عصاره متانولی این اندام از پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی برخوردار است لذا بذر این گیاه می تواند در صنایع داروئی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

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

منابع

- کشاوری، س.د، اثنا عشری، س، دل آذر، ع، اصغریان، پ. (۱۳۹۶). بررسی فیتوشیمیایی و خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه *Lepidium vesicarium* پایان نامه دکترای عمومی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
- Abdelhady, M.I., and Aly, H.A.H. (2012). Antioxidant antimicrobial activities of *Callistemon comboynensis* essential oil. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(1): 37-41.
- Al-Shehbaz, I.A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon* 61: 931-954.
- Asnaashari, S., Delazar, A., Safarzadeh, E., Tabibi, H., Mollaei, S., Rajabi, A. and Asgharian, P. (2019). Phytochemical analysis and various biological activities of the aerial parts of *Scrophularia atropatana* growing in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(3): 1543-1555.
- Asnaashari, S., Keshavarz, S., Delazar, A., Sarvari, Y., and Asgharian, P. (2018). GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial screening of volatile oil of *Lepidium vesicarium*: *Pharmaceutical Sciences*, 24(3): 246-249.
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Bolatito, A.F.C. (2010). Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products*, 3: 27-34.
- Bramara, B.V.B., Vasavi, H.S., Sudeep, H.V., and Prasad, S. (2017). Hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Black Maca) root exerts wound healing activity in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Wound Medicine*, 19, 75-81.
- Cassiern, W., and Kock, M. (2019). The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1): 32.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4): 654–660.
- El-Refaei, M.F., El-Naa, M.M. (2011). Antioxidant and Apoptotic Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Induced Marked Inhibition on Human Breast Cancer Cell Line. *Asian Journal of Biochemistry*, 6: 82-89.
- Fresco, P., Borges, F., Marques, M.P., and Diniz, C. (2010). The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1): 114-34.
- Hazrati, S., Ebadi, M.T., Mollaei, S. and Khurizadeh, S. (2019). Evaluation of volatile and phenolic compounds, and antioxidant activity of different parts of *Ferulago angulata* (schlecht.) Boiss. *Industrial Crops and Products*, 140: 111589.
- Kakate, K. (1997). *Practical Pharmacognosy*, Vallabh Prakashan, Delhi, India, 4th edition.
- Karami, Z., Mirzaei, H., Emamdjomeh, Z., Sadeghimahoonak, A.R., and Khomeiri, M. (2013). Effect of harvest time on antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract and evaluation of its antibacterial activity. *International Food Research Journal*, 20: 2951-7.

- Karimi, S., Farzaneh, F., Asnaashari, S., Parina, P., Sarvari, Y., and Hazrati, S. (2019). Phytochemical analysis and anti-microbial activity of some important medicinal plants from North-west of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(4): 1871.
- Korekar, G., Stobdan, T., Arora, R., and Yadav, A. (2011). Antioxidant capacity and phenolics content of apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel as a function of genotype. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66(4): 376–83.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10): 1374.
- Mondiale de la Santé, O. (2013). Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014–2023, Organisation mondiale de la Santé, Geneva, Switzerland.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., and De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry* 92(2): 349–355.
- Shimi P. and Termeh F. (2004). Weeds of Iran. Ministry of Agriculture, Tehran.
- Siddique, N.A., Mujeeb, M., Najmi, A.K., and Akram, K. (2010). Evaluation of antioxidant activity quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of *Aegle marelos*. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4: 1-5.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144–158.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 4113–4117.
- Verma, S., Singh, A., and Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3): 473-85.
- Wang, S., and Zhu, F. (2019). Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). *Food chemistry*, 288, 422-443.
- Wannes, W.A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M., and Wood, J.L. (1970). Biochemistry of mercapturic acid formation. In: Fishman, W.H. (Ed.), *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*. Academic Press, London and New York, pp. 261–299.
- Zarlaha, A., Koupkoumelis, N., and Stanojkovic, T. (2014). Cytotoxic activity of essential oil and extract of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10: 907-917.

Investigation of phenolic compounds and biological properties of vegetative organs of *Lepidium vesicarium* L.

S. Mollaei^{1*}, M. Eslami², M. Ebadi³

Received:2020.11.19

Accepted:2021.7.19

Abstract

Despite a long history of medicinal use of *Lepidium vesicarium*, the phenolic compounds and biological activity studies have not been performed on different organs of the plant. So, after obtaining methanolic extract of the different organs (root, leave, stem, branch, and seed), the total phenolic and flavonoid contents were assayed by spectrophotometric methods, and antioxidant and cytotoxic properties were evaluated by DPPH and MTT methods, respectively, and then free and esterified phenolic acids were analyzed by HPLC. According to the results, the methanolic extracts of seed and leaf had the highest total phenolic content, and the maximum flavonoid content was related to the stem and seed extracts. The investigation of antioxidant and cytotoxic activity against MCF-7 cells showed that the highest antioxidant activity was related to the methanolic extract of seed, and extracts of stem and seed had the highest cytotoxic activity. The results of phenolic acids analysis indicated that caffeic acid with the amounts of 1.44 ± 0.16 and 1.11 ± 0.09 mg/g dry weight was the main free phenolic acids in the leaf and branch extracts, respectively. Also, salicylic acid and m-coumaric acid with the amounts of 0.98 ± 0.07 and 0.95 ± 0.07 mg/g dry weight were the predominant esterified phenolic acid in the root and branch extracts, respectively. Therefore, based on the results, seeds have the highest phenolic compounds, including caffeic, ferulic and gallic acids and due to its high antioxidant potential and cytotoxicity, it can be used in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Antioxidant, Caffeic acid, Cytotoxic activity, Gallic acid, *L. vesicarium*

1. Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahid Madani University of Azerbaijan

2. Msc, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahid Madani University of Azerbaijan

3. Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Shahid Madani University of Azerbaijan

اثر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز بر القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه

الهه میرزایی دلبری^۱، جعفر وطن‌دوست^۲، متین جامی معینی^{۳*}، عیسی کهن باغخیراتی^۴

چکیده

مقدمه: تراریخت‌سازی میانجی‌گری شده توسط آگروباکتریوم، یک فن آوری کارآمد برای القای ریشه‌های مویین است. در پژوهش حاضر، اثر سویه آگروباکتریوم رایزوزنز و نوع ریزنمونه بر القای ریشه مویین در گیاه یونجه بررسی گردید. **روش‌ها:** آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل سویه آگروباکتریوم رایزوزنز در چهار سطح A13، ۳۱۸، ۱۵۸۳۴ و A4 و نوع ریزنمونه در دو سطح برگ سه‌برگچه‌ای و هیپوکوتیل بودند.

نتایج و بحث: بیشترین درصد القای ریشه مویین، در ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز بود. تلقیح با سویه باکتریایی ۳۱۸، باعث کمترین القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گردید. سویه‌های باکتریایی A13 و ۱۵۸۳۴ به ترتیب بیشترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل را تولید نمودند. کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ تولید گردید. بیشترین و کمترین طول ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، به ترتیب در شرایط تلقیح با سویه‌های باکتریایی A4 و ۳۱۸ مشاهده شد. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در رابطه با تعداد و طول ریشه مویین وجود نداشت. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها، حضور ژن *rolB*

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

۳. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران (نویسنده مسئول: mat_jami@iaus.ac.ir)

۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین را تأیید نمود. با توجه به نتایج، استفاده از ریزنمونه برگ همراه با سویه A4/اگروباکتریوم رایزوزنز جهت تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پلاسمید، تراریخت‌سازی، ریزنمونه، سویه باکتریایی، هیپوکوتیل

مقدمه

طی سال‌های اخیر تعداد زیادی از گیاهان و افزودنی‌های گیاهی غذایی مورد بررسی قرار گرفته اند که نه تنها در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های عصبی، قلب و عروق، روان و گوارشی بکار رفته‌اند، بلکه در برخی موارد به عنوان محافظ بافت‌های بدن مانند مغز و کبد مطرح شده‌اند (Moloudi et al., 2014). یکی از این گیاهان که دارای سابقه‌ای طولانی در استفاده‌های غذایی و دارویی در طب سنتی چین، هند و بسیاری از مناطق خاورمیانه است، گیاه یونجه زراعی با نام علمی *Medicago sativa* L. و نام عمومی Alfalfa است که در افزایش اشتها، هضم غذا و بهبود سوء تغذیه مؤثر است. در ایران، از قدیم‌الایام یونجه به علت اثرات سریع و قابل توجه در درمان بیماران مبتلا به کمبود ویتامین C، افزایش سرعت التیام بافتی و کاهش تورم استفاده شده است. در طب سنتی از یونجه به عنوان مکمل خون نام برده می‌شود. در مناطق کردنشین، از گیاه یونجه به منظور جلوگیری از خونریزی‌های پوستی و تسریع فرآیند انعقاد استفاده می‌گردد (Servatyari et al., 2017). یونجه یکی از گیاهان علوفه‌ای مهم در سرتاسر جهان است. گیاه یونجه، علوفه‌ای با کیفیت مناسب برای تمامی انواع دام تولید می‌کند و به تنهایی می‌تواند انرژی، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌های مورد نیاز دام‌ها را تامین کند (Monirifar et al., 2021).

تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی گیاه یونجه، وجود پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ساپونین‌ها، لیگنین، ترکیبات فنلی، تانن‌ها، آلکالوئیدهای تری ترپن را نشان می‌دهد. بررسی فارماکولوژیک بیانگر آن است که یونجه دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد اضطراب، محافظ کبد، محافظت کننده قلبی و عصبی، ایمنی، ضد کم خونی، گزانتین اکسیداز و بسیاری از مهارکننده‌های دارویی دیگر است (Al-Snafi et al., 2021).

در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند بوده و مدت زمان زیادی برای تولید آن‌ها لازم است. از آنجایی که سنتز شیمیایی فرآورده‌های طبیعی گیاهی به آسانی امکان‌پذیر نیست، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می‌رسد. در این رابطه، معمولاً تأکید بر کشت ریشه مویین به عنوان وسیله‌ای برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه برای کاربردهای تجاری است. این کشت‌ها معمولاً ظرفیت بالاتری نسبت به کشت‌های سوسپانسیون سلولی یا حتی ریشه گیاهان دست نخورده برای سنتز متابولیت‌های ثانویه دارند (Ebrahimi et al., 2017; Raei et al., 2017).

برخی از متابولیت‌ها فقط در مرحله‌ی کشت ریشه تولید می‌شوند. کشت ریشه را می‌توان به‌صورت ریشه‌ی نابجا و ریشه‌ی تراریخته ایجاد نمود. سیستم کشت ریشه در گیاهان عالی معمولاً سرعت رشد کمتری را نشان داده و نیاز به منبع فیتوهورمونی خارجی دارد که این امر منجر به سنتز بسیار کم متابولیت‌های ثانویه می‌شود. بیوتکنولوژی روش‌های جایگزینی برای تولید مواد دارویی با منشاء ریشه معرفی می‌کند. یکی از این راهکارها استفاده از یک ناقل طبیعی به نام *اگروباکتریوم رایزوزنز* (*Agrobacterium rhizogenes*) و طراحی سیستم کشت ریشه موئین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است (Soleimani et al., 2012).

القای ریشه‌های موئین نتیجه ترانسفورماسیون ژنتیکی باکتری *اگروباکتریوم رایزوزنز* است که از طریق انتقال T-DNA پلاسمید Ri باکتری حاوی ژن‌های *rol* و *aux* به گیاه انجام می‌شود (Sharifi et al., 2014). بنابراین به نظر می‌رسد که ژن *rolB* با افزایش حساسیت به اکسین و ژن‌های *aux1* و *aux2* از طریق بیوسنتز اکسین در سلول‌های تراریخت شده، سبب القای پاسخ اکسین و تشکیل ریشه‌های موئین می‌شود (Majumdar et al., 2011).

ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح *اگروباکتریوم رایزوزنز* دارای رشد سریع، پایداری فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و انتقال پذیری بوده و اغلب میزان رشد آنها سریعتر از کشت سلول‌های گیاهی است. البته سیستم ریشه‌های موئین تراریخت، منبعی نویدبخش در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان با ارزش دارویی بالا می‌باشند (Nourozi et al., 2014).

تراریخت‌سازی میانجی‌گری شده توسط *اگروباکتریوم*، به عنوان یک فن‌آوری زیستی کارآمد، برای القای ریشه‌های موئین در گیاه *برازمبل* (*Perovskia abrotanoides*) گزارش شده است. بر اساس نتایج این مطالعه، هر سه سویه باکتری مورد استفاده، موفق به القای ریشه موئین بر روی گره‌های تلقیح شده در گیاهچه‌های استریل شدند. بیشترین میزان تولید ریشه موئین پس از آلودگی با سویه ATCC15834 بدست آمد و پس از آن سویه R1000 در تولید ریشه‌ی موئین نسبت به TR105 مؤثرتر بود (Ebrahimi et al., 2017). در پژوهشی که به منظور بکارگیری سیستم تراریخت‌سازی ریشه موئین در گیاه یونجه انجام شد، استفاده از سویه باکتریایی LBA9402 منجر به تولید موفقیت‌آمیز ریشه‌های موئین در واریته WL-525HQ گیاه یونجه گردید (Zhao et al., 2022). بررسی القای ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های ساقه سه رقم یونجه در شرایط تلقیح با سویه A4T *اگروباکتریوم رایزوزنز* نشان داد که درصد القای ریشه موئین در ارقام مختلف از ۴ تا ۹۴ درصد متغیر بود (Golds et al., 1991). سویه و سن *اگروباکتریوم رایزوزنز*، نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت از عوامل مؤثر در القای ریشه موئین هستند. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که بافت‌های مختلف گیاهی پاسخ‌های متفاوتی به تراریخت‌سازی با سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم رایزوزنز* دارند (Pirian et al., 2012; Sharafi et al., 2013; Samadi et al., 2012). در پژوهشی، سه سویه *اگروباکتریوم رایزوزنز* جهت القای ریشه موئین در چهار ریزنمونه مختلف گیاه گل مکزیکی (*Agastache foeniculum*) مورد استفاده قرار گرفت.

بیشترین فراوانی تراریخت‌سازی با استفاده از سویه A4 و در ریزنمونه‌های برگ یک ماهه به دست آمد. وضعیت تراریختی ریشه‌های مویین با روش PCR مورد تأیید قرار گرفت (Nourozi et al., 2014). با توجه به اهمیت گیاه یونجه به عنوان یک گیاه دارویی و همچنین نقش ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه، در پژوهش حاضر توانایی سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد.

طرح آزمایشی

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجراء گردید. فاکتورهای مورد بررسی شامل سویه باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز در چهار سطح A13، ۳۱۸، ۱۵۸۳۴ و A4 و نوع ریزنمونه در دو سطح ریزنمونه برگ سه‌برگچه‌ای و هیپوکوتیل بودند.

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

بذرهای گیاه یونجه همدانی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به منظور ضدعفونی بذور، ابتدا بذور یونجه با آب معمولی شستشو داده شد تا آلودگی‌های سطحی تا حد امکان زدوده شود. سپس بذور به مدت ۱ دقیقه در الکل اتانل ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی شدند. سپس در زیر هود لامینار، بذور سه مرحله و در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

پس از ضدعفونی، بذور در محیط کشت MS جامد فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد کشت شدند. ظروف کشت به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل گردیدند. پس از جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه، قطعات هیپوکوتیل و اولین برگ سه‌برگچه‌ای به عنوان ریزنمونه استفاده شدند.

آماده سازی سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز و تلقیح ریزنمونه‌ها

سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز از گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. از محیط کشت مایع و جامد LB برای کشت باکتری استفاده شد. برای نگهداری کوتاه مدت و واکشت باکتری‌ها از محیط کشت

LB جامد استفاده شد. برای کشت سوسپانسیون باکتری، از کشت‌های جامد تک‌کلونی گرفته شد و در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپیسین کشت گردید. برای تهیه یک لیتر محیط کشت LB، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم سدیم کلراید و ۱۰ گرم پپتون به ترکیبات اصلی محیط کشت اضافه شد. محیط کشت تهیه شده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید (Bertani, 1952).

برای تهیه کشت سوسپانسیون، در شرایط استریل، یک کلونی از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوزنز کشت شده در محیط کشت LB جامد برداشته و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت گردید. محیط کشت LB مایع آغشته به باکتری به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و در دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت تا باکتری رشد کرده و فعال شود. باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند و رسوب باکتری همراه با ۱۰ میلی‌لیتر محیط MS ۱/۲ مایع برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی به روش غوطه‌وری مورد استفاده قرار گرفت (Khatodia & Biswas, 2014).

ریزنمونه‌های گیاهی به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند. بعد از حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی اطراف ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS جامد منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در اتاقک رشد، در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری گردیدند. تعدادی ریزنمونه نیز به عنوان شاهد به همین روش آماده شد، با این تفاوت که به جای سوسپانسیون باکتری، به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند و سپس در شرایط یکسان با نمونه‌های تلقیحی کشت و نگهداری شدند.

۴۸ ساعت بعد از هم‌کشتی، برای حذف باکتری، ریزنمونه‌ها دو تا سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و جهت حذف آب اضافی بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) منتقل و در اتاقک رشد، در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در روشنایی نگهداری شدند. در هر ظرف کشت، سه عدد ریزنمونه قرار گرفت. برای حذف کامل باکتری، در واکشت‌های بعدی از غلظت‌های پایین‌تر سفوتاکسیم (۴۰۰-۳۰۰-۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. واکشت ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز انجام شد. تولید ریشه‌های موئین در این مرحله مشاهده گردید.

پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط دارای سفوتاکسیم، مشاهدات روزانه برای بررسی ظهور ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های تلقیح شده با باکتری انجام شد. بعد از رشد کافی و مطلوب ریشه‌ها (حدود ۴۵ روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت)، ویژگی‌هایی نظیر درصد القای ریشه موئین، تعداد ریشه موئین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه‌های موئین اندازه‌گیری شد و تراریختی ریشه‌های ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین درصد القای ریشه موئین، تعداد ریزنمونه‌های دارای ریشه بر تعداد کل ریزنمونه‌های داخل هر ظرف کشت تقسیم و حاصل در ۱۰۰ ضرب گردید. تعداد ریشه موئین در ریزنمونه، از

طریق شمارش تعداد ریشه‌های مویین القاء شده در هر ریزنمونه و تعیین متوسط تعداد آن در ریزنمونه‌های موجود در هر ظرف کشت محاسبه شد. طول ریشه‌های مویین در هر ریزنمونه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و میانگین آن در ریزنمونه‌های هر ظرف کشت به عنوان طول ریشه مویین گزارش گردید. جهت تعیین وزن خشک ریشه‌های مویین، ریشه‌های تولید شده در هر ظرف کشت به مدت ۲۴ به آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ساعت انتقال یافت و سپس با استفاده از ترازوی دقیق آزمایشگاهی توزین شد.

تأیید تراریختی ریشه‌های مویین یونجه از طریق PCR

برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین، استخراج DNA از ریشه‌های مویین و طبیعی گیاه بر پایه روش Edwards و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت. ریشه‌های مویین، حاصل از انتقال T-DNA پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوزنز به سلول‌های گیاهی می‌باشند. تأیید تراریختی ریشه‌های مویین را می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود در T-DNA این باکتری انجام داد که مهم‌ترین آن‌ها ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* هستند. در این پژوهش، برای تأیید مولکولی ریشه‌های مویین تراریخت، از تکنیک PCR بر روی ریشه‌های مویین با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *rolB* استفاده شد. DNA های استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* (Error! Reference source not found. ۱) تکثیر شدند (Kabirnetaj et al., 2012).

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB*

Table 1. Sequence of specific primers of *rolB* gene

آغازگر	توالی آغازگر 5'.....3'	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
آغازگر پیشرو	GCTCTTGCAAGTCTAGATTT	۵۵	۴۳۰ bp
آغازگر برگشتی	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC		

مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix PCR (dNTPs, MgCl₂, buffer, Taq DNA polymerase) و یک میکرولیتر DNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. به نمونه کنترل منفی، DNA استخراج شده از نمونه شاهد اضافه شد و کنترل مثبت هم DNA پلاسمید باکتری بود. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها

برای بررسی کیفیت DNA از نظر شکستگی رشته DNA، ۵ میکرولیتر از محصول استخراج DNA همراه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری در چاهک‌ها جداگانه تزریق شد. نانک به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۰ ولت متصل گردید. پس از یک ساعت، ژل در دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel Documentation System) قرار داده شد و تصویر آن مشاهده گردید.

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بر روی صفات درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه مویین با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، سویه باکتری و همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه باکتری بر درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه، طول و وزن خشک ریشه مویین در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس نوع ریزنمونه، سویه اگروباکتریوم رایزوزنز و اثر متقابل آنها

Table 2. Analysis of variance for explant type, *A. rhizogenes* strain and their interaction

منبع تغییرات	$\frac{SS}{df}$	میانگین مربعات		
		درصد القای ریشه مویین	تعداد ریشه مویین در ریزنمونه	طول ریشه مویین
نوع ریزنمونه	۱	۳۷۵۰/۲۵**	۳۰/۳۷**	۵۲۹/۲۲**
سویه باکتری	۳	۷۸۷/۰۶**	۲/۸۲**	۸۰/۷۱**
نوع ریزنمونه × سویه باکتری	۳	۱۶۹/۷۹**	۳/۲۶**	۸۲/۶۱**
خطای آزمایشی	۱۶	۱۰/۵۸	۰/۱۱	۱/۳۱
ضریب تغییرات (%)	-	۸/۶۷	۱۳/۳۲	۱۷/۲۲

بدون علامت، غیرمعنی‌دار. ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

درصد القای ریشه مویین

درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ (۵۰ درصد)، به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۲۴/۹۹ درصد) بود (جدول ۳). هر چهار سویه اگروباکتریوم رایزوزنز مورد استفاده، ریشه مویین در

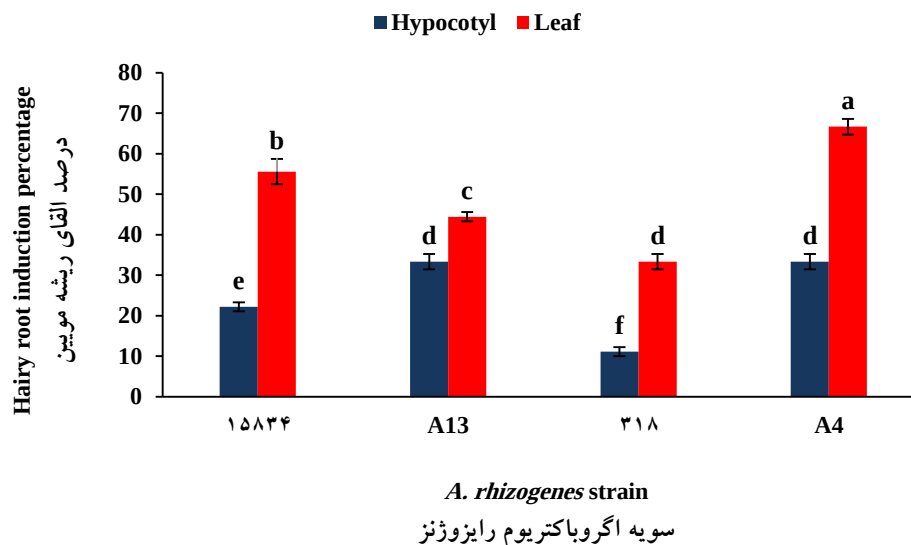
ریزنمونه‌های گیاه یونجه را القا نمودند. درصد القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه یونجه، از ۱۱/۱ تا ۶۶/۷ درصد متغیر بود. در ریزنمونه‌های برگ، بیشترین درصد القای ریشه مویین (۶۶/۷ درصد)، در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز بود. این در حالی است که در رابطه با ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، سویه‌های A4 و A13 به طور مشترک بالاترین درصد القای ریشه مویین (۳۳/۳ درصد) را به خود اختصاص دادند. در هر دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل، کمترین درصد القای ریشه مویین در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی ۳۱۸ مشاهده گردید (شکل ۱).

جدول ۳- اثر نوع ریزنمونه بر تولید ریشه‌های مویین در یونجه

Table 2. Effect of explant type on hairy root production in Alfalfa

میانگین $\pm$ خطای استاندارد				
نوع ریزنمونه	درصد القای ریشه مویین	تعداد ریشه مویین در ریزنمونه	طول ریشه مویین (سانتی‌متر)	وزن خشک ریشه مویین (گرم)
هیپوکوتیل	۲۴/۹۹ $\pm$ ۲/۸۶ b	۱/۴۲ $\pm$ ۰/۰۸ b	۱/۹۴ $\pm$ ۰/۲۱ b	۰/۰۲۲ $\pm$ ۰/۰۰۲ b
برگ	۵۰/۰۰ $\pm$ ۳/۸۵ a	۳/۶۷ $\pm$ ۰/۳۸ a	۱۱/۳۳ $\pm$ ۱/۹۶ a	۰/۰۷۰ $\pm$ ۰/۰۲۳ a

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک باشند، مطابق آزمون LSD ($P \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوژنز بر درصد القای ریشه مویین

Figure 1. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots induction percentage

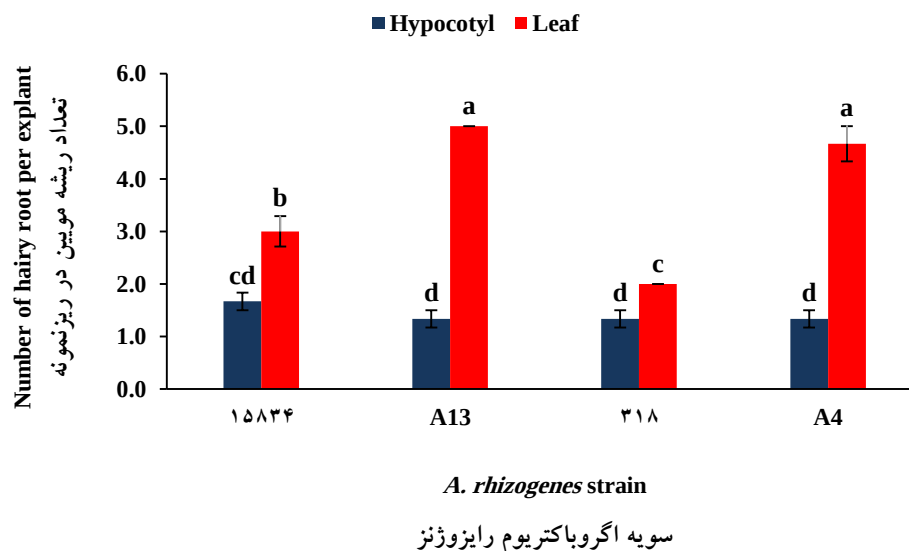
تعداد ریشه مویین در ریزنمونه

تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ به طور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بود (جدول ۳). سویه‌های باکتریایی A4 و A13 بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های برگ را تولید نمودند. کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه‌های

برگ، در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ تولید گردید. تفاوت معنی داری بین سویه های مختلف اگروباکتریوم رایزوزنز در رابطه با تعداد ریشه مویین در ریزنمونه های هیپوکوتیل وجود نداشت. سویه باکتریایی ۱۵۸۳۴ بیشترین و سویه های A4، ۳۱۸ و A13 به طور مشترک کمترین تعداد ریشه مویین در ریزنمونه را دارا بودند (شکل ۲).

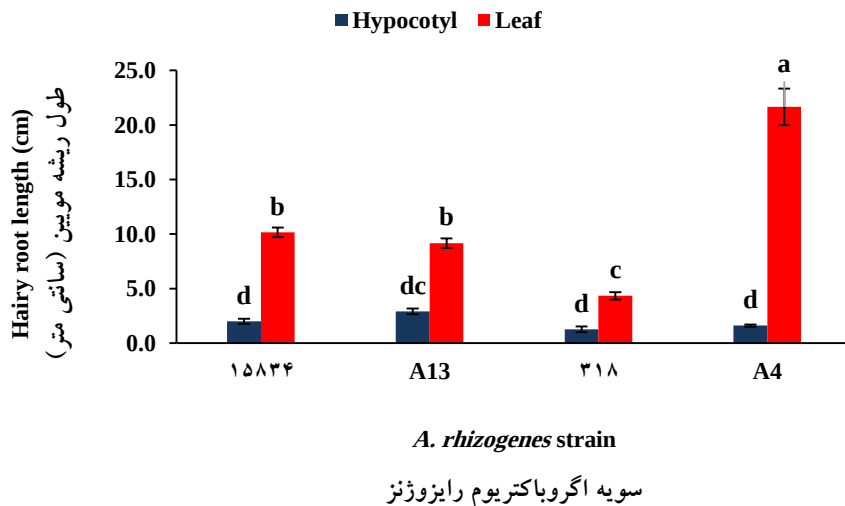
طول ریشه مویین

بر اساس نتایج مقایسات میانگین، طول ریشه های مویین تشکیل شده در ریزنمونه های برگ به طور قابل توجهی بیشتر از طول ریشه های مویین در ریزنمونه های هیپوکوتیل بود. میانگین طول ریشه مویین در ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل به ترتیب برابر با ۱۱/۳۳ و ۱/۹۴ سانتی متر ثبت گردید (جدول ۳). بیشترین طول ریشه مویین در ریزنمونه های برگ، در شرایط تلقیح با سویه باکتریایی A4 به دست آمد که به طور معنی داری بیشتر از سایر سویه های اگروباکتریوم رایزوزنز بود. کمترین طول ریشه مویین در ریزنمونه های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ مشاهده شد که با سایر سویه های باکتریایی مورد استفاده اختلاف معنی دار داشت. تفاوت معنی داری بین سویه های مختلف اگروباکتریوم رایزوزنز در رابطه با طول ریشه مویین در ریزنمونه های هیپوکوتیل وجود نداشت. سویه های باکتریایی A13 و ۳۱۸ به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین طول ریشه مویین را دارا بودند (شکل ۳).



شکل ۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوزنز بر تعداد ریشه مویین در ریزنمونه

Figure 2. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on number of hairy roots per explant

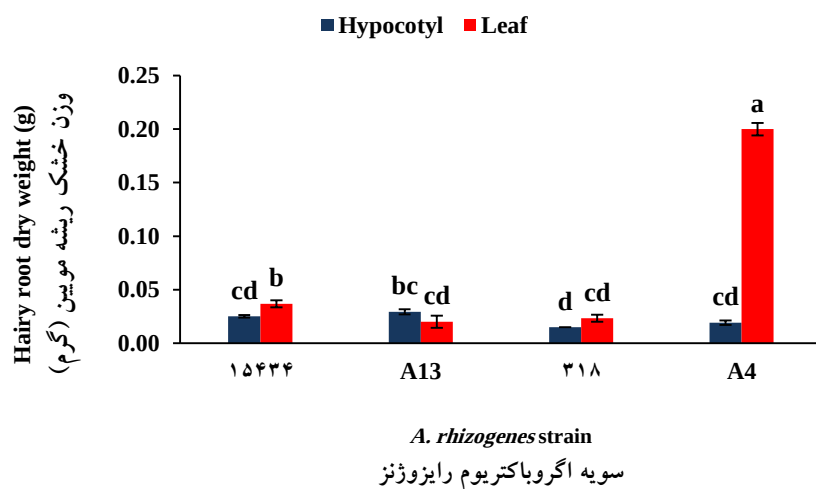


شکل ۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوزنز بر طول ریشه مویین

Figure 3. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots length

وزن خشک ریشه مویین

وزن خشک ریشه‌های مویین تولید شده در ریزنمونه‌های برگ، به طور معنی‌داری بیشتر از وزن خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بود (جدول ۳). بیشترین وزن خشک ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ، در شرایط تلقیح با سویه A4 به دست آمد که به طور قابل توجهی بیشتر از سایر سویه‌های باکتریایی بود. کمترین وزن خشک ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ نیز در شرایط تلقیح با سویه‌های باکتریایی A13 و ۳۱۸ تولید گردید. در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، بیشترین وزن خشک ریشه در شرایط تلقیح با سویه A13 و کمترین آن در شرایط تلقیح با سویه ۳۱۸ به دست آمد. تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های باکتریایی ۳۱۸، A4 و ۱۵۴۳۴ در رابطه با وزن خشک ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل وجود نداشت (شکل ۴)



شکل ۴- اثر متقابل نوع ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم رایزوزنز بر وزن خشک ریشه مویین

Figure 4. Interaction effect between explant type and *A. rhizogenes* strain on hairy roots dry weight

کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های موبین گیاه یونجه

نتایج ژل آگارز DNA استخراج شده از ریشه‌های موبین و ریشه‌های غیرتراریخت گیاه یونجه برای نمونه تزریق شده در هر چاهک، یک تک باند را نشان داد. همچنین تأیید تراریختی ریشه‌های موبین گیاه یونجه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و از تکنیک PCR صورت گرفت. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها، حضور ژن *rolB* (تکثیر قطعه مورد انتظار 430 bp) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های موبین را تأیید نمود (شکل ۵).



شکل ۵- الگوی الکتروفورز محصولات PCR (قطعه DNA به اندازه ۴۳۰bp) از ژن *rolB* اگروباکتریوم رایزوژنز

Figure 5. Electrophoresis pattern of PCR products (430 bp DNA fragment) of *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* gene

M: نشانگر 1Kb DNA Ladder؛ چاهک‌های ۱، ۲ و ۳: تکرار کلون‌های ریشه موبین باکتری A4؛ چاهک ۴: پلاسمید باکتری *A. rhizogenes* سویه A4 به عنوان کنترل مثبت؛ C: کنترل منفی (ریشه غیرتراریخت گیاه)؛ DNA1: ریشه طبیعی گیاه یونجه؛ DNA2: ژنوم استخراج شده از ریشه موبین
M: 1Kb DNA Ladder; 1, 2, 3: A4 strain hairy root clones; 4: *A. rhizogenes* plasmid A4 strain as positive control; C: Adventitious roots raised from non-transformed explant as negative control; DNA1: The natural root of the alfalfa plant; DNA2: Genome extracted from hairy roots

بحث

القای ریشه‌های موبین

موفقیت در القای ریشه موبین از طریق *A. rhizogenes* به عوامل مختلفی نظیر گونه، جنس و سن بافت گیاهی بستگی دارد (Bernousi et al., 2016). در این پژوهش، ریزنمونه‌های مختلف پاسخ متفاوتی از نظر تولید ریشه موبین نشان دادند.

ریزنمونه‌های برگ در رابطه با درصد القای ریشه مویین، تعداد ریشه مویین در ریزنمونه و میانگین طول ریشه مویین نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل برتر بودند. می‌توان اظهار داشت که بسته به گونه‌ی گیاهی، نوع ریزنمونه در القای ریشه‌های مویین تأثیرگذار است (Kabirnetaj *et al.*, 2012). در بررسی تولید ریشه‌های مویین در گیاه مریم نخودی طناز، برگ و گره ساقه به ترتیب بهترین ریزنمونه‌ها به منظور القای ریشه مویین با فراوانی بالا بودند (Bernousi *et al.*, 2016). ارزیابی تولید ریشه‌های مویین با تلقیح ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون گیاهچه‌های تاتوره تماشایی توسط سویه‌های A4، A7 و ۱۵۸۳۴ اگروباکتریوم رایزوزنز، نشان داد که بیشترین و کم‌ترین ریشه مویین تراریخته به ترتیب مربوط به سویه A4 و ۱۵۸۳۴ بود. بهترین ریزنمونه جهت تولید ریشه مویین، با تلقیح برگ در سویه A4 و کوتیلدون در سویه A7 گزارش شد (Ghadermazi *et al.*, 2016). وابستگی القای ریشه مویین به نوع ریزنمونه در گونه‌های دیگر گیاهی نیز گزارش شده است (Gupta *et al.*, 2011; Samadi *et al.*, 2012; Md Setamam *et al.*, 2014). بررسی القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های ساقه سه رقم یونجه در شرایط تلقیح با سویه A4T اگروباکتریوم رایزوزنز نشان داد که درصد القای ریشه مویین در ارقام مختلف از ۴ تا ۹۴ درصد متغیر بود (Golds *et al.*, 1991).

سویه باکتری مورد استفاده و غلظت سوسپانسیون باکتری برای تلقیح از دیگر عوامل مؤثر در فرایند تراریختی است (Bernousi *et al.*, 2016). در پژوهش حاضر، سویه باکتریایی A4 بالاترین درصد القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل را به خود اختصاص داد. البته در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های A4 و A13 در رابطه با درصد القای ریشه مویین وجود نداشت. وجود تفاوت در سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم رایزوزنز، در مورد توانایی انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های یک گونه خاص و متعاقباً القای ریشه‌های مویین، که در این پژوهش نشان داده شد، در مطالعات زیادی به خوبی به اثبات رسیده است. در پژوهشی، استفاده از سویه باکتریایی LBA9402 منجر به تولید موفقیت‌آمیز ریشه‌های مویین در واریته WL-525HQ گیاه یونجه شد (Zhao *et al.*, 2022). بررسی القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه باریجه نشان داد که تنها سویه باکتریایی ۱۵۸۳۴ منجر به القای ریشه مویین گردید و تلقیح با سویه‌های A4، ۲۶۵۹ و ۱۷۲۴ حتی بعد از گذشت دو تا سه ماه پاسخ مناسبی نشان نداد (Montazeri *et al.*, 2014). گزارش شده است که سویه GMI9534 موفق به القای ریشه مویین در هیچ یک از ریزنمونه‌های گیاه مریم نخودی طناز نشده است، در حالی که سویه A13 منجر به القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ و گره ساقه گردیده است. وجود ۱۲ تکرار از توالی‌های القاء کننده T-DNA (T-DNA transfer stimulator sequences, TSS) در پلاسمید Ri سویه A13، دلیل قدرت تراریخت‌سازی بالای این سویه بیان شده است (Bernousi *et al.*, 2016).

تأیید مولکولی ریشه‌های مویین

ژن‌های *rolB* نقش مهمی در بروز فنوتیپ ریشه‌های مویین دارد و در صورت غیر فعال شدن آن، ریشه مویین تولید نخواهد شد (El-Esawi *et al.*, 2017). در این پژوهش، ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین با استفاده از ردیابی ژن *rolB* مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز حضور نوار ۴۳۰ bp مربوط به تکثیر ژن *rolB* را نشان داد که با نوار حاصل از شاهد مثبت (باکتری) هم‌اندازه بود، اما برای ریشه‌های غیرتراریخت نواری تکثیر نشد (شکل ۵). مشابه با نتایج پژوهش حاضر، تراریختی ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف گیاه کاسنی از طریق ردیابی ژن *rolB* تأیید گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR حضور نوار مربوط به ژن *rolB* اگر باکتریوم رایزوژنز را آشکار کرد که با نوار حاصل از پلاسمید باکتری یکسان بود (Fathi *et al.*, 2019).

نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوع ریزنمونه و سویه‌های اگر باکتریوم رایزوژنز تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. هر چهار سویه باکتریایی مورد استفاده منجر به القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه یونجه گردید. با این وجود، سویه باکتریایی A4 از کارآیی بیشتری در القای ریشه‌های مویین به ویژه در ریزنمونه برگ برخوردار بود. در شرایط استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های A13 و A4 در رابطه با درصد القای ریشه مویین وجود نداشت. سویه باکتریایی ۳۱۸ کمترین کارآیی تراریختی را در بین سویه‌های اگر باکتریوم رایزوژنز مورد استفاده دارا بود. با توجه به برتری قابل توجه ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل در رابطه با تولید ریشه‌های مویین، استفاده از ریزنمونه برگ همراه با سویه A4 اگر باکتریوم رایزوژنز جهت تولید ریشه‌های مویین در گیاه یونجه قابل توصیه است.

سپاسگزاری

در پایان نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی و سپاس خود را از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد فارسی بابت همکاری صمیمانه ایشان در تأمین سویه‌های باکتریایی مورد استفاده اعلام دارند.

References

- Al-Snafi, A.E., Khadem, H.S., Al-Saedy, H.A., Alqahtani, A.M., El-Saber Batiha, G. and Abolfazl, J.S. (2021). A review on *Medicago sativa*: A potential medicinal plant. International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive, 1(2): 22-33.
- Bernousi, I., Jafari, M. and Ahmadi Dizaji, J. (2016). Optimization of induction and hairy root culture establishment of *Teucrium chamaedrys* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(2): 364-280. (In Persian)
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62(3): 293-300.
- Ebrahimi, S., Zaker, A., Abrishamchi, P., Bahrami, A.R., Ganjeali, A. and Sodagar, N. (2017). Hairy root induction and secondary metabolite production in *Perovskia abrotanoides* Karel. Journal of Plant Process and Function, 6(20): 17-26.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.A. (1991). Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 19: 1349.
- El-Esawi, M.A., Elkelish, A., Elansary, H.O., Ali, H.M., Elshikh, M., Witczak, J. and Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. Oxidative medicine and cellular longevity, 2: 10-17.
- Fathi, R., Mohebodini, M. and Chamani, E. (2019). Hairy root induction in chicory for secondary metabolites production. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 8(1): 63-76. (In Persian)
- Ghadermazi, S., Masoud Tohidfar, M. and Miri, S.M. 2016. The Production of Hairy Roots from (*Datura innoxia* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* and Effects of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Biological Elicitors on Atropine and Scopolamine Content. Journal of Medicinal Plants, 16(10): 141-156. (In Persian)
- Golds, T.J., Lee, J.Y., Husnain, T., Ghose, T.K. and Davey, M.R. (1991). *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Transformation of the Forage Legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. Journal of Experimental Botany, 42(9): 1147-1157.
- Gupta, S.K., Liu, R.B., Liaw, S.Y., Chan, H.S. and Tsay, H.S. (2011). Enhanced tanshinone production in hairy roots of '*Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture. Botanical Study, 52(4): 435-443.
- Kabirnetaj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G.A. and Shokri, E. (2012). Optimization of hairy root culture establishment in chicory plants (*Cichorium intybus* L.) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. Iranian journal of agricultural biotechnology 4: 61-75. (In Persian)
- Khatodia, S. and Biswas, K. (2014). A comparative study of Hairy Root Culture induction efficiency in four medicinally important plants using *Agrobacterium rhizogenes*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(5): 625-633.
- Majumdar, S., Garai, S. and Jha, S. (2011). Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of *Bacopa saponins* in transformed calli and plants. Plant cell Reports, 30(5): 941-954.
- Md Setamam, N., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, Z. and Che Mohd Zain, C.R., (2014). Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of Capsicum species explants. BMC Research Notes, 7: 414. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-414>

- Moloudi, M.R., Hassanzadeh, K., Rouhani, S., Zandi, F., Ahmadi, A., Khalwatian, P., Rostami, A., Sheikh Esmaeili, F. and Izadpanah, E. (2014). Effect of chloroformic extract of *Cichorium intybus* on liver function tests and serum level of TNF- α in obstructive cholestasis in rat. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 19(4): 10-19. (In Persian)
- Monirifar, H., Moradiyan, P., Ahmadi, R. and Moghaddam, A. (2021). Identification of suitable alfalfa cultivars for deficit irrigation conditions in Tabriz plain. Journal of Agricultural Science, 30(4): 249-264. (In Persian)
- Montazeri, F., Omid, M., Khialparast, F. and Sabokdast, M. (2014). Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22(2): 251-260. (In Persian)
- Nourozi, E., Hosseini, B. and Hassani, A. (2014). A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum*. Biologia, 69(7): 870-879.
- Pirian, K., Piri, Kh. and Ghiyasvand, T. (2012). Hairy roots induction from *Protulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradenaline, s production. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3(3): 642-649.
- Raei, M., Esna-Ashari, M. and Khodayari, M. (2017). Abiotic Elicitors and Medicinal Plants Biotechnology. Journal of Cell & Tissue, 7(4): 333-343. (In Persian)
- Samadi, A., Carapetian, J., Heidary, R., Gafari, M. and Hssanzadeh, A. (2012). Hairy root induction in *Linum mucronatum* ssp. mucronatum, an anti-tumor lignans production plant. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(1): 125-131.
- Servatyari, K., Ahmadi, A., Kashefi, H., Menbari, M.N., Rostami, A. and Moloudi M.R. (2017). The effect of hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* on liver function tests, blood biochemical factors and coagulation system in male rats. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 21: 16-26. (In Persian)
- Sharafi, A., Hashemisohi, H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, Kh. and Otang Nuti, V. (2013). A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113: 1-9.
- Sharifi, S., Nejad Sattari, T., Zebarjadi, A., Majd, A. and Ghasempour, H. (2014). The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and β -carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L.. Physiology and molecular biology of plants, 20(1): 69-80.
- Soleimani, T., Keyhanfar, M., Piri, K.H. and Hasanloo, T. (2012). Hairy root induction in Burdock (*Arctium lappa* L.). Journal of Medicinal Plants, 4(44): 176-185. (In Persian)
- Zhao, E.H., Xie, J.P., Zhang, Y.J., An, Y. and Zhou, P. (2022). Establishment and application of hairy root transformation system of alfalfa. Chinese Journal of Grassland, 44: 1-9.

Effect of *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction in Different Explants of Alfalfa

E. Mirzaie Delbari¹, J. Vatandoost², M. Jami Moeini^{3*}, E. Kohan-Baghkheirati⁴

Received: 2022.05.21

Accepted: 2022.06.25

Abstract

Introduction: -mediated transformation is an efficient technology for induction of hairy roots in plants. In the present study, the effect of *Agrobacterium rhizogenes* strains and explant type on hairy root induction in alfalfa was investigated.

Methods: A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in Islamic Azad University, Sabzevar Branch. The studied factors were *Agrobacterium rhizogenes* strains at four levels (A13, 318, 15834 and A4) and explant type at two levels (trifoliolate leaf and hypocotyl).

Results and discussion: The highest percentage of hairy root induction was obtained in leaf explants inoculated with bacterial strain A4, which was significantly higher than other strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Inoculation with bacterial strain 318 caused the least induction of hairy roots in leaf explants and hypocotyl. Bacterial strains A13 and 15834 produced the highest number of hairy roots per leaf and hypocotyl explants, respectively. The lowest number of hairy roots in leaf explants was produced under inoculation with 318 strain. The highest and lowest hairy root length in leaf explants, were observed under inoculation with bacterial strains A4 and 318, respectively. In hypocotyl explants, there was no significant difference between strains of *Agrobacterium rhizogenes* in terms of number and length of hairy roots. The results of separation of PCR products using gel electrophoresis, confirmed the presence of *rolB* gene in the genome of hairy root cells. According to the results, inoculation of leaf explants with A4 strain of *Agrobacterium rhizogenes* is recommended to produce hairy roots in alfalfa.

Keywords: Bacterial strain, Explant, Hypocotyl, Plasmid, Transformation

1. Ph.D. student in Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

3. Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
(Corresponding author: mat_jami@iaus.ac.ir)

4. Assistant professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) و

بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه

شیدا نظرپور^۱، مریم محمدی سیچانی^{۲*}، منیره رنجبر^۳

چکیده

مقدمه: امروزه باکتری‌های اندوفیت محرک رشد به عنوان کود زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گیاه گلرنگ و بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه بود. سویه‌های اندوفیتی از ریشه گلرنگ جداسازی شدند و توانایی تولید اکسین و حل‌کنندگی فسفات آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روشها: اثر جدایه‌های منتخب در دو غلظت $1/5 \times 10^5$ و $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) بر روی جوانه‌زنی بذر گلرنگ و رشد آن مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثر ضدقارچی جدایه‌های اندوفیتی با روش پورپلیت ارزیابی شد.

نتایج: باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas fluorescence*، *Pseudomonas corrugata* NMR، *Micrococcus luteus* NMR، *Bacillus megaterium* NMR و *Pseudomonas brassicacearum* NMR از ریشه گلرنگ جدا شدند. در تیمار با سویه *Bacillus megaterium* NMR، میانگین بذرهای جوانه‌زده هنگام تماس با غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu/ml)، نسبت به هنگام تماس با غلظت $1/5 \times 10^8$ cfu/ml، به طور معناداری بیشتر بود. طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در گروه شاهد نسبت به گروه تیمار به طور معناداری کمتر بود. ارتباط مستقیمی بین مقدار اکسین تولیدی جدایه‌های اندوفیتی و توانایی حل‌الیت فسفات آن‌ها با افزایش طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تعداد بذرهای جوانه‌زده گلرنگ وجود داشت. ایزوله *Pseudomonas brassicacearum* NMR هر چهار نوع آنزیم پکتیناز، آمیلاز، پروتئاز و زایلاناز را تولید کرد. نتایج نشان داد ایزوله *Pseudomonas fluorescence* NMR رشد *Aspergillus niger* را به میزان $30/76$ درصد مهار کرد.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول : mohamadi_m@iaufala.ac.ir)
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

نتیجه‌گیری: باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده در تحقیق حاضر به دلیل قابلیت تولید اکسین و حل‌الیت فسفات و تأثیر مستقیم آن‌ها بر فاکتورهای رشد گلرنگ، به عنوان عوامل محرک رشد پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، ریشه گیاه، فعالیت ضدقارچی، گلرنگ

مقدمه

گیاه گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius* L. یکی از گیاهان خانواده کاسنی‌ها (*Asteraceae*) است. دانه‌های گلرنگ دارای ۲۵ تا ۴۰ درصد روغن و حدود ۲۰ درصد پروتئین هستند. روغن این گیاه در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی از کیفیت بالایی برخوردار است. گلرنگ از گیاهان روغنی است و مصارف صنعتی، دارویی و غذایی دارد. این گیاه را می‌توان در شرایط دیم مناطق مختلف کشور ایران کشت داد. گونه‌های وحشی گلرنگ در مناطق مختلف ایران دیده شده‌اند. ارقام بومی و خارجی گلرنگ از نظر عملکرد دانه، زودرسی، رنگ و شکل گل، تنوع ژنتیکی بسیاری دارند. گلرنگ یک گیاه زراعی مناسب جهت کشت در آب و هوای خشک و زمین‌های نسبتاً شور است و به همین دلیل در بسیاری از نقاط گرم مرکزی و جنوبی کشور ایران بصورت کشت پاییزه و در مناطق سردسیر به صورت کشت بهاره کاشته می‌شود (Turgumbayeva et al., 2018, Chakradhari et al., 2020).

باکتری‌های محرک رشد گیاه، گروه وسیعی از باکتری‌هایی هستند که در ریزوسفر گیاهان حضور دارند و از راه‌های مختلف سبب افزایش و تحریک رشد گیاه می‌شوند (Santoyo et al., 2016). گروهی از این باکتری‌ها به نام اندوفیت‌ها وارد بافت‌های داخلی گیاه می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها بدون ایجاد آسیب‌های ظاهری و آشکار، در فضای خارج یا داخل سلول‌های گیاهی رشد می‌کنند. در این نوع ارتباط، زندگی متعادلی بین گیاه و باکتری‌های اندوفیت فراهم می‌گردد. باکتری‌های اندوفیت با تولید هورمون‌های گیاهی محرک رشد مثل ایندول استیک‌اسید و یا ممانعت از تولید هورمون‌های گیاهی ممانعت‌کننده از رشد، مثل اتیلن به رشد گیاه میزبان کمک می‌کنند (Fouda et al., 2021). باکتری‌های اندوفیت در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علائم و آسیب حضور دارند و تخمین صحیح جمعیت آن‌ها مشکل است. باکتری‌های اندوفیت ابتدا سطح ریشه را آلوده نموده و پس از نفوذ درون بافت‌های گیاه در آن‌ها مستقر می‌شوند. اکثر باکتری‌های اندوفیت در فضای بین‌سلولی جایگزین می‌شوند ولی تعداد معدودی از آن‌ها قادرند به درون سلول‌ها نیز نفوذ کنند (Sun et al., 2016). کاربرد باکتری‌های اندوفیت به عنوان کودهای زیستی کاربرد مفیدی از این باکتری‌ها در کشاورزی ایجاد کرده است (Orozco-Mosqueda et al., 2021). مطالعات مختلفی در مورد تأثیر باکتری‌های اندوفیتی بر روی افزایش عملکرد گیاه میزبان از طریق تولید هورمون‌های رشد اکسین و جیبرلین، انحلال فسفات، تثبیت ازت، تولید سیدروفور، توانایی کنترل زیستی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های

غیرزیستی و زیستی در حال اجراست (Gamalero *et al.*, 2020). مطالعات نشان داده‌اند که اغلب اندوفیت‌های گیاهی رشد و تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند. در تحقیقی بر روی اندوفیت‌های باکتریایی سه گیاه مهم اقتصادی مانند سورگوم، خیار و گوجه فرنگی در سه منطقه مختلف با درجه شوری متفاوت سویه‌ای از *Pseudomonas brassicacearum* را جداسازی کردند که توانایی تولید آنزیم آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلات دامیناز را داشت. این آنزیم در افزایش تحمل استرس در گیاهان نقش مهمی دارد (Gamalero *et al.*, 2020).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گیاه گلرنگ و بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه گلرنگ به عنوان یک گیاه استراتژیک و همچنین ارزیابی اثر مهاری آن‌ها بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشه گلرنگ

در اواخر فصل بهار ۱۳۹۹ بیست عدد گیاه کامل گلرنگ رقم صفه اصفهان از زمین‌های کشاورزی شمال اصفهان جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه منتقل گردید. بخش‌هایی از ریشه شستشو داده شده گلرنگ توسط اسکالپل استریل به قطعات ۲ تا ۳ سانتی‌متری برش داده شد و ۳ بار با آب مقطر شسته شدند. قطعات ریشه ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد غوطه‌ور شدند تا باکتری‌های سطحی ریشه کاملاً حذف شوند. سپس برای حذف اثر مواد ضد عفونی‌کننده قطعات ریشه ۵ بار در آب مقطر استریل آبکشی شدند. قطعات ریشه به یک هاون استریل منتقل شده و به طور کامل له شدند. مایع مترشحه و بافت له شده ریشه در محیط کشت نوترینت برات کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت به منظور دستیابی به کلنی‌های مجزا نمونه‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار به روش خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Duan *et al.*, 2013, Khan *et al.*, 2020).

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های اندوفیتی

خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها روی محیط نوترینت آگار مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه لام مستقیم، با توجه به نتیجه واکنش گرم هر جدایه، از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، اکسیداز، MR، VP، SIM، OF، TSI و اوره‌آز برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد (Nahon *et al.*, 2015).

غربالگری جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

آزمون فعالیت اکسین: مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB-T درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع و در اتوکلاو استریل گردید. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه هر جدایه به ارلن تلقیح گردید. ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی (Salkowski Reagent) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. رنگ تولید شده به روش طیف‌سنجی در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. مقادیر جذب قرائت شده با منحنی استاندارد اندول استیک اسید مقایسه و مقدار اکسین تولیدشده توسط هر جدایه محاسبه و ثبت شد (Glickmann & Dessaux, 1995, Torres-Rubio et al., 2000).

آزمون انحلال فسفات: مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر مایع اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس در شیکر با ۱۳۸ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از ۵ روز سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات و انادات مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه شدت جذب نور با استفاده از روش طیف‌سنجی در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه گردید (Alikhani et al., 2006, Sharma et al., 2013).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب با تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. مخلوط PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانو گرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (۵ Pmol/μl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمرز (۱/۲۵ U/μl) و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برای شناسایی باکتری‌ها از آغازگرهای ۲۷F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و ۱۴۹۲R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده شد. دستگاه ترموسایکلر (اپندورف-آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ویرایش شدن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (Sogandi & Nilasari, 2019). پس از بررسی کیفیت محصول PCR

بر روی ژل، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت رویان زیست ژن ارسال شد. نتایج تعیین توالی توسط نرم افزار Chromas بررسی گردید و به کمک سرور BLAST در پایگاه NCBI ارزیابی و گونه های منسوب جدایه ها شناسایی شدند (Suhandono *et al.*, 2016).

بررسی فعالیت آنزیم های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز، پروتئاز جدایه های انتخاب شده

فعالیت آنزیم های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز و پروتئاز در جدایه های انتخاب شده در محیط های کشت پایه لوریا برتانی آگار حاوی به ترتیب ۱ درصد سوبسترای پکتین، زایلان، نشاسته و کازئین بررسی شد. هر یک جدایه ها به مدت ۱ هفته در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد در کنار هر یک از سوبستراها اینکوبه شدند. فعالیت آنزیم پکتیناز، آمیلاز و پروتئاز با اضافه کردن معرف لوگل بر روی محیط کشت و مشاهده هاله روشن ارزیابی شد. فعالیت آنزیم زایلاناز نیز با محلول ۱ درصد کنگورد بررسی گردید (Amore *et al.*, 2015, Bhange *et al.*, 2016).

اثر باکتری های اندوفیت جدا شده از گلرنگ بر درصد جوانه زنی بذر و رشد گیاه

بذرهای گلرنگ رقم صفه اصفهان با درصد خلوص ۹۹ درصد و قوه نامیه ۸۰ درصد از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها قبل از انجام آزمایش به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند. سپس با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردید و ۵ بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

تیمار بذرهای گلرنگ با باکتری های اندوفیت به روش کشت بذر در گلدان انجام شد. گلدان ها با مخلوطی از کوکوپیت، پیت ماس و خاک معمولی استریل مناسب رشد گیاه آماده و نشانه گذاری شدند. در هر گلدان ۲۰ عدد بذر استریل شده در عمق ۰/۵ سانتی متری خاک قرار داده شد. هر گلدان با مخلوطی از ۴ میلی لیتر سوسپانسیون جدایه اندوفیتی و ۶ میلی لیتر آب آبیاری شد. این آزمایش با دو غلظت $1/5 \times 10^8$ و $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی لیتر و با ۶ جدایه اندوفیتی و با سه بار تکرار انجام گردید. گلدان شاهد با ۱۰ میلی لیتر آب آبیاری گردید. آبیاری دو روز در میان و با خشک شدن سطح خاک انجام گردید. گلدان ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. نگهداری از گلدان ها به مدت ۲۱ روز ادامه یافت. شمارش بذور جوانه زده به صورت روزانه و در ساعت معینی از روز انجام گرفت. در آخرین روز شمارش، گیاهچه های درون هر گلدان جهت اندازه گیری طول ریشه چه و ساقه چه خارج شدند (Walitang *et al.*, 2017).

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها

اثر مهارکننده ۵ جدایه منتخب از باکتری‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ بر روی *Aspergillus niger* (ATCC: 9142) و *Alternaria alternata* (PTCC: 5224) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها به روش غذای سمی ارزیابی شد. میزان ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت $10^8 \times 1/5$ از هر جدایه به ۱۵ محیط کشت PDA مذاب با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و پس از مخلوط شدن به پلیت استریل منتقل شد. از محیط کشت PDA ساده به عنوان شاهد استفاده شد. هر یک از نمونه‌های قارچ به صورت یک نقطه در وسط محیط کشت‌های PDA ساده و محیط PDA حاوی سوسپانسیون جدایه‌ها تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، قطر ناحیه رشد قارچ‌ها در همه محیط‌های کشت اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها به کمک رابطه $(DC - DS) / DC \times 100$ محاسبه گردید. در این رابطه DC، قطر ناحیه رشد قارچ در محیط شاهد و DS، قطر ناحیه رشد قارچ در محیط کشت حاوی سوسپانسیون باکتری بود (Balouiri et al., 2016, Bolivar-Anillo et al., 2021).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با $P=0/5$ انجام شد.

یافته‌ها

بر روی محیط کشت آگار غذایی و محیط کشت PDA، ۵ جدایه متفاوت رشد کردند. بر حسب نتایج حاصل از واکنش گرم، تست‌های بیوشیمیایی شامل اکسیداز، کاتالاز، تخمیر قند در TSI، هیدرولیز اوره، مصرف سیتрат، MR، VP، تولید H_2S ، تولید اندول، حرکت و OF بر روی ۵ جدایه انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گلرنگ به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی

Table 2 -

ردیف	نام جدایه	اکسیداز	کاتالاز	TSI	اوره	سیترات	MR	VP	اندول	H_2S	حرکت	OF
۱	A	-	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*
۲	C	+	+	K/K	-	-	+	-	-	-	+	+/-
۳	H	+	+	K/K	-	-	+	+	-	-	+	+/-
۴	J	+	+	K/K	-	-	+	-	-	-	+	+/-
۵	K	-	+	A/A	-	-	+	-	-	-	+	*

*آزمون انجام نشده است.

نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی قطعه تکثیرشده انجام شد. توالی تکثیر شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم‌افزار BLAST مقایسه شد. جدایه‌های شناسایی شده در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۲).



جدول ۲- جدایه‌های شناسایی شده طبق توالی‌های مشابه در پایگاه NCBI

Table 2-

شماره دسترسی در بانک ژن	درصد هم‌پوشانی	درصد مشابهت	نام جدایه	جدایه
MT912852	۱۰۰	۹۹/۷	<i>Micrococcus luteus</i> NMR	A
MT912854	۱۰۰	۹۹/۶	<i>Pseudomonas corrugata</i> NMR	C
MT916774	۱۰۰	۹۹/۵	<i>Pseudomonas fluorescence</i> NMR	H
MT912918	۱۰۰	۹۸/۱	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> NMR	J
MT912853	۱۰۰	۱۰۰	<i>Bacillus megaterium</i> NMR	K

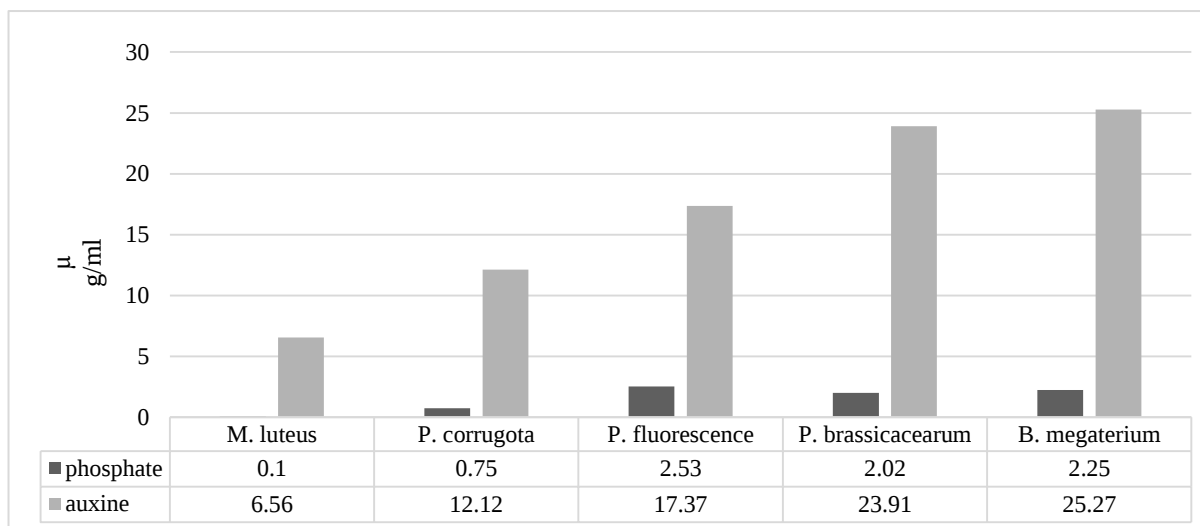
نتایج بررسی تولید اکسین و میزان انحلال فسفات جدایه‌ها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان تولید اکسین در بین ۵ جدایه اندوفیتی مورد آزمایش اختلاف معناداری داشت ($P < 0/01$). مقدار تولید اکسین در جدایه *B. megaterium* NMR و *P. brassicacearum* NMR بیشتر از سایر جدایه‌ها و به ترتیب ۲۵/۲۷ و ۲۳/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. حدود نیمی از جدایه‌ها نیز مقادیر متوسطی اکسین تولید کردند (شکل ۱).

همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان انحلال فسفات در بین ۵ جدایه اندوفیتی مورد آزمایش اختلاف معناداری دارد ($P < 0/01$). مقدار انحلال فسفات در جدایه‌های *B. megaterium* NMR، *P. fluorescence* NMR و *P. brassicacearum* NMR بیشتر از سایر جدایه‌ها و به ترتیب ۲/۲۵، ۲/۵۳ و ۲/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل ۱).

شکل ۱- میزان تولید اکسین و حلالت فسفات در جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

Figure 1.



فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز و پروتئاز در ۵ جدایه اندوفیتی ریشه گلرنگ متفاوت بود. فعالیت آنزیمی این جدایه-

ها در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- بررسی فعالیت آنزیمی در جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

Table 3.

فعالیت آنزیمی				جدایه
پروتئاز	آمیلاز	زایلاناز	پکتیناز	
+	-	+	-	<i>Micrococcus luteus</i> NMR
+	-	+	+	<i>Pseudomonas corrugota</i> NMR
-	+	+	+	<i>Pseudomonas fluorescence</i> NMR
+	+	+	+	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> NMR
+	+	-	-	<i>Bacillus megaterium</i> NMR

نتایج تأثیر تیمار با دو غلظت مختلف جدایه‌های اندوفیتی بر جوانه‌زنی بذر، طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه گلرنگ

میانگین درصد بذره‌های جوانه‌زده در گروه شاهد برابر $5/8 \pm 48/3$ درصد، گروه بذره‌های تیمار شده با غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر برابر $12/4 \pm 52/0$ درصد و گروه بذره‌های تیمار شده با غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر $44/7 \pm 15/8$ درصد بدست آمد. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری تفاوت معناداری بین میانگین تعداد بذره‌های جوانه‌زده بین گروه‌های تیمار شده با دو غلظت مختلف از سوسپانسیون‌های باکتریایی و گروه شاهد مشاهده نشد ($p=0/582$ آزمون کراسکال والیس). همچنین میانگین بذره‌های جوانه‌زده در تیمار با دو غلظت $1/5 \times 10^8$ و $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر جدایه‌های *M. luteus* NMR، *P. brassicacearum* NMR، *P. fluorescence* NMR و *P. corrugota* NMR تفاوت معناداری نشان نداد ($p>0/05$ آزمون تی مستقل)، ولی در جدایه *B. megaterium* NMR میانگین بذره‌های جوانه‌زده در تیمار با غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود ($p=0/001$) (جدول ۴).

جدول ۴- درصد جوانه‌زنی بذر، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در تیمار با دو غلظت مختلف از جدایه‌های اندوفیت

جدایه‌ها	غلظت (cfu/ml)	درصد جوانه‌زنی بذر	طول ساقه‌چه (mm)	مقدار P	طول ریشه‌چه (mm)	مقدار P
<i>M. luteus</i> NMR	$1/5 \times 10^5$	$43/3 \pm 11/6$	$5/8 \pm 3/9$	0/328	$10/7 \pm 3/6$	0/001
	$1/5 \times 10^8$	$53/3 \pm 10/4$	$29/2 \pm 5/8$		$18/8 \pm 7/7$	
<i>P. corrugota</i> NMR	$1/5 \times 10^5$	$66/7 \pm 11/6$	$36/2 \pm 5/1$	0/083	$21/4 \pm 7/6$	0/004
	$1/5 \times 10^8$	$50/0 \pm 5/0$	$19/9 \pm 2/8$		$15/3 \pm 4/7$	
<i>P. fluorescence</i> NMR	$1/5 \times 10^5$	$41/7 \pm 4/9$	$17/3 \pm 9/6$	0/609	$14/2 \pm 1/6$	0/201
	$1/5 \times 10^8$	$45/0 \pm 10/0$	$23/8 \pm 6/3$		$16/7 \pm 5/0$	
<i>P. brassicacearum</i> NMR	$1/5 \times 10^5$	$51/7 \pm 12/6$	$30/2 \pm 5/2$	0/566	$17/0 \pm 5/7$	0/514
	$1/5 \times 10^8$	$56/7 \pm 5/7$	$20/6 \pm 6/3$		$15/7 \pm 4/4$	
<i>B. megaterium</i> NMR	$1/5 \times 10^5$	$56/7 \pm 2/9$	$10/4 \pm 3/5$	0/001	$12/3 \pm 3/7$	0/390
	$1/5 \times 10^8$	$18/2 \pm 7/6$	$14/8 \pm 4/1$		$14/1 \pm 4/9$	
شاهد	$48/3 \pm 5/7$	0/582	$11/4 \pm 3/1$	0/29	$9/5 \pm 4/7$	0/001

ریشه گلرنگ (میانگین $\pm$ SD)

میانگین طول ساقه‌چه در گروه شاهد برابر $7/0 \pm 11/36$ ، گروه تیمار با غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر $23/48 \pm 1/7$ و گروه تیمار با غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر $23/3 \pm 15/0$ درصد بدست آمد. آزمون‌های آماری نشان داد طول ساقه‌چه در گروه شاهد نسبت به هر دو گروه تیمار $1/5 \times 10^5$ و $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر به طور معناداری کمتر بود ($P < 0/05$) آزمون تعقیبی من‌ویتنی). بر اساس نتایج، میانگین طول ساقه‌چه در هر دو غلظت تیمار با جدایه‌های *P. brassicacearum* NMR و *B. megaterium* NMR تفاوت معناداری نشان نداد ($p > 0/05$ آزمون تی‌مستقل). در تیمار با جدایه‌های *Micrococcus luteus* ($p < 0/001$ آزمون تی‌مستقل) و *P. fluorescence* NMR ($p = 0/011$) میانگین طول ساقه‌چه در غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود و در جدایه *P. corrugata* NMR میانگین طول ساقه‌چه در تیمار با غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری کمتر بود ($p = 0/001$) (جدول ۳).

میانگین طول ریشه‌چه در گروه شاهد $4/7 \pm 9/5$ میلی‌متر، گروه تیمار شده با غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر $6/7 \pm 16/33$ میلی‌متر و گروه تیمار شده با غلظت $1/5 \times 10^8$ ، $5/7 \pm 16/2$ میلی‌متر بود. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری طول ریشه‌چه در گروه شاهد نسبت به گروه‌های تیمار شده با دو غلظت $1/5 \times 10^5$ و $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر از جدایه‌ها به طور معناداری کمتر بوده است ($P < 0/05$ آزمون تعقیبی من‌ویتنی). آزمون‌های آماری بین میانگین طول ریشه‌چه در تیمار با جدایه‌های *P. brassicacearum* NMR، *B. megaterium* NMR و *P. fluorescence* NMR تفاوت معناداری بین دو غلظت $1/5 \times 10^5$ و $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر نشان نداد ($p > 0/05$ آزمون تی‌مستقل). در تیمار با جدایه *M. luteus* NMR میانگین طول ریشه‌چه در غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود ($p = 0/001$). در تیمار با جدایه *P. corrugata* NMR میانگین طول ریشه‌چه در تیمار با غلظت $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $1/5 \times 10^5$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری کمتر بود ($p = 0/004$) (جدول ۳).

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

هیچ یک از جدایه‌های اندوفیت ریشه گلرنگ اثر بازدارندگی روی رشد قارچ *Alternaria alternata* نداشتند. دو جدایه اندوفیت *P. fluorescence* NMR و *P. corrugata* NMR در برابر قارچ *Aspergillus niger* فعالیت ضدقارچی از خود نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رشد *Aspergillus niger* توسط جدایه *P. fluorescence* NMR $30/76$ درصد و در جدایه *P. corrugata* NMR $15/38$ درصد بدست آمد.

بحث

در سال‌های اخیر باکتری‌های اندوفیت به دلیل توانایی مهاجرت به درون گیاهان و عدم ایجاد علائم بیماری، به عنوان عوامل محرک رشد و بیوکنترل اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. اندوفیت‌ها به دلیل تولید مواد ضدباکتریایی، ضدقارچی، القای مقاومت و حفاظت بهتر از بافت‌های گیاهی، در مقایسه با میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت، مزایای بیشتری به عنوان محرک رشد و عوامل بیوکنترل دارند. بررسی‌های انجام شده روی توانایی القای رشد گیاهان توسط باکتری‌های مختلف ریزوسفر نشان داده است که اثر اندوفیت‌ها روی افزایش رشد گیاه متفاوت است (Yousefi et al., 2017; Bahmani et al., 2018). برخی از سویه‌های اندوفیت که به عنوان عامل کنترل بیولوژیک میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی به کار رفته‌اند، توانسته‌اند از راه بهبود گردش مواد معدنی از جمله نیتروژن، فسفات و دیگر مواد معدنی و تولید ایندول اسید استیک، سیدروفور و تأمین ویتامین‌های ضروری گیاهان سبب افزایش رشد گیاه شوند. افزون بر این، شماری دیگر از اثرات مفید روی رشد گیاهان از جمله تنظیم فشاراسمزی، تنظیم روزه، بهسازی مورفولوژی ریشه، افزایش جذب مواد معدنی و تغییر تجمع نیتروژن و تنظیم سوخت و ساز به اندوفیت‌ها نسبت داده می‌شود (Fadiji & Babalola, 2020). با توجه به اثراتی که اندوفیت‌های گیاهی در تحریک رشد گیاه، فراهم کردن عناصر ضروری آن و حذف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی دارند تحقیق و شناسایی این باکتری‌ها در مورد گیاه گلرنگ به عنوان گیاهی با ارزش اقتصادی بالا ضروری به نظر می‌رسد.

در این مطالعه اندوفیت‌های جدا شده از ریشه گیاه گلرنگ مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند که در نتیجه، ۵ سویه مختلف وابسته به جنس‌های *Micrococcus*، *Bacillus* و *Pseudomonas* جداسازی شدند. از بین این سویه‌ها، سویه *Bacillus megaterium* NMR بیشترین میزان تولید اکسین (۲۵/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سویه *Pseudomonas fluorescence* NMR بیشترین میزان حلالیت فسفات (۲/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان دادند (Liu et al., 2017). در مطالعه‌ای چهار باکتری اندوفیت شامل *Micrococcus luteus*، *Bacillus megaterium*، *Pseudomonas chlororaphis* و *Pseudomonas fluorescence* از گلرنگ جدا کردند. میزان تولید اکسین در هر باکتری به ترتیب برابر با ۱۵/۳، ۳۰/۶، ۲۲/۴۸ و ۱۹/۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Singh & Dubey, 2018). یافته‌های این طرح در بالاترین میزان تولید اکسین با یافته‌های طرح حاضر در جنس *Bacillus* مشابهت دارد. Reyad و همکاران دو باکتری اندوفیت متعلق به گونه‌های *Bacillus cereus* و *Bacillus aerius* را از برگ و ساقه گیاه گلرنگ جداسازی کردند و جدایه‌ها را از طریق تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی کردند. رشد گیاه از طریق تعیین وزن خشک و مقایسه با وزن خشک گیاه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری‌ها علاوه بر تحریک رشد گیاه، موجب افزایش مقاومت گیاه نسبت به شوری (NaCl تا غلظت میلی‌مول در لیتر) شدند. وجود کلرید سدیم منجر به افزایش رشد گیاه و ترکیب شیمیایی آن در مقایسه با گروه شاهد تلقیح نشده با اندوفیت‌ها گردید. نهال آبیاری شده با غلظت‌های مختلف NaCl کاهش قابل توجهی در تولید اکسین و جیبرلیک اسید نشان داد، در حالی که میزان اتانول در این نهال به طور قابل توجهی در مقایسه

با شاهد افزایش یافت. تلقیح سویه‌های اندوفیت توانایی دستیابی به تحمل سیستمیک را از طریق تولید آنزیم ۱- آمینو سیکلوپروپان ۱- کربوکسیلاز دآمیناز داشتند که موجب کاهش تولید هورمون استرس‌زای اتیلن می‌شود (Reyad et al., 2017). نتایج این مطالعه در راستای مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش رشد گیاه گلرنگ با تلقیح سویه‌های اندوفیت، از طریق تولید هورمون‌های محرک رشد است. Naserzadeh و همکاران (۲۰۱۸) به طور موفقیت‌آمیزی اثرات تقویت کننده رشد سه سویه *Pseudomonas fluorescence* را بر روی عملکرد تولید و برخی از صفات رشد رویشی گیاه گلرنگ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ایلام مشاهده کردند. گیاهان تلقیح شده با باکتری‌ها از نظر خصوصیات قطر ساقه، تعداد شاخه اولیه، شاخص سطح برگ، زیست توده خشک، میزان تولید دانه، درصد روغن بذر و وزن بذر نسبت به گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد، برتر بودند (Naserzadeh et al., 2018). در مطالعه حاضر نیز بیشترین فراوانی باکتری‌های محرک رشد متعلق به جنس *Pseudomonas* بود. Lack و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر باکتری‌های *Azotobacter chroococcum*، *Azospirillum brasilense* و *Pseudomonas fluorescence* و همچنین کنسرسیون‌های دوتایی این باکتری‌ها را بر روی خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و تولید گیاه گلرنگ مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر تلقیح باکتری بر عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته و تعداد گره در بوته در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (Lack et al., 2013). در این مطالعه و همچنین تحقیق Naserzadeh و همکاران از سویه‌هایی استفاده شده است که بطور طبیعی اندوفیت گیاه گلرنگ نبوده‌اند، درحالی که در مطالعه حاضر سویه‌های مورد استفاده به دلیل جداسازی از ریشه گیاه می‌توانند سازگاری بیشتری با شرایط رشدی گیاه گلرنگ داشته باشند.

در این پژوهش نتایج محاسبه ضریب همبستگی اسپیرمن نشان داد که ارتباط مستقیمی بین مقدار اکسین و مقدار حلالیت فسفات بر روی طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه وجود داشت. Hardoim و همکاران در پژوهشی به بررسی تأثیر باکتری‌های اندوفیت جدا شده از برگ گیاه گلرنگ بر رشد اندام این گیاه پرداختند. *Enterobacter*، *Pseudomonas* و *Micrococcus luteus* باکتری‌های اندوفیت جدا شده از برگ گیاه گلرنگ بودند و میزان تولید اکسین در هر سه باکتری به ترتیب برابر با ۲/۲۱، ۶/۳۰ و ۵۲/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. افزایش ۱۰ تا ۳۰ درصدی عملکرد گلرنگ در تلقیح باکتری‌ها را ناشی از باکتری *Pseudomonas* دانسته و این تأثیر مثبت را بیشتر به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین‌ها نسبت دادند (Hardoim et al., 2015). در پژوهش حاضر نیز افزایش میزان اکسین با رشد اندام گیاه گلرنگ رابطه مستقیم داشت. علت همخوانی نتایج این دو مطالعه را می‌توان به دلیل تولید بالای میزان اکسین توسط باکتری‌های اندوفیت جدا شده از اندام‌های مختلف گیاه گلرنگ دانست. در مطالعه‌ای باکتری *Erwinia* تأثیر معنی‌داری در افزایش طول اندام هوایی برنج در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد و باکتری *Staphylococcus* با اختلاف معنی‌دار باعث افزایش طول ریشه در مقایسه با سایر تیمارها شد. تأثیر اندوفیت‌ها بر مورفولوژی ساقه به واسطه تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین، جیبرلین و غیره است. برخی از فیتوهورمون‌هایی که توسط اندوفیت‌ها

تولید و ترشح می‌شوند باعث تغییر در مورفولوژی ریشه می‌گردند. به عنوان مثال اکسین باعث افزایش طول سلول‌ها، تحریک ریشه‌دهی و تحریک تقسیم سلول‌ها می‌شود (Dang et al., 2020). افزایش معنی‌داری در طول ریشه و ساقه گیاه تیمار شده با اندوفیت مشاهده شد. در تحقیق حاضر نیز جدایه‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* به دلیل تولید اکسین و توانایی انحلال فسفات رابطه مستقیمی در رشد ساقه‌چه، ریشه‌چه و بذر جوانه‌زده نشان دادند.

در مطالعه حاضر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescence* NMR ، *Bacillus megaterium* NMR ، *Micrococcus luteus* NMR و *brassicacearum* NMR به جز جدایه *Pseudomonas corrugata* NMR دارای فعالیت آنزیم پروتئازی بودند و هاله شفاف اطراف کلنی‌شان نشان داده شد. در فعالیت آنزیمی آمیلاز سه جدایه *Pseudomonas corrugata* NMR ، *Pseudomonas fluorescence* NMR و *Bacillus megaterium* NMR هاله شفاف اطراف کلنی ایجاد کردند. نتیجه تولید آنزیم پکتیناز در سویه‌های *Pseudomonas brassicacearum* NMR ، *Pseudomonas fluorescense* NMR و *Bacillus megaterium* NMR هاله شفاف اطراف کلنی بود و تولید آنزیم زایلاناز تمامی سویه‌ها به جز *Bacillus megaterium* NMR مثبت بود. Abdalla و McGaw به جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ساقه گیاه گلرنگ پرداختند. جنس *Pseudomonas* ، *Micrococcus luteus*، جنس *Staphylococcus* و *Bacillus sp.* باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ساقه گیاه گلرنگ بودند. هر چهار باکتری توانایی تولید آنزیم‌های آمیلاز، زایلاناز و پکتیناز را داشتند به طوری که تلقیح باکتری‌ها با افزایش تولید آنزیم منجر به افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه شد. میزان پتاسیم و گوگرد به عنوان عناصر پر مصرف دارای اهمیت بسیار زیادی بود و افزایش تولید آنزیم در گیاه تلقیح‌شده با باکتری‌های اندوفیت به تمامی مراحل رشد رویشی و زایشی آن کمک نمود (Abdalla & McGaw, 2018). نتایج دو طرح نشان می‌دهد که باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه گلرنگ توانایی فعالیت آنزیمی به میزان بالا را دارند.

در مورد فعالیت ضدقارچی جدایه‌های منتخب، طبق نتایج به دست آمده جدایه *Pseudomonas fluorescence* دارای ۳۰/۷۶ درصد و جدایه *Pseudomonas corrugata* دارای ۱۵/۳۸ درصد فعالیت ضدقارچی بودند. در نتیجه جدایه *Pseudomonas fluorescence* دارای بیشترین اثر ضدقارچی در برابر قارچ *Aspergillus niger* بود. در تحقیقی اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *Bacillus* را روی *Aspergillus niger* ، *fusarium oxysporum* ، *Candida albicans* و *Mucor* بررسی و مشاهده کردند که بین قارچ‌های مختلف از لحاظ مهار رشد تفاوت معنی‌داری وجود داشت به طوری که بیشترین بازدارندگی روی *Aspergillus niger* مشاهده شد (Dalal et al., 2014). در مطالعه صورت گرفته توسط Pavithra و همکاران بر روی گیاه ریحان، ۴۰ جدایه اندوفیتی مختلف از برگ و ساقه گیاه ریحان به دست آمد. فعالیت ضد میکروبی اندوفیت‌های به دست آمده، در برابر طیفی از قارچ‌های مختلف از جمله *Aspergillus* ، *fusarium* و *Alternaria* بررسی شد و بیشترین هاله بازدارنده به اندازه ۲۲-۱۰ میلی‌لیتر در برابر قارچ *Aspergillus niger* مشاهده شد (Pavithra et al., 2012). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین مبنی بر

پتانسیل بالای باکتری‌های اندوفیت در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مطابقت دارد. بنابراین ترکیبات باکتریایی تولید شده توسط اندوفیت‌ها گزینه‌های مناسبی را برای حل مشکلات مقاومت‌های دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا فراهم می‌کنند و منابعی با ارزش از عوامل دارویی، برای درمان مؤثر بیماری‌های انسانی، گیاهی و جانوری هستند (Christina et al., 2013, Ek-Ramos et al., 2019).

نتیجه‌گیری

باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ریشه گیاه گلرنگ در تحقیق حاضر به عنوان عوامل مؤثر در تحریک رشد گیاه در مزرعه پیشنهاد می‌شوند. این قابلیت به دلیل توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات و با توجه به مشاهده ارتباط مستقیم بین میزان تولید اکسین و حلالیت فسفات با طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تولید بذر جوانه‌زده اثبات می‌شود. همچنین، این باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک را داشتند و از این طریق می‌توانند مواد غذایی قابل جذب برای گیاه را تولید نمایند. بیشترین فراوانی جدایه‌ها در تحقیق حاضر مربوط به جنس *Pseudomonas* بود که در میان آنها *Pseudomonas fluorescence* دارای بیشترین اثر ضدقارچی در برابر قارچ *Aspergillus niger* بود. این سویه باکتری علاوه بر اثرات محرک رشد گیاه به دلیل اثر محافظتی در مقابل عفونت‌های قارچی نیز قابل توجه است و برای تولید کود زیستی پیشنهاد می‌شود.

References

- Abdalla, M.A. and McGaw, L.J. (2018) Bioprospecting of South African Plants as a Unique Resource for Bioactive Endophytic Microbes. *Frontiers in pharmacology*, 9: 456-456.
- Alikhani, H., Saleh-Rastin, N. and Antoun, H. (2006) Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, 287(1/2): 35-41.
- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Pandey, A. and Faraco, V. (2015) Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(3): 573-581.
- Bahmani, M., Naghdi, R. and Kartoolinejad, D. (2018) Milkweed seedlings tolerance against water stress: Comparison of inoculations with *Rhizophagus irregularis* and *Pseudomonas putida*. *Environmental Technology & Innovation*, 10: 111-121.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibensouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79.
- Bhange, K., Chaturvedi, V. and Bhatt, R. (2016) Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnology Reports*, 10: 94-104.

- Bolivar-Anillo, H.J., González-Rodríguez, V.E., Cantoral, J.M., García-Sánchez, D., Collado, I.G. and Garrido, C. (2021) Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6): 492.
- Chakradhari, S., Perkons, I., Mišina, I., Sipiencie, E., Radziejewska-Kubzdela, E., Grygier, A., Rudzińska, M., Patel, K.S., Radzimirska-Graczyk, M. and Górnaś, P. (2020) Profiling of the bioactive components of safflower seeds and seed oil: cultivated (*Carthamus tinctorius* L.) vs. wild (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.). *European Food Research and Technology*, 246(3): 449-459.
- Christina, A., Christopher, V. and Bhore, S.J. (2013) Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 7(13): 11-16.
- Dalal, J., Kulkarni, N. and Bodhankar, M. (2014) Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic fungi of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Indian Journal of Advances in Plant Research*, 7(1): 9-16.
- Dang, H., Zhang, T., Li, G., Mu, Y., Lv, X., Wang, Z. and Zhuang, L. (2020) Root-associated endophytic bacterial community composition and structure of three medicinal licorices and their changes with the growing year. *BMC Microbiology*, 20(291): 1-18.
- Duan, J.L., Li, X.J., Gao, J.M., Wang, D.S., Yan, Y. and Xue, Q.-H. (2013) Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities. *Annals of Microbiology*, 63(4): 1501-1512.
- Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G. and Tamez-Guerra, P. (2019) Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10(463): 1-12.
- Fadiji, A.E. and Babalola, O.O. (2020) Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(467): 1-20.
- Fouda, A., Eid, A., Elsaied, A., El-Belely, E., Barghoth, M., Azab, E., Gobouri, A. and Hassan, S. (2021) Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterial Community Inhabiting the Leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC Inherent to Arid Regions. *Plants* 10(1): 76.
- Gamalero, E., Favale, N., Bona, E., Novello, G., Cesaro, P., Massa, N., Glick, B.R., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Berta, G. and Lingua, G. (2020) Screening of Bacterial Endophytes Able to Promote Plant Growth and Increase Salinity Tolerance. *Applied Sciences*, 10(17): 5767.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 61(2): 793-796.
- Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3): 293-320.
- Khan, M.S., Gao, J., Chen, X., Zhang, M., Yang, F., Du, Y., Moe, T.S., Munir, I., Xue, J. and Zhang, X. (2020) Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. *BioMed Research International*, 2020: 8650957.

- Lack, S., Ghooshchi, F. and Hadi, H. (2013) The Effect of Crop Growth Enhancer Bacteria on Yield and Yield Components of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). International Journal of Farming and Allied Sciences, 2(20): 809-815.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M. and Schenk, P.M. (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. Microbiology, 8(2552): 1-17.
- Nahon, C., Lehman, D. and Manuselis, G. (2015) Textbook of Diagnostic Microbiology, Saunders Elsevier.
- Naserzadeh, Y., Kartoolinejad, D., Mahmoudi, N., Zargar, M., Pakina, E., Heydari, M., Astarkhanova, T. and Kavhiza, N.J. (2018) Nine strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* : Effects on growth indices, seed and yield production of *Carthamus tinctorius* L. Research on crops, 19(4): 622-632.
- Orozco-Mosqueda, M.d.C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C.A., Morales-Cedeño, L.R., Valencia-Marin, M.F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D. and Santoyo, G. (2021) Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement. Agronomy, 11(6): 1167.
- Pavithra, N., Sathish, L. and Ananda, K. (2012) Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 16(12): 1-6.
- Reyad, A., Radwan, T., Hemida, K., Al-Qasee, N. and Ali, R. (2017) Salt tolerant endophytic bacteria from *carthamus tinctorius* and their role in plant salt tolerance improvement. International Journal of Current Research, 3(12): 1467-1488.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. and Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiology Research, 183: 92-99.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2: 587-587.
- Singh, R. and Dubey, A.K. (2018) Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches Frontiers in Microbiology, 9(1767): 1-10.
- Sogandi, S. and Nilasari, P. (2019) Isolation and molecular identification of Endophytic bacteria from Noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) and their antibacterial activity. Earth and environmental sciences, 299: 012020.
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K. and Aditiawati, P. (2016) Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. HAYATI Journal of Biosciences, 23(1): 39-44.
- Sun, L., Wang, X. and Li, Y. (2016) Increased plant growth and copper uptake of host and non-host plants by metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria. International Journal of Phytoremediation, 18(5): 494-501.
- Torres-Rubio, M.G., Valencia-Plata, S.A., Bernal-Castillo, J. and Martínez-Nieto, P. (2000) Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42: 171-176.
- Turgumbayeva, A.A., Ustenova, G.O., Yeskalieva, B.K., Ramazanova, B.A., Rahimov, K.D., Aisa, H. and Juszkievicz, K.T. (2018) Volatile oil composition of *Carthamus tinctorius* L. flowers grown in Kazakhstan. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 25(1): 87-89.
- Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y. and Sa, T. (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. BMC Microbiology, 17(1): 209.

Yousefi , S., Kartoolinejad, D., Bahmani, M. and Naghdi, R. (2017) Salinity tolerance of *Dodonaea viscosa* L. inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria: assessed based on seed germination and seedling growth characteristics. *Folia Oecologica*, 44(1): 20-27.

Isolation and identification of endophytic bacteria from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) root and investigating their effect on seed germination and plant growth

Sh. Nazarpour¹, M. Mohammadi-Sichani^{1*}, M. Ranjbar²

Received: 2021.9.18

Accepted: 2022.07.02

Abstract

Background: The growth-promoting endophytic bacteria are highly regarded as bio-fertilizers. The aim of this study was to identify safflower endophytic bacteria and to detect their effects on seed germination and plant growth.

Methods: Endophytic strains were isolated from safflower roots and their auxin production and phosphate solubility were evaluated. The effects of isolates were evaluated on the safflower seed germination and growth. Also, the activity of enzymes produced by the selected isolates were investigated. The antifungal effects of endophytic isolates were also evaluated by pour plate method.

Results: Endophytic bacteria including *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brassicacearum*, and *Bacillus megatrium* were isolated from safflower roots. In the treatments with *Bacillus megatrium* NMR isolate, the mean of germinated seeds by exposure to the concentration of 10^5 cfu/ml was significantly higher than concentration of 10^8 cfu/ml. Coleoptile length and root length in the control group were significantly shorter than the treatment groups. There was a direct relationship between the amount of auxin produced by endophytic isolates and their ability for phosphate solubility with increasing safflower coleoptile and root length, and germinated seeds. *Pseudomonas brassicacearum* NMR isolate produced all the four enzymes, pectinase, amylase, protease and xylanase. The *Pseudomonas fluorescence* NMR with the most effectiveness inhibited the growth of *Aspergillus niger* by 30.76%.

Conclusion: The isolated endophytic bacteria in the present study are suggested as stimulants of plant growth in the field due to their ability to produce auxin and to dissolve phosphate and their direct effect on safflower growth factors.

Key words: Antifungal effect, Growth-promoting bacteria, Plant root, Safflower

1. MSc in Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

2. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran (*Corresponding author: mohamadi_m@iaufala.ac.ir)

3. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

1. Morphological, biochemical and physiological responses of <i>Teucrium polium</i> L. to drought stress Z. Tohidi, H. Sobhanian*, A. Baghizadeh	24
2. Evolutionary relationships of the <i>ATAXIN-2</i> protein domain structure in plants: A possible insight into the involvement of this protein in localized translation in rice (<i>Oryza sativa</i>) plant embryogenesis process Sh. heidari, P. heidari, B. Heidari*	40
3. (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) extract and essential oil on plant pathogens (<i>Xanthomonas compestris</i> and <i>Pseudomonas syringae</i>) and human pathogens (<i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i>) M. Haidarizadeh*, M. Hemati, M. Ashengroph	59
4. A critical analysis of the relationship between the "God gene" theory and faithism G.H. Khedri*, V. Azizi.....	74
5. Evaluation of Bio-Aqua probiotic on growth performances and survival, carcass quality, chemical composition, blood and biochemical parameters of silver carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>) and hysico-chemical factors of pond water O.Ramzannezhad, Saber Vatandoust* , Reza Changizi*, Hamed Manouchehri, Reza Safari	88
6. Long-term Protection of Germplasm Millet (<i>Panucum miliaceum</i> L.) Native to the Northwest of Iran M. Kakaei*, T. Basaki.....	99
7. Identification and quantitation of phenolic acids of endophytic fungi isolated from <i>Corylus avellana</i> N. Mohammadi Ballakuti, F. Ghanati*, S.Vazirifar	109
8. Investigation of phenolic compounds and biological properties of vegetative organs of <i>Lepidium vesicarium</i> L. S. Mollaei*, Mahnaz Eslami, Mostafa Ebadi	126
9. Effect of <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Strains on Hairy Root Induction in Different Explants of Alfalfa E. Mirzaie Delbari, J. Vatandoost, M. Jami Moeini*, E. Kohan-Baghkheirati	142
10. Isolation and identification of endophytic bacteria from safflower (<i>Carthamus tinctorius</i> L.) root and investigating their effect on seed germination and plant growth Sh. Nazarpour, M. Mohammadi-Sichani*, M. Ranjbar.....	160

Journal of Applied Biology

Autumn 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

1. Morphological, biochemical and physiological responses of *Teucrium polium* L. to drought stress
Z. Tohidi, H. Sobhanian*, A. Baghizadeh
2. Evolutionary relationships of the *ATAXIN-2* protein domain structure in plants: A possible insight into the involvement of this protein in localized translation in rice (*Oryza sativa*) plant embryogenesis process
Sh. heidari, P. heidari, B. Heidari
3. (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and essential oil on plant pathogens (*Xanthomonas compestris* and *Pseudomonas syringe*) and human pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)
M. Haidarizadeh*, M. Hemati, M. Ashengroph
4. A critical analysis of the relationship between the "God gene" theory and faithism
G.H. Khedri*, V. Azizi
5. Evaluation of Bio-Aqua probiotic on growth performances and survival, carcass quality, chemical composition, blood and biochemical parameters of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and hysico-chemical factors of pond water
O.Ramzannezhad, Saber Vatandoust*, Reza Changizi*, Hamed Manouchehri, Reza Safari
6. Long-term Protection of Germplasm Millet (*Panucum miliaceum* L.) Native to the Northwest of Iran
M. Kakaei*, T. Basaki
7. Identification and quantitation of phenolic acids of endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*
N. Mohammadi Ballakuti, F. Ghanati*, S.Vazirifar
8. Investigation of phenolic compounds and biological properties of vegetative organs of *Lepidium vesicarium* L.
S. Mollaei*, Mahnaz Eslami, Mostafa Ebadi
9. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction in Different
Explants of Alfalfa
E. Mirzaie Delbari, J. Vatandoost, M. Jami Moeini*, E. Kohan-Baghkheirati
10. Isolation and identification of endophytic bacteria from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) root and investigating their effect on seed germination and plant growth
Sh. Nazarpour, M. Mohammadi-Sichani*, M. Ranjbar