

بسم الله الرحمن الرحيم



فصلنامه علمی

مجله زیست شناسی کاربردی

دوره ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، پیاپی ۷۴

مجله زیست‌شناسی کاربردی

بهار ۱۴۰۲

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

مدیر مسئول: دکتر مهوش سیفعلی، استادیار دانشگاه الزهرا (س)

سردبیر: دکتر محمد رضا صعودی، استاد 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 بین‌المللی:

دکتر حسین رجایی، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کونینگ آلمان

دکتر شهرام شهابی، استاد مدیر پژوهش کمپانی داروسازی هایلند و عضو هیات

علمی وابسته کالج پزشکی نچروپاتی ساوت وست

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان
ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)
ویراستار فارسی: خانم معصومه اصلان زاده
ویراستار انگلیسی: فاطمه صانعی کاشانی فر
چاپ و صحافی: انتشارات دانشگاه الزهرا (س)
ترتیب و انتشار: فصلنامه
بها: ۱۰۰۰۰ ریال

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

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست شناسی ایران منتشر می شود .
این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می شود : www.isc.gov.ir

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کدپستی
۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵
شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>
Email: Oolomepaieh@gmail.com

راهنمای نگارش مقاله

برای مجله "زیست شناسی کاربردی" دانشگاه الزهرا (س)

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 زیست شناسی کاربردی در برابر مقاله های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
- الزامیست نویسنده ی مسئول مقاله یکی از اعضای محترم هیئت علمی دانشگاه ها یا موسسات تحقیقاتی باشد. از این رو ایمیل نویسنده ی مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
- در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
- مقاله قبلا به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور هم زمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
- تعهد نامه، مطابق فرمت مجله ارسال شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه ی 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، چکیده‌ی فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، نتیجه‌گیری کلی، سپاسگزاری، منابع، عنوان، آدرس، چکیده و واژه‌های کلیدی انگلیسی می باشد.
- سپاسگزاری و اعلام عدم تعارض منافع هم باید در انتهای مقاله ارائه گردد.
- 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 کنگورد در محلول ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگ با غلظت‌های مختلف نمک.

Figure 1. Congo red removal percentage at ۶۰۰mg/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 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 جزئیات 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. انگلیسی هم همینطور ولی با فونت ۹ باشد. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده ی مسئول سمت راست آن عدد باشد. (Akbari^{1*})
 - **نشانی نگارندگان:** وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد.
- چکیده باید شامل مقدمه، روش‌ها، نتیجه و بحث باشد. از این به بعد نویسندگان ملزم به رعایت چکیده های بخش بندی شده هستند.
- **چکیده ی فارسی:** فونت ۱۲ نازک و ایتالیک، در یک پاراگراف و حداقل ۱۵۰ کلمه باشد.
- **واژگان کلیدی فارسی:** Bold و ۱۲ و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.
- **متن فارسی:** اندازه فونت 12 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 ی مبسوطی انگلیسی:** (مشاهده شیوه تنظیم چکیده گسترده انگلیسی)
 - چکیده انگلیسی: فونت 10 نازک و در یک پاراگراف باشد.
 - **واژگان کلیدی انگلیسی:** فونت Bold ۱۰ باشند.
 - **شماره صفحه:** پایین وسط با فونت B Nazanin ۱۲

- ابتدای هر پاراگراف ۱/۲۷ سانتی متر تورفتگی داشته باشد.
- برای نوشتن اسامی علمی تحت جنس (سرده) سیستم دونامی رعایت شود.
- در مقاله، علائم نگارشی مثل نقطه و غیره به کلمه قبلی چسبیده و از بعدی یک فاصله داشته باشد. از علامت % استفاده نشود، بلکه کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جداول و اشکال).
- برای بیان مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
- جدول با سه خط افقی رسم شود (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).
- فونت اعداد و متن داخل جداول و اشکال ۱۰ نازک و وسط چین باشد.
- اعداد حداکثر تا دو رقم اعشار نوشته شوند.
- عنوان جداول (در بالای جدول) و اشکال (در پایین شکل) وسط چین با فونت ۱۱ Bold علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با فونت ۸ نازک نوشته شوند

مرجع نویسی در متن:

- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003)
- منابع با دو نگارنده: نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود. (kells & Tharp, 2001)
- منابع با بیش از دو نگارنده: تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al* (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (Fermands et al, 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 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 سانتی متر تورفتگی داشته باشند.
- عنوان مجلات کامل نوشته شوند.
- برای استناد به مقاله هایی که هنوز چاپ نشده اند به جای ذکر سال از عبارت (in press) استفاده شود.
- تمامی منابع به زبان انگلیسی باشد.

نشریات:

الف) با یک نویسنده:

Wilson, R.G.J.(1981)Weed control in established dryland Alfalfa (*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.

- **مقاله ای 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 Congresson Allelopathy*, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia.

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

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

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

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

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

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

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

- وقتی مقاله ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.
- نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که براساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به عنوان الگو استفاده نمایند.
- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله به دبیرخانه ارسال شود:

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

فهرست مطالب

شماره صفحه

۱۳-۴۲	۱۵۰۷- مطالعه‌ی مورفومتری جمعیت‌های گونه‌ی <i>Smilax excelsa</i> در استان مازندران
۴۳-۷۴	آذین ایزدخواه، آرمان محمودی اطاقوری، طبیبه امینی ۱۵۱۱- بررسی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نخل مرداب (<i>Cyperus alternifolius</i>)، ویتور (<i>Chrysopogon zizanioides</i>) و آلوئه‌ورا (<i>Aloe vera</i>) تحت آبیاری با پساب شهری
۷۵-۹۴	ساره ابراهیمی نوکنده، سید مهدی رضوی، منصور افشارمحمدیان ۱۵۱۰- بررسی اثر کلر بر زنده ماندن و تغییرات فراساختاری <i>Acanthamoeba castellanii</i>
۹۵-۱۲۲	زینب اسدی، سمیه بهرامی، مهدی زارعی، حسین حمیدی نجات ۱۴۹۳- بررسی مقایسه‌ی اثر تلقیح دو سویه باکتری محرک رشد تولیدکننده سایدروفور (<i>Enterobacter cloacae</i>) و (<i>Bacillus cereus</i>) در دسترسی آهن در نهال‌های پسته (<i>Pistacia Vera L.</i>)
۱۲۳-۱۵۲	فائقه بهرامی نژاد، فاطمه نصیبی، حکیمه علومی، رزا عرب ۱۴۸۶- جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده و شناسایی ترکیبات حاصل از تجزیه این مواد
۱۵۳-۱۷۸	سید افشین حسینی بلداجی، حامد سلطانی، مریم تیموری ۱۵۰۰- بررسی میانکشی نانوذره اکسید مس بر فعالیت و ساختار آنزیم پراکسیداز لیپیدیوم در ابا (LDP)
۱۷۹-۲۱۴	علی ریاحی مدوار، فرشید برزگری دهج، رضا میرازی، فهیمه بهرام‌نژاد ۱۴۸۸- بررسی خاستگاه سلول‌های PGC جوجه و فاکتورهای موثر در خودنوزایی به منظور تکثیر طولانی‌مدت آن‌ها در شرایط <i>vitro</i>
۲۱۵-۲۴۰	معصومه زارع، سیدضیالدین میرحسینی، سیده نفیسه حسینی، شاهرخ قوتی ۱۴۹۷- بررسی نقش تیمارهای هورمونی در تغییرات فیزیولوژیکی انگور یاقوتی سیستان نوشین کلکلی، عباسعلی امام جمعه، یعثوب شیر، محمود سلوکی
۲۴۱-۲۷۰	۱۴۸۰- بررسی اسیدهای فنلی و برخی خواص زیستی گیاه <i>Nepeta macrosiphon</i> سعید ملائی، حدیثه عباسی هولاسو، بهور اصغری، مصطفی عبادی، حسین هاشم‌پور
۲۷۱-۲۸۷	۱۴۹۲- تنوع ریختی گونه سیاه‌ماهی باله بلند (<i>Capoeta trutta</i>) در زیرحوضه‌های بخش ایرانی حوضه آبریز خلیج فارس زهرا مهربانی، سهیل ایگدري، هادی پورباقتر

مطالعه‌ی مورفومتری جمعیت‌های گونه‌ی *Smilax excelsa* L. در استان مازندران

آذین ایزدخواه^۱، آرمان محمودی اطاقوری^{۲*}، طیبه امینی^۳

چکیده

ازملک (*Smilax excelsa* L.) گیاهی بالارونده و دو پایه است که در شمال ایران می‌روید و صفات ریخت شناسی بسیار متنوعی دارد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی ۱۷ جمعیت از این گونه در استان مازندران، با هدف شناسایی صفات مفید برای جدایی و تشخیص جمعیت‌ها و احیاناً واحدهای تحت گونه‌ای، مورد مطالعه قرار گرفت. اطلاعات حاصل از این صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 16) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. دندروگرام با استفاده از تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش within group ترسیم گردید. نتایج نشان داد، صفاتی مانند قطر ساقه، بیشترین طول و عرض گوشوارک و نسبت بین آنها، ضخامت دم برگ، شکل برگ، بیشترین طول و عرض برگ و نسبت بین آنها، بیشترین طول گل‌آذین، طول دم گل‌آذین، تعداد گل در آن، طول دم‌گل، بیشترین طول و عرض سته، در تفکیک و جدایی جمعیت‌ها بیشترین نقش و تاثیر را داشتند و با وجود تنوع زیاد در شکل و اندازه برگ، نمی‌توان گروه تحت گونه‌ای را از این گونه تفکیک نمود و این تفاوت‌ها در میان برگ‌های یک پایه هم دیده می‌شود. صفاتی مانند شکل برگ، بیشترین طول و عرض برگ و نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض برگ در جدایی جمعیت‌ها از هم مؤثر تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: *Smilax excelsa*، تنوع برگ، ریخت‌شناسی، مازندران.

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

۲. نویسنده مسئول: دانشیار سیستماتیک گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. پست الکترونیکی: Botany1347@gmail.com

۳. مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، باغ گیاه‌شناسی نوشهر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مقدمه

سرده ازملک (*Smilax* L.) گیاهی تک لپه از راسته Liliales و تیره Smilacaceae شامل حدود ۳۱۰ گونه از گیاهان بالارونده، درختچه ای و علفی می‌باشد که عمدتاً در نواحی نیمه حاره‌ای و حاره‌ای وجود داشته و تا مناطق معتدل گسترش می‌یابد (Ferrufino-Acosta, 2010; Qi et al., 2013). در منابع موجود دو گونه از این سرده در ایران به نام‌های *Smilax excelsa* L. و *Smilax aspera* L. نام برده شده است که در جنگل‌های هیرکانی می‌رویند (Mozafarian, 2018).

طبق مطالعات سیستماتیک مولکولی بر مبنای فیلوژنی تک لپه‌ای‌ها در دو دهه اخیر ثابت شده است که تیره Smilacaceae عضوی از Liliales تک نیا بوده و در کنار *Ripogonaceae*، *Philesiaceae* و *Liliaceae sensu stricto* قرار می‌گیرد.

(Chase et al., 1995; Patterson & Givnish, 2002; Fay et al., 2006; Kim et al., 2013; Petersen et al., 2013).

در این تیره برگ‌ها نیزه‌ای پهن، مشبک و در قاعده فلسی شکل می‌باشند. گیاهانی دوپایه با گل‌های تک جنس و گل‌آذین عمدتاً چتری بوده و تخمدان سه خانه‌ای و در هر خانه دارای ۲ تخمک است (Chase et al., 2000). رده‌بندی سرده *Smilax* بر مبنای شکل ریزوم‌ها، شکل ساقه‌ها (از جمله وجود و شکل خارها)، برگ‌ها (از جمله نوک، قاعده و حاشیه، رگ‌بندی، طول دم‌برگ و شکل مقطع عرضی)، نوع گل‌آذین، طول و رنگ دم‌گل، اندازه گلبرگ‌ها، بساک‌ها و میله‌ها و شکل، اندازه و رنگ میوه‌ها می‌باشد (Ferrufino-Acosta, 2010). سرده *Smilax* گیاهانی دوپایه و چندساله هستند، بسیار مقاوم در برابر آسیب بوده که قادرند پس از قطع شدن یا آتش سوزی در آتش دوباره از طریق ریزوم‌های خود رشد کنند. سته به رنگ قرمز روشن تا آبی-سیاه، کروی شکل است. قطر آن ۱۰-۵ میلی‌متر دارای بافت کشسانی و دانه‌ای کروی و بزرگ در وسط می‌باشد (Busia, 2016).

اهمیت دارویی سرده *Smilax* از زمان باستان مورد توجه بوده است و از عصاره برگ‌ها و ریشه‌های آن در درمان بیماری‌هایی نظیر سفلیس، نقرس، روماتیسم، اختلالات پوستی، آسم، دندان درد، زخم‌ها و چشم درد استفاده می‌شده است (Silva et al., 2012). گونه *Smilax excelsa* در درمان روماتیسم و به‌عنوان ضدالتهاب در بیماری‌های پوستی کاربرد دارد (Bussmann et al., 2020).

Mandarim-de-Lacerda و همکاران (۱۹۹۲) هم در اندازه و هم بیومتری برگ *S. rufescens* تنوع مشاهده کردند؛ Marquete و Pontes (۱۹۹۴) با مطالعه تشریحی برگ در *S. spicata*، *S. rufescens* و *S. fluminensis* نشان دادند که برگ‌های *S. fluminensis* در مقایسه با دو گونه دیگر آمفی‌استوماتیک و هایپواس‌توماتیک بود. Martins و Appezzato-da-Glória (۲۰۰۶) ساختار تشریحی اندام‌های رویشی *S. polyantha* را بررسی کردند. Moore و همکاران (۲۰۰۸) موم اپی‌کوتیکولی گونه‌های *Smilax* را در تایلند توصیف کردند. Palhares و همکاران (۲۰۰۹) برگ‌های *S. goyazana* را مطالعه کردند. Moore و همکاران (۲۰۱۰) صفات اپیدرمی برگ شش گونه *Smilax* را برای آنالیز سیستماتیک به‌کار بردند.

گیاه *Smilax excelsa* درختچه‌ای با شاخه‌های خاردار، پیچان بالارونده، به ارتفاع ۲ تا ۵ متر می‌باشد. گیاه بدون کرک بوده و برگ‌ها چرمی با دم‌برگ کوتاه، قلبی پهن، به طول ۴-۸ سانتی‌متر و به عرض ۳-۷ سانتی‌متر می‌باشند. گل آذین آن چتر ساده، گل‌ها به رنگ کرم مایل به سفید، میوه سته کروی و قرمز رنگ است (Mahmoudi Otaghvari and Hassannejad Div-Kolaei, 2014).

تنوع بسیار زیاد برگ از نظر اندازه، شکل و رنگ در گونه‌ی *Smilax excelsa* باعث گردید که با مطالعه جمعیت‌های مختلف این گونه در جنگل‌های استان مازندران به عنوان یکی از مناطق اصلی رویش آن، به این سوال پاسخ داده شود که

آیا با وجود این تفاوتها می‌توان تاکسون تحت گونه‌ای از ازملک جدا نمود یا همه این تغییرات در جمعیت‌های یک گونه دیده می‌شوند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جمعیت‌های گونه‌ی *Smilax excelsa* از نواحی مختلف استان مازندران از فروردین تا مهر ماه ۱۴۰۰ انجام شد. ۱۷ جمعیت از این مناطق پس از جمع‌آوری به هرباریوم منتقل شده و در آنجا کدگذاری و برچسب‌گذاری گردیدند. فهرست جمعیت‌های نمونه برداری شده در جدول ۱ ارائه شده است.

برای مطالعات ریخت‌شناسی، بخش‌های مختلف از هر گیاه شامل برگ، میوه، دانه، گل (اجزای گل شامل پرچم و مادگی) به‌طور کامل و دقیق جدا و سپس بررسی صفات کیفی و اندازه‌گیری صفات کمی آن‌ها صورت گرفت. برای انجام اندازه‌گیری‌ها از خط‌کش، کولیس و استریومیکروسکوپ استفاده شد. نتایج برای هر نمونه ثبت و برای هر مجموعه از داده‌های کمی میانگین محاسبه گردید. برای مطالعات تاکسونومی عددی بر روی جمعیت‌های مورد مطالعه، ۷۴ صفت شامل ۳۵ صفت کمی و ۳۹ صفت کیفی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). نتایج برای هر نمونه ثبت و برای هر مجموعه از داده‌های کمی میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید. داده‌های حاصل از مطالعه‌ی صفات مورفومتری در جداول ۳، ۴، ۵ و ۶ آمده است. به منظور انجام آنالیزهای چند متغیره، صفات کیفی به صورت دو حالت یا چند حالت کدگذاری شدند. با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 16) بررسی آماری اولیه‌ی صفات کمی و کیفی و سپس آنالیزهای آماری چند متغیره انجام گرفت. سپس برای تعیین قرابت بین جمعیت‌های مورد مطالعه روش تجزیه‌ی خوشه‌ای با استفاده از مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام و تجزیه خوشه‌ای نیز به سه روش Ward Method، Within group و Between group رسم گردید.

جدول ۱- داده‌های حاصل از مطالعات جغرافیایی و اکولوژیکی مکان‌های نمونه برداری جمعیت‌های *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Table 1. Geographical and ecological data of collected species locations of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province

Code	Species	Location	Height m	Longitude	Latitude
CAI ₁	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr, Kheyroudkenar Jungle	150	51 35 03	36 36 09
CAI ₂	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr, Kheyroudkenar Jungle	250	51 35 07	36 35 59
CAI ₃	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr- Kojur- Firuzabad	400	51 20 37	36 28 57
CAI ₄	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr Airport	20	51 27 18	36 40 01
CAI ₅	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr, Kojur, Firuzabad Road	670	51 25 28	36 28 10
CAI ₆	<i>Smilax excelsa</i>	Nowshahr, Kojur- Hasanabad	570	51 24 43	36 28 31
CAI ₇	<i>Smilax excelsa</i>	Amol, Haraz Road to Tehran, after Police station	250	52 21 09	36 22 06
CAI ₈	<i>Smilax excelsa</i>	Amol-Haraz Road	200	52 20 50	36 28 31
CAI ₉	<i>Smilax excelsa</i>	Tonekabon, Dohezar Road	500	50 49 58	36 39 25
CAI ₁₀	<i>Smilax excelsa</i>	Chalous- Namakabroud- Mesedeh village	30	51 18 57	36 39 49
CAI ₁₁	<i>Smilax excelsa</i>	Ramsar- Janatrudbar Road	670	50 36 31	36 52 10
CAI ₁₂	<i>Smilax excelsa</i>	Ramsar- Janatrudbar to Churte Road	750	50 36 18	36 52 03
CAI ₁₃	<i>Smilax excelsa</i>	Ghaemshahr, Nezami Road	380	52 55 03	36 13 12
CAI ₁₄	<i>Smilax excelsa</i>	Royan to Glandrood	400	51 54 49	36 28 36
CAI ₁₅	<i>Smilax excelsa</i>	Sari, Sari to Dodangeh Road	400	53 13 09	36 15 25
CAI ₁₆	<i>Smilax excelsa</i>	Galugah	400	53 24 37	36 37 47
CAI ₁₇	<i>Smilax excelsa</i>	Neka	350	53 17 08	36 38 16

CAI: Azin Izadkhah Collection number

جدول ۲- صفات کمی و کیفی مورفومتری جمعیت‌های مورد مطالعه‌ی *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Table 2. Morphometry characters of studied populations of *Smilax excelsa* in Mazandaran Province.

Characters	Abbreviations
Habit form	H
Rhizome: Presence	R
Plant trichom	PTr
Branch thorn:	BT
Stem shape	SS
Stem color	SC
Stem thorn	ST
Thorn shape	TSh
Stem trichom	STr
Stem height	SH
Stem diameter	SD
Phyllotaxy	P
Stipule shape	StSh
Stipule length max	StLM
Stipule width max	StWM
Stipule length max / Stipule width max	StLM / StWM
Petiole length	PL
Petiole diameter	PD
Petiole shape	PS
Petiole trichom	PtTr
Leaf shape	LSh
Leaf base	LB
Leaf margin	LM
Leaf tip	LTi
Main vein shap	MVS
Secondary vein shap	SVS
Leaf length max	LLM
Leaf width max	LWM
Leaf length max/Leaf width max	LLM/LWM
Leaf adaxial color	LAdC
Leaf abaxial color	LAbC
Leaf adaxial trichom	LAdT
Leaf abaxial trichom	LAbT
Inflorescent type	IT
Inflorescent length max	ILM
Flower number in inflorescent	FNI
Flower length max	FLM

Characters	Abbreviations
Flower color	FCl
Inflorescent peduncle length	IPL
Peduncle length	PLe
Peduncle color	PC
Peduncle shape	PSh
Tepal color	TC
Tepal length max	TLM
Tepal width max	TWM
Tepal length max/Tepal width max	TLM/TWM
Tepal trichom	TTr
Sepal shape	SSh
Sepal length max	SLM
Sepal width max	SWM
Sepal length max / Sepal width max	SLM / SWM
Petal shape	PSh
Petal length max	PLM
Petal width max	PWM
Petal length max / Petal width max	PLM / PWM
Stamen length max	StLM
Stamen type	StT
Stamen shape	StS
Stamen axle connection	SAC
Pistil Total Length	PiTL
Ovary position	OP
Style shape	StSh
Stigma shape	StiSh
Berry shape	BSh
Berry color	BCl
Berry length max	BLM
Berry width max	BWM
Berry length max/ Berry width max	BLM/BWM

نتایج

در بین ۱۷ جمعیت از گونه‌ی *Smilax excelsa* بیشترین قطر ساقه مربوط به جمعیت‌های کجور- جاده فیروزآباد، کجور- حسن آباد، آمل- جاده هراز به تهران- بعد از پلیس راه و جاده هراز و کمترین مربوط به جمعیت‌های گلوگاه و نکا بود. بیشترین و کمترین طول دم‌برگ به‌ترتیب مربوط به جمعیت‌های تنکابن- جاده دوهزار و چالوس- نمک آبرود- روستای مسده بود. جمعیت نوشهر- جنگل آموزشی خیرود کنار (ارتفاع ۱۵۰) و جمعیت گلوگاه به‌ترتیب بیشترین و کمترین طول و عرض گوشوارک را داشتند. تصویر برگ جمعیت‌های مورد مطالعه در شکل ۱ آمده است. همچنین نتایج مربوط به تنوع برگ در جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۷ آمده است.

در بین ۱۷ جمعیت از گونه‌ی *Smilax excelsa* جمعیت‌های چالوس- نمک آبرود- روستای مسده و نکا به‌ترتیب بیشترین و کمترین ضخامت دم‌گل را داشتند. بیشترین طول گلپوش و نسبت بیشترین طول به عرض گلپوش در جمعیت‌های گلوگاه و نکا و بیشترین عرض گلپوش در جمعیت‌های آمل- جاده هراز به تهران- بعد از پلیس راه، جاده هراز، تنکابن- جاده دوهزار و چالوس- نمک آبرود- روستای مسده مشاهده شد. بیشترین طول و عرض کاسبرگ متعلق به جمعیت‌های رامسر- جاده جنت رودبار و رامسر- جاده جنت رودبار به چرته بود. بیشترین طول گلبرگ و همچنین بیشترین طول پرچم مربوط به جمعیت‌های گلوگاه و نکا بود. بیشترین و کمترین طول و عرض سته به‌ترتیب در جمعیت‌های ساری- ابتدای جاده ساری و کجور- جاده فیروزآباد و کجور- حسن آباد مشاهده شد.

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مورفومتری مورد مطالعه‌ی برگ، گل‌آذین، گل، میوه و دانه به روش PCA با استفاده از نرم‌افزار SPSS در جداول ۸ و ۹ آمده است. جدول ۸ مقدار واریانس کل هر یک از مؤلفه‌های حاصل از آنالیز PCA صفات مورفومتری در جمعیت‌های مورد مطالعه‌ی *Smilax excelsa* در استان

مازندران و جدول ۹ مقدار ارزش هر یک از مؤلفه‌ها را برای صفات مورد مطالعه نشان می‌دهد. نمودار اسکری پلات در شکل ۲ و دندروگرام حاصل از این آنالیز به روش Between group نیز در شکل ۳ آمده است.

جدول ۳- داده‌های حاصل از مطالعه‌ی صفات کیفی ساقه و برگ مورد مطالعه در

جمعیت‌های *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Table 3. Qualitative characters of stem and leaves of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

Code	H	R	PTr	BT	SS	SC	ST	TSh	STr	P
CAI ₁	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₂	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₃	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₄	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₅	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₆	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₇	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₈	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	Alternate
CAI ₉	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₀	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₁	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₂	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₃	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₄	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₅	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₆	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate
CAI ₁₇	climbing	Absent	Absent	Present	simple	green	Present	simple	Absent	alternate

جدول ۳-ادامه

Code	StSh	PS	PtTr	LSh	LB	LM	LTi
CAI ₁	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₂	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₃	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₄	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₅	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₆	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₇	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₈	spiral	simple	Absent	ovate	cordate	Entire	Acute
CAI ₉	spiral	simple	Absent	cordate	cordate	Entire	Acute
CAI ₁₀	spiral	simple	Absent	cordate	cordate	Entire	Acute
CAI ₁₁	spiral	simple	Absent	cordate	Attenuate	Entire	Acute
CAI ₁₂	spiral	simple	Absent	cordate	Attenuate	Entire	Acute
CAI ₁₃	spiral	simple	Absent	cordate	Attenuate	Entire	Acute
CAI ₁₄	spiral	simple	Absent	cordate	Attenuate	Entire	Acute
CAI ₁₅	spiral	simple	Absent	cordate	Attenuate	Entire	Acute
CAI ₁₆	spiral	simple	Absent	arrow-head	Attenuate	wavy	Acute
CAI ₁₇	spiral	simple	Absent	arrow-head	Attenuate	wavy	Acute

جدول ۳- ادامه

Code	MVS	SVS	LAdC	LABC	LAdT	LABT
CAI1	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI2	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI3	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI4	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI5	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI6	arc	branched	Dark green	Light green	Absent	Absent
CAI7	arc	branched	green	Light green	Absent	Absent
CAI8	arc	branched	green	Light green	Absent	Absent
CAI9	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI10	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI11	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI12	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI13	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI14	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI15	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI16	arc	branched	green	green	Absent	Absent
CAI17	arc	branched	green	green	Absent	Absent

جدول ۴- داده‌های حاصل از مطالعه‌ی صفات کیفی گل و میوه مورد مطالعه در

جمعیت‌های *Smilax excelsa* در استان مازندران.**Table 4.** Qualitative characters of flowers and seeds of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

Code	IT	PC	PSh	TT	TCl	TTr	FCI	SSh
CAI ₁	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₂	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₃	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₄	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₅	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₆	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₇	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₈	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₉	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₀	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₁	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₂	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₃	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₄	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₅	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₆	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth
CAI ₁₇	umbellate	Light green	cylindrical	Bottom stuck	Light green	Absent	Light green	No teeth

جدول ۴- ادامه

Code	PeSh	StT	SAC	OP	StSh	StiSh	BS	BCI
CAI ₁	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₂	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₃	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₄	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₅	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₆	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₇	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₈	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₉	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₀	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₁	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₂	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₃	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₄	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₅	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₆	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red
CAI ₁₇	Elliptic	Free	Bottom stuck	Above petal	atrophy	Three part	round	red

جدول ۵- داده‌های حاصل از مطالعه‌ی صفات کمی ساقه و برگ مورد مطالعه در جمعیت‌های *Smilax excelsa* در استان مازندران (برحسب میلی‌متر).

Table 5. Quantitative characters of stem and leaves of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province (mm).

Code	SH	SD	StLM	StWM	StLM /StWM	PL	PD	LLM	LWM	LLM/LWM
CAI ₁	Above 10 meter	3	130	4	32	1.4	1.1	6.5	5.5	1.2
CAI ₂	Above 10 meter	3	100	2	50	1.4	1.1	6.5	5.5	1.2
CAI ₃	Above 10 meter	2	110	2	55	1.5	1.1	9	8.5	1.05
CAI ₄	Above 10 meter	2	70	1.5	46	1.5	1.1	9.5	9	1.05
CAI ₅	Above 10 meter	3.5	56	1	56	1	1.2	7	6	1.16
CAI ₆	Above 10 meter	3.5	61	1	61	1	1.2	7	6	1.16
CAI ₇	Above 10 meter	3.5	80	2	40	1	1.4	9	8	1.12
CAI ₈	Above 10 meter	3.5	120	1	120	1	1.4	9	8	1.12
CAI ₉	Above 10 meter	2.5	50	1	50	2.4	1.2	6.5	5.5	1.2
CAI ₁₀	Above 10 meter	2.5	45	1	45	0.9	1.6	7	6.5	1.07
CAI ₁₁	Above 10 meter	2.5	40	1	40	1.5	1.5	8	8	1
CAI ₁₂	Above 10 meter	2	40	1	40	1.5	1.5	6	5.7	1.05
CAI ₁₃	Above 10 meter	1.5	100	1	100	1.02	1.06	6.5	5.7	1.14
CAI ₁₄	Above 10 meter	2	90	1.5	60	1.4	1.2	7	6.5	1.07
CAI ₁₅	Above 10 meter	1.5	80	0.7	114	1.2	1.4	9	7	1.28
CAI ₁₆	Above 10 meter	1	21	0.3	70	1.2	1.2	4.8	3.5	1.34
CAI ₁₇	Above 10 meter	1	30	0.5	60	1.2	1	7.5	5.5	1.3

جدول ۶- داده‌های حاصل از مطالعه‌ی صفات کمی گل و میوه مورد مطالعه در جمعیت‌های

Smilax excelsa در استان مازندران (برحسب میلی‌متر).

Table 6. Quantitative characters of flowers and seeds of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province (mm).

Code*	ILM	FNI	IPL	PLe	TLM	TWM	TLM/ TWM	FLM	SLM	SWM	SLM/ SWM
CAI ₁	10	3	13	7	7.5	1.1	6.8	10	7.5	1.2	6.2
CAI ₂	10	3	13	7	7.5	1.1	6.8	10	7.5	1.2	6.2
CAI ₃	13	4	12	6	7.5	1	7	10	8	1.5	5.3
CAI ₄	13	4	12	6	8	1	8	10	8	1	8
CAI ₅	11	5	12	6.5	8	1	8	10	8	1	8
CAI ₆	11	5	12	6.5	8	1	8	10	8	1	8
CAI ₇	12	5	11	5.5	7.5	1.2	6.2	9.5	8	1.5	5.3
CAI ₈	12	5	11	5.5	7.5	1.2	6.2	9.5	8	1.5	5.3
CAI ₉	14	4	11	5.1	7.5	1.2	6.2	9.5	8	1.5	5.3
CAI ₁₀	12	5	12	5.2	7.5	1.2	6.2	9.5	8.5	1.5	5.6
CAI ₁₁	14	4	11	5	7	1.1	6.4	9	9	2	4.5
CAI ₁₂	14	4	11	5.2	7	1	7	9	9	2	4.5
CAI ₁₃	15	6	15	7.5	8	1	8	9	7	1.1	6.4
CAI ₁₄	15	6	15	7.3	8.2	1	8.2	10	6.5	1	6.5
CAI ₁₅	17	7	16	7.2	8.5	1.2	7	10	6.7	1	6.7
CAI ₁₆	16	7	17	7.5	9	1	9	10	7	1	7
CAI ₁₇	17	7	17	8	9	1	9	10	7.5	1	7

جدول ۶- ادامه

Code*	PLM	PWM	PLM/ PWM	StLM	PiTL	BLM	BWM	BLM/BWM
CAI ₁	6	0.6	10	0.5	4	4	4	1
CAI ₂	6	0.6	10	0.5	4	4	4	1
CAI ₃	6	0.6	10	0.5	4	5	5	1
CAI ₄	7	0.7	10	0.6	4.1	5	5	1
CAI ₅	7	0.7	10	0.6	4.1	3	2	1.5
CAI ₆	7	0.7	10	0.6	4.1	3	2	1.5
CAI ₇	5.5	0.6	9	0.4	4.5	5	5	1
CAI ₈	5.5	0.6	9	0.4	4.5	5	5	1
CAI ₉	5.5	0.6	9	0.5	5	5	5	1
CAI ₁₀	5.5	0.6	9	0.5	5	5	5	1
CAI ₁₁	6	0.7	8.5	0.6	5	5	5	1
CAI ₁₂	6	0.7	8.5	0.6	5	5	5	1
CAI ₁₃	6	0.8	7.5	0.6	5	6	6	1
CAI ₁₄	6	0.9	6.6	0.5	5.1	6	6	1
CAI ₁₅	6.5	1	6.5	0.7	5.1	7	7	1
CAI ₁₆	7.5	1	7.5	0.8	5.1	5	4	1.25
CAI ₁₇	7.5	1	7.5	0.8	5.1	5	4	1.25

CAI₁CAI₂CAI₃CAI₄CAI₅CAI₆



CAI₇



CAI₈



CAI₉



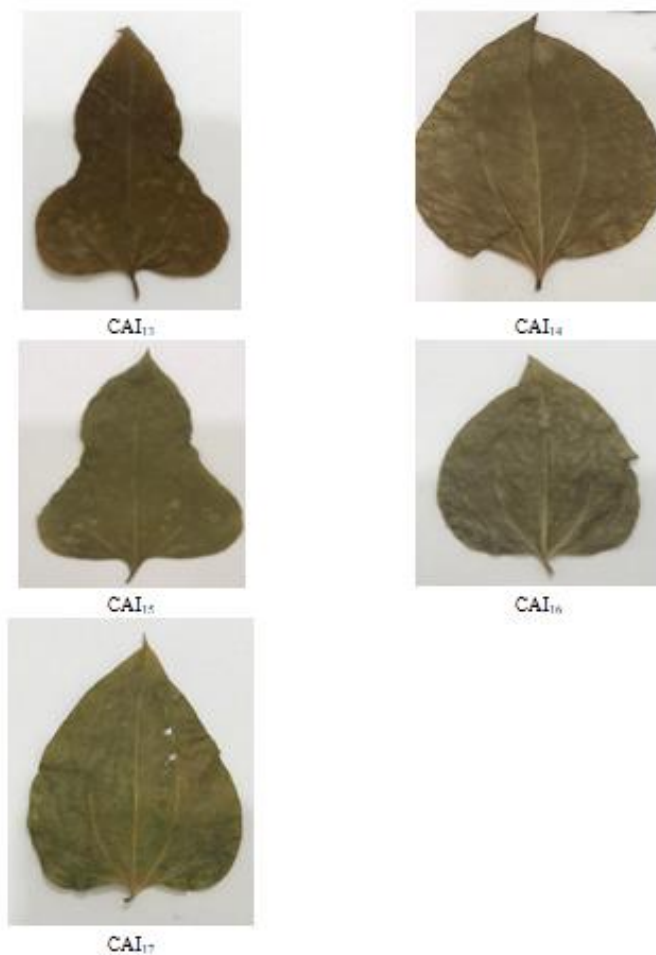
CAI₁₀



CAI₁₁



CAI₁₂



شکل ۱- تصویر برگ جمعیت‌های مورد مطالعه *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Figure 1. Leaf images of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

جدول ۷- نتایج مربوط به تنوع برگ در جمعیت‌های مورد مطالعه در استان مازندران.

Table 7. Leaf diversity results of studied populations in Mazandaran Province.

Leaf Shape	
	Arrowhead in Galugah and Neka populations.
	Cordate in Tonekabon, Dohezar Road; Chalous- Namakabroud- Mesedeh village; Ramsar- Janatrudbar Road; Ramsar- Janatrudbar to Churte Road; Ghaemshahr, Nezami Road; Royan and Sari, Sari to Dodangeh Road populations.
	Ovate in Nowshahr, Kheyroudkenar Jungle; Nowshahr- Kojur- Firuzabad; Nowshahr Airport; Kojur, Firuzabad Road; Kojur- Hasanabad; Amol, Haraz Road to Tehran, after Highway Police and Haraz Road populations.

Leaf Base	
	Attenuate in Ramsar-Janatrudbar Road; Ramsar-Janatrudbar to Churte Road; Ghaemshahr, Nezami Road; Royan; Sari, Sari to Dodangeh Road; Galugah and Neka populations.
	Cordate in Nowshahr, Kheyroudkenar Jungle; Nowshahr- Kojur- Firuzabad; Nowshahr Airport; Kojur, Firuzabad Road; Kojur- Hasanabad; Amol, Haraz Road to Tehran, after Highway Police; Haraz Road; Tonekabon, Dohezar Road and Chalous- Namakabroud- Mesedeh village populations.
Leaf Margin	
	Wavy in Galugah and Neka populations.

جدول ۸- مقدار واریانس هر یک از مؤلفه‌های حاصل از آنالیز PCA برای داده‌های مورفومتری جمعیت‌های مورد مطالعه *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Table 8. Components total variance of PCA analysis of morphometry data of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

Total Variance Explained									
Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	12031	30.077	30.077	12031	30.077	30.077	9938	24845	24845
2	6443	16.108	46.186	6443	16.108	46.186	6723	16808	41.653
3	5344	13.359	59.545	5344	13.359	59.545	4044	10.110	51.763
4	3631	9.078	68.623	3631	9.078	68.623	3523	8.807	60.570
5	3104	7.760	76.383	3104	7.760	76.383	3212	8.031	68.601
6	2548	6.369	82.753	2548	6.369	82.753	2935	7.336	75.937
7	1990	4.974	87.727	1990	4.974	87.727	2745	6.863	82.800
8	1382	3.455	91.182	1382	3.455	91.182	2452	6.130	88.930
9	1141	2.852	94.034	1141	2.852	94.034	2042	5.104	94.034
10	.736	.1840	95.874						
11	.582	.1455	97.329						
12	.548	.1371	98.699						
13	.240	.060	99.300						
14	.099	.0249	99.548						
15	.058	.0146	99.694						
16	.042	.0104	99.798						
17	.037	.0091	99.889						
18	.021	.0052	99.941						
19	.014	.0034	99.975						
20	.004	.0011	99.986						
21	.003	.0008	99.994						
22	.001	.0004	99.998						
23	.001	.0001	99.999						
24	.000	.0000	100.000						
25	9.081E-5	.0000	100.000						
26	2.524E-5	6.309E-5	100.000						
27	3.525E-6	8.812E-6	100.000						
28	1.790E-7	4.474E-7	100.000						
29	8.026E-16	2.007E-15	100.000						
30	7.816E-16	1.954E-15	100.000						
31	5.508E-16	1.377E-15	100.000						
32	2.543E-16	6.358E-16	100.000						
33	8.593E-17	2.148E-16	100.000						
34	-9.063E-18	-2.266E-17	100.000						
35	-2.074E-16	-5.186E-16	100.000						
36	-2.300E-16	-5.751E-16	100.000						
37	-3.621E-16	-9.051E-16	100.000						
38	-6.376E-16	-1.594E-15	100.000						
39	-1.070E-15	-2.675E-15	100.000						
40	-1.221E-15	-3.053E-15	100.000						

Extraction Method: Principal Component Analysis.

جدول ۹- مؤلفه‌های حاصل از آنالیز PCA داده‌های مورفومتری جمعیت‌های مورد مطالعه *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Table 9. Components of PCA analysis of morphometry data of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

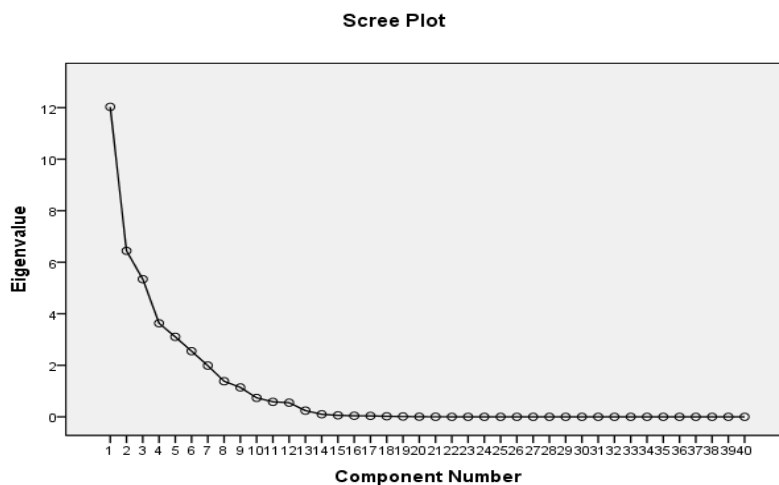
Rotated Component Matrix ^a									
	Component								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Leaf length max	.953	-.259							
Leaf width max	.916	-.329				.126	-.106		
Leaf shape	.903	-.245	-.184				.152	.168	-.121
Petiole length	.896	.227	.215		.248	.126			
Pistil Total Length	.895	-.104	-.175		.177	.229		.213	
Stipule length max	.892	-.128		.108	.152	.222	-.251		
Stipule width max	.832	.304	.385		.106		-.148		
Stem diameter	-.779	.259		.186		.392	.279		.166
Petiole diameter	.717	-.104	-.403	-.196		-.316		.269	-.156
Leaf adaxial color	.593	-.107	-.130	-.315		-.253	.554	.239	-.227
Leaf abaxial color	.502		.443		.107		-.193		.324
Leaf base	-.179	.961	.137						
Leaf margin	.239	.869	.142			-.268	-.178		
Berry width max	-.457	.856	.109	.103		.120			
Berry length max	-.457	.856	.109	.103		.120			
Inflorescent length max	-.470	.632	.171	.252		.381	.240	.219	.130
Stipule length max/Stipule width max	.253	.626	.238	.588	-.227				
Stamen length max	.434	.607	-.413	-.187	.150	.121	.158	.221	-.229
Leaf length max/Leaf width max		-.104	-.905			-.152			

	Component								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Flower number in inflorescent	-.267	.163	.824	-.133	.221			.219	.175
Peduncle length	.294		.736	.106	.400	.220		.256	
Berry length max/ Berry width max		-.316	.227	.832	.142	-.203	.123		.177
Tepal width max	-.195	.164	-.118	.787	-.221	.190		-.116	-.281
Tepal length max	-.358		-.234	.726	-.362	-.287		-.188	
Inflorescent peduncle length	.156	.402	-.292	.658	-.154		-.229	-.180	-.344
Flower length max	.153		.153	-.110	.917			.150	
Petal length max	.188	-.179	.174	-.101	.876	.150		.194	-.171
Sepal length max	.159		.367			.830		.234	.249
Petal width max	.284				.222	.786	.257		-.253
Sepal width max	-.336		.183		.155	.326	.787	-.288	
Tepal length max/ Tepal width max			-.434	.142	-.327	.198	.609	-.143	.302
Petal length max / Petal width max	.279	-.277			.251			.862	-.101
Sepal length max / Sepal width max				-.104	-.318		.129	-.282	.822

Extraction Method: Principal Component Analysis.

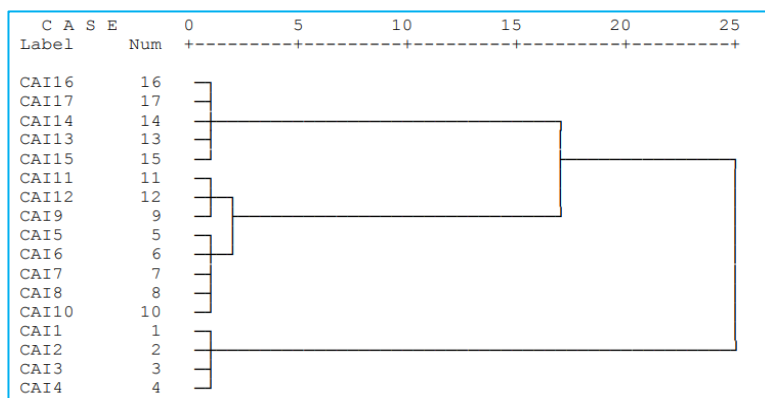
Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

a. Rotation converged in 27 iterations.



شکل ۲- نمودار اسکری پلات حاصل از داده‌های ریخت‌شناسی جمعیت‌های مورد مطالعه *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Figure 2. Scree Plot of morphological data of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از آنالیز PCA داده‌های ریخت‌شناسی جمعیت‌های مورد مطالعه *Smilax excelsa* در استان مازندران.

Figure 3. Dendrogram of PCA analysis of morphometry data of *Smilax excelsa* populations in Mazandaran Province.

بحث

خصوصیات مورفولوژیکی از مدت‌ها قبل در انجام مطالعات سیستماتیکی و فیلوژنتیکی کاربرد داشته است (Stuessy *et al* 2009). تحقیقات متعددی ارزش تشخیصی برگ‌ها را بررسی کرده‌اند. برگ‌ها احتمالاً متنوع‌ترین اندام جهت مطالعات آناتومی در نهاندانگان هستند هر چند ارزش تاکسونومیک صفاتی مانند ساختار روزنه، تزئینات سطحی و پیکربندی دیواره سلول اپیدرمی نیز به کرات مورد بررسی قرار گرفته است (De Souza *et al.*, 2005; Martins and Da-Gloria, 2006; Palhares *et al.*, 2009).

همانطور که ابتدا اشاره گردید تنوع بسیار زیاد برگ از نظر شکل، سایز و رنگ باعث گردید که این گونه مورد مطالعه قرار گیرد، شکل برگ از ویولونی تا قلبی و گرد در اندازه‌های متنوعی دیده می‌شود. گاهی در روی برگ‌ها لکه‌های سفیدی وجود دارد که نمای زیبایی به آنها می‌دهد. برگ‌ها در حاشیه گاهی صاف و گاهی موجدار و در قاعده قلبی، گوه‌ای یا گرد هستند. اما جمع‌آوری و مطالعه بر روی جمعیت‌ها از نقاط مختلف استان، نشان داد که این تفاوت‌ها در این گونه ناشی از چند شکلی یا هترومورفی بوده و در شاخه‌های مختلف یک پایه هم دیده می‌شود.

بر اساس مطالعات انجام شده صفات نامبرده شده در جدول ۲ به عنوان صفات تفکیک کننده مورد استفاده قرار گرفت، نتایج حاصل از آنالیز آماری این مطالعه (جدول‌های ۸ و ۹) نشان داد صفت‌هایی مثل قطر ساقه، بیشترین طول و عرض گوشوارک، نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض گوشوارک، ضخامت دم برگ، شکل برگ، بیشترین طول و عرض برگ، نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض برگ، بیشترین طول گل‌آذین، طول دم گل‌آذین، تعداد گل در گل‌آذین، طول دم‌گل، بیش‌ترین طول و عرض گلپوش، نسبت

بیشترین طول به بیشترین عرض گلیوش، بیشترین طول گل، بیشترین طول و عرض کاسبرگ، نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض کاسبرگ، بیشترین طول و عرض گلبرگ، نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض گلبرگ، طول کل مادگی و بیشترین طول و عرض سته بسیار ارزشمند هستند. سایر صفات نامبرده شده در جدول ۲ نقش تفکیک کنندگی نداشته یا نقش تفکیک کنندگی آن‌ها معنی‌دار نیست.

چنان که جداول ۸ و ۹ نشان می‌دهند از بین ۹ مؤلفه با ۹۴ درصد کل واریانس، مؤلفه اول با ۲۵ درصد واریانس با صفاتی مانند بیشترین طول و عرض برگ، شکل برگ، طول کل مادگی، بیشترین طول و عرض گوشوارک، قطر ساقه و ضخامت دم برگ ارتباط معنی‌دار را نشان می‌دهند. مؤلفه دوم با ۱۷ درصد واریانس با صفاتی مانند شکل و حاشیه برگ، بیشترین طول گل‌آذین و بیشترین طول و عرض سته ارتباط معنی‌دار، دارد. مؤلفه سوم با ۱۰ درصد واریانس با صفاتی مانند نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض برگ، تعداد گل در گل‌آذین و بیشترین طول دم‌گل ارتباط معنی‌دار نشان می‌دهند. مؤلفه چهارم با ۸ درصد واریانس با صفاتی مانند بیشترین طول و عرض گلیوش ارتباط معنی‌دار دارد. مؤلفه پنجم با ۸ درصد واریانس با صفاتی مانند بیشترین طول گل و بیشترین طول گلبرگ ارتباط معنی‌دار نشان داد. مؤلفه ششم با ۷ درصد واریانس با صفاتی مانند بیشترین طول کاسبرگ و بیشترین عرض گلبرگ ارتباط معنی‌دار نشان داد. مؤلفه هفتم با ۶ درصد واریانس با صفات بیشترین عرض کاسبرگ و نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض گلیوش ارتباط معنی‌دار نشان می‌دهند. مؤلفه هشتم با ۶ درصد واریانس با صفت نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض گلبرگ ارتباط معنی‌دار دارد.

مؤلفه نهم با ۵ درصد واریانس با با صفت نسبت بیش‌ترین طول به بیش‌ترین عرض کاسبرگ ارتباط معنی‌دار دارد ($P < 0.05$).

نمودار اسکری پلات (شکل ۲) نیز نشان می‌دهد که ۹ مؤلفه نخست در ایجاد واریانس کل بیش‌ترین نقش و تاثیر را داشته و بقیه مؤلفه‌ها تاثیر ناچیزی دارند.

در طول و عرض برگ و شکل جمعیت‌های مورد مطالعه تفاوت وجود دارد. Guaglianone و Gattuso (۱۹۹۱) تفاوت‌هایی را در شکل برگ *S. campestris* جمع‌آوری شده از محیط‌های مختلف مشاهده کردند و دریافتند که این صفت دستخوش تغییر فنوتیپی بین گونه‌ای طبق پراکنش خود می‌شود. آنها در بین نمونه‌های *S. campestris* تفاوت شکل برگ بین تخم‌مرغی، تخم‌مرغی-نیزه‌ای، بیضوی، مستطیلی و قلبی با تفاوت زیاد در طول و عرض مشاهده کردند (Guaglianone & Gattuso, 1991).

Ferrufino-Acosta (۲۰۱۰) در مطالعه‌ی ریخت‌شناسی ۱۲۰ گونه‌ی منطقه‌ی کارائیب گزارش کرد که در گونه‌ی *Smilax excelsa* شکل برگ‌ها تخم‌مرغی، نیزه‌ای، قلبی یا بیضی شکل بوده و دارای نوک تیز و قاعده قلبی می‌باشند که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد.

Martins و همکاران (۲۰۰۶) آناتومی اندام‌های رویشی زیرزمینی شش گونه از جنس *Smilax* را بررسی کرده و نتیجه گرفتند که ریخت‌شناسی این اندام‌ها سبب جدایی گونه‌های مورد مطالعه نشده و ریخت‌شناسی برگ در تمایز گونه‌ها نقش داشت که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در مطالعه آنها اپیدرم در دید جلو در جداسازی گونه‌ها به سه گروه نقش داشت، همچنین تزئینات کوتیکولی در میان گونه‌ها و حتی بین دو سطح در یک گونه متفاوت بود (Martins et al., 2006).

طبق Silva (۲۰۱۲) تفاوت در شکل، طول و عرض و رگبندی برگ در جمعیت‌های گونه‌ی *S. syphilitica* مشاهده شد که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. این تفاوت را می‌توان به تفاوت در طول و عرض جغرافیایی جمعیت‌ها نسبت داد (Silva, 2012).

Martins و همکاران (۲۰۱۳) مورفواناتومی ساقه هوایی و برگ هفت گونه از *Smilax* را در برزیل مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند مجموعه‌ای از صفات برگ، از جمله تعداد رگبرگ‌های میانی برجسته، دیواره‌های سلولی اپیدرمی در جلو، تیپ روزنه‌ها و آرایش دستجات آوندی همجوار در رگبرگ‌های میانی به همراه دیگر صفات رویشی می‌توانند به تمایز تاکسونومیک گونه‌های *Smilax* کمک کنند (Martins et al., 2013).

Yildiz و همکاران (۲۰۱۸) پنج صفت ریخت‌شناسی را در شش ژنوتیپ گونه‌ی *Smilax excelsa* در ترکیه مطالعه کرده و تفاوت‌های زیادی را بین ژنوتیپ‌ها یافتند. برای مثال کم‌ترین نسبت برگ به سرشاخه ۳۰/۹۵ درصد و بیش‌ترین ۶۵/۳۵ درصد بود. این تفاوت را می‌توان به تفاوت در عرض جغرافیایی و عوامل غیرزیستی مرتبط دانست (Yildiz et al., 2018).

سختی در تشخیص گونه‌های جنس *Smilax* به دو پایه بودن و همچنین شباهت‌های ریخت‌شناسی در میان گل‌ها نسبت داده می‌شود (Moore et al., 2010).

دندروگرام رسم شده بر اساس میانگین صفت‌های ریخت‌شناسی (شکل ۳) وجود دو شاخه‌ی اصلی را نشان می‌دهد (در سطح ۲۵ به دو زیرشاخه تقسیم شده است) که شاخه‌ی اول شامل جمعیت‌های نوشهر- جنگل آموزشی خیرود کنار، نوشهر- کجور- فیروز آباد و فرودگاه نوشهر بوده و شاخه‌ی دوم به دو زیرشاخه در سطح ۱۷ تقسیم می‌شود. یک زیرشاخه شامل جمعیت‌های قائم شهر- ابتدای جاده نظامی، رویان- لنگرود، ساری- ابتدای جاده ساری به

دودانگه، گلوگاه و نکا بوده و زیرشاخه‌ی دوم به دو کلاد تقسیم می‌شود. در یک کلاد جمعیت‌های تنکابن- جاده دوهزار، رامسر- جاده جنت رودبار و رامسر- جاده جنت رودبار به چرتنه قرار گرفته و در کلاد دیگر جمعیت‌های کجور- جاده فیروزآباد، کجور- حسن آباد، آمل- جاده هراز به تهران- بعد از پلیس راه، جاده هراز و چالوس- نمک آبرود- روستای مسده قرار دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های *Smilax excelsa* تنوع برگ وجود دارد. لذا، صفات برگ‌ی مورد مطالعه شامل بیشترین طول و عرض گوشوارک، نسبت بیشترین طول به بیشترین عرض گوشوارک، ضخامت دم برگ، شکل برگ، بیش‌ترین طول و عرض برگ و نسبت بیش‌ترین طول به بیش‌ترین عرض برگ می‌توانند به جدایی تاکسونومیکی جمعیت‌ها کمک کنند.

عدم تعارض

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

فهرست منابع

- Busia, K. (2016). *Fundamentals of Herbal Medicine: Major Plant Families, Analytical Methods, Materia Medica* (Vol. 2). Xlibris Corporation.
- Bussmann, R.W., Batsatsashvili, K., Kikvidze, Z., Paniagua-Zambrana, N.Y., Khutsishvili, M., Maisaia, I., Sikharulidze, S., Tchelidze, D. (2020). *Smilax excelsa* L. In: Batsatsashvili K, Kikvidze Z, Bussmann RW, editors. *Ethnobotany of mountain regions far Eastern Europe*. Cham: Springer International Publishing; https://doi.org/10.1007/978-3-319-77088-8_150-2.
- Chase, M.W., Stevenson, D.W., Wilkin, P., and Rudall, P.J. (1995). Monocot systematics: a combined analysis. In: Rudall PJ, Cribb PJ, Cutler DF, Humphries CJ, eds. *Monocotyledons: systematics and evolution*. Kew: Royal Botanic Gardens, 685–730.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Rudall, P.S., Fay, M.F., Hahn, W.H., Sullivan, S., Joseph, J., Givnish, T.J., Sytsma, K.J., and Pires, C., (2000). Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson, K.L., Morrison, D.A. (Eds.), *Monocot—systematics and Evolution*, vol. 1. CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 3–16.
- Fay, M.F., Chase, M.W., Rønsted, N., Devey, D.S., Pillon, Y., Pires, J.C., Petersen, G., Seberg, O., and Davis, J.I. (2006). Phylogenetics of Liliales: summarized evidence from combined analyses of five plastid and one mitochondrial loci. *Aliso*, 22: 559–565.
- Ferrufino-Acosta, L. (2010). Taxonomic revision of the genus *Smilax* (Smilacaceae) in Central America and the Caribbean Islands. *Willdenowia* 4400: 227– 280.
- Guaglianone, E.S., and Gattuso, S. (1991). Estudios taxonómicos sobre el genero *Smilax* (Smilacaceae) I. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 27: 105-129.
- Kim, J.S., Hong, J.K., Chase, M.W., Fay, M.F., and Kim, J.H. (2013). Familial relationships of the monocot order Liliales based on a molecular phylogenetic analysis using four plastid loci: matK, rbcL, atpB and atpF-H. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172: 5–21.

- Mahmoudi Otaghviri, A., and Hassannejad Div-Kolaei, H. (2014). Plant biosystematics. Yazd Publication, 240 pages.
- Mandarim-de-Lacerda, A.F., Andreato, R.H.P., and Peres-Neto, P.R. (1992). Ensaio metodológico de avaliação biométrica em folhas adultas de *Smilax rufescens* (Smilacaceae). *Pesqui Bot*, 43: 199-221.
- Marquete, O., and Pontes, R.G. (1994). Estudo anatômico foliar comparativo de *Smilax spicata* Vell., *Smilax rufescens* Griseb. e *Smilax fluminensis* Steudel. *Rev. Bras. Biol.*, 54: 413-426.
- Martins, A.R., and Appezzato-da-Glória, B. (2006). Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). *Rev. Bras. Bot.*, 29: 555-567.
- Martins, A.R., Bombo, A.B., Soares, A.N., Appezzato-da-Glória, B. (2013). Aerial stem and leaf morphoanatomy of some species of *Smilax*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(4): 576-584.
- Moore, B.R., Narkkong, N.A., Moore, T., and Lutat, P. (2008). Epicuticular leaf architecture confirms a new *Smilax* species (Smilacaceae) from Northeast Thailand. *Sci Asia*, 34: 102-6.
- Moore, B.R., Moore, T., and Narkkong, N.A. (2010). A preliminary systematic analysis of leaf epidermal characters for six *Smilax* species in Thailand. *ScienceAsia*, 36: 175-179.
- Mozafarian, V. (2018). Gilan Flora. Farhange Ilia, 1543 pages.
- Patterson, T.B., and Givnish, T.J. (2002). Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. *Evolution*, 56: 233-252.
- Petersen, G., Seberg, O., and Davis, J.I. (2013). Phylogeny of the Liliales (Monocotyledons) with special emphasis on data partition congruence and RNA editing. *Cladistics*, 29: 274-295.
- Qi, Z., Cameron, K.M., Li, P., Zhao, Y., Chen, S., Chen, G., and Fu, C. (2013). Phylogenetics, character evolution, and distribution patterns of the greenbriers, Smilacaceae (Liliales), a nearcosmopolitan family of monocots. *Botanical Journal of the Linnean Society. Linnean Society of London* 117733: 535- 548.

- Palhares, D., Silveira, C.E.S., Zaidan, L.B.P., and Pereira, L.A.R. (2009). Leaf anatomy of *Smilax goyazana* (Smilacaceae). Acta Bot. Hung., 51: 115-127.
- Silva, J.M., Andreato, R.H.P., and Glória, B.A. (2012). Aerial organ anatomy of *Smilax syphilitica* (Smilacaceae). Rev. biol. Trop, 60(3): 1137-1148.
- Stuessy, T. F. (2009). Plant taxonomy: The systematic evaluation of comparative data. (2nd ed.), New York: Columbia University Press.
- Takhtajan, A. (1987). Systema magnoliophytorum. Leningrad: Nauka.
- Yildiz, O.S., Ayanoglu, F., and Bahadırli, N.P. (2018). Some Morphological and Chemical Characteristics of Sarsaparilla (*Smilax aspera* L., *Smilax excelsa* L.). Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University, 23(2):254-261.

بررسی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نخل مرداب (*Cyperus alternifolius*)، وتیور (*Chrysopogon zizanioides*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) تحت آبیاری با پساب شهری

ساره ابراهیمی نوکنده^۱، سید مهدی رضوی^{۲*}، منصور افشار محمدیان^۳

چکیده

مقدمه: گیاه پالایی یک روش زیستی و مقرون به صرفه جهت حذف فلزات سنگین از خاک و محیط زیست آلوده می باشد و انتخاب گیاه مناسب به منظور گیاه پالایی با توجه به گسترش روزافزون آلودگی ها از جمله پساب های شهری، بسیار مهم است.

مواد و روش ها: در این راستا آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و به مدت ۱۴ ماه در دانشگاه گیلان اجرا شد و شاخص انباشت فلزات (روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم) در سه گیاه نخل مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا تحت تیمار پساب شهری اندازه گیری شد و برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی این گیاهان نیز با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که تحت تیمار پساب شهری شاخص انباشت فلزات (MAI) در گیاه وتیور و آلوئه‌ورا بیش تر از نخل مرداب بود. در هر سه گیاه مورد مطالعه شاخص های طول ریشه، طول اندام هوایی، زیست توده کل، شاخص جذب (UI) و شاخص تحمل (TI) نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی داری داشتند و گیاه آلوئه‌ورا بیش ترین درصد کاهش را داشت. همچنین بالاترین درصد افزایش در قند محلول کل، محتوی فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل، تانن کل و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در گیاه وتیور مشاهده شد. بنابراین می توان گفت از نظر خصوصیات انباشت فلزات و ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بررسی شده، گیاه وتیور موفق تر از بقیه بود.

واژه های کلیدی: فلزات سنگین، شاخص انباشت فلز، فلاونوئید کل، فنل کل، گیاه پالایی.

۱. گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲. نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. پست الکترونیکی: razavi694@gmail.com
۳. گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

مقدمه

از بزرگ‌ترین معایب دفن زائدات و پسماند، شیرابه تولیدی حاصل از آن در دفن‌گاه یا لندفیل است. شیرابه یا پساب، زهابی است که از سایت‌های دفن زباله خارج می‌شود و باعث آلودگی خاک، آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌شود، به‌طوری‌که ورود حجم کمی از پساب به خاک و سفره آب زیرزمینی می‌تواند سطح وسیعی از این منابع را آلوده سازد (Wang et al., 2010). از جمله این آلودگی‌ها می‌توان به آلودگی فلزات سنگین اشاره کرد. واژه فلزات سنگین به فلزات و شبه فلزاتی که دارای عدد اتمی بالای ۲۰ و یا چگالی آن‌ها بیش از ۵ گرم بر سانتی متر مکعب می‌باشد، اطلاق می‌شود. البته برای تعریف این واژه به مفاهیمی چون سمیت و حضور پایدار در محیط‌زیست نیز استناد می‌شود، به‌طوری‌که همه فلزها و شبه فلزهای آسیب‌رسان و سمی (صرف‌نظر از عدد اتمی یا چگالی آن) با نام فلزات سنگین شناخته می‌شوند. سرب (Pb)، کادمیم (Cd)، نیکل (Ni)، روی (Zn)، آهن (Fe)، آرسنیک (As)، مولیبدن (Mo)، منگنز (Mn)، منیزیم (Mg)، کبالت (Co)، کروم (Cr)، مس (Cu)، جیوه (Hg)، نقره (Ag)، سلنیم (Se) از جمله این فلزات می‌باشند (Adriano, 2001).

محققان گزارش کرده‌اند که وجود فلزات سنگین در محیط زیست گیاهان، نوعی عامل تنش‌زا می‌باشد که باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شده و می‌تواند موجب کاهش توان رشد گیاه و در حالت شدیدتر باعث از بین رفتن گیاه شود (Gajic & Pavlovic, 2018; Ng et al., 2020). لذا در انتخاب و مقایسه گیاهان جهت گیاه‌پالایی در مناطق مختلف، باید به خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان نیز علاوه بر مسئله پالایش عناصر سنگین توجه کرد.

تاکنون تحقیقات زیادی در رابطه با اثر انواع پسابها روی گیاهان و موضوع گیاه پالایی انجام شده است (Jalali & Hemati Matin, 2019; Kouhi & Moudi, 2020; Petoussi and Kalogerakis, 2022; Placido & Lee, 2022). ولی نکته مهم آن است که اطلاعات این تحقیقات برای همه کشورها کاملاً مشابه و مستقیماً قابل استفاده نیست و محققان گیاه پالایی در اروپا و آمریکا نیز اعلام نموده اند که در مورد پساب و گیاهان در هر منطقه به خصوص، باید مطالعات دقیق محلی انجام شود (Weinberg et al. 2004).

استان گیلان در شمال ایران دارای آب و هوای نیمه گرمسیری مرطوب و از نظر کشاورزی، استانی حاصل خیز است. جمعیت شهری در این استان روز به روز در حال افزایش است و پسماندهای شهری جای مناسبی برای تخلیه ندارند. به طوری که در برخی نقاط، پس از دفع زباله‌ها و جمع شدن آن‌ها روی هم، کوهی با ارتفاع زیادی از زباله ایجاد شده که پساب آن مستقیماً به رودخانه‌ها و مزارع و مناطق مسکونی سراریز می‌شود.

با توجه به این که کاشت گیاهان با قابلیت گیاه پالایی خوب، در نزدیکی محل خروجی پساب، به عنوان کمربند سبز، عملی‌ترین و کم هزینه‌ترین روش به‌سازی می‌باشد و این روش می‌تواند علاوه بر زیبا سازی و تثبیت اراضی در برابر فرسایش‌های حاصل از باد و آب، منطقه آلوده را نیز پالایش کند، لذا در این مطالعه اثرات پساب شهری با تاکید بر برخی فلزات سنگین را بر سه گونه گیاهی شامل نخل مرداب (*Cyperus alternifolius* L.) از خانواده جگن، وتیور (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) از خانواده گندم و آلوئه‌ورا (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) از خانواده سریش را به عنوان عامل گیاه پالایی مورد بررسی قرار دادیم. علت انتخاب این گیاهان این بود که هر سه گونه مورد بررسی، همیشه سبز هستند و به راحتی در آب و هوای گیلان رشد می‌کنند (با اینکه بومی گیلان

نیستند)، زیست توده بالایی تولید می کنند، سیستم ریشه ایی تقریباً وسیعی دارند، مورد تهاجم حیوانات قرار نمی گیرند و خطر ایجاد مسمومیت و یا تهاجم به مناطق دیگر را ندارند، مقاوم به شرایط نامساعد محیطی هستند و از طرفی، این سه گیاه تاکنون در منطقه آلوده مورد نظر در استان گیلان بررسی و مقایسه نشده بودند. لذا در این مطالعه به بررسی پتانسیل جذب و توانایی زیستی سه گیاه نخل مرداب، وتیور، آلوئه‌ورا به عنوان یک گیاهان پالاینده برای حذف فلزات سنگین از خاک تحت تاثیر آلودگی پساب شهری در استان گیلان پرداخته شد و شاخص انباشت (هم‌زمان) کل فلزات شامل: روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم و برخی ویژگی‌های رشد و نمو و فیزیولوژیکی آن‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه خاک و پساب

به منظور بررسی اثر پساب شهری بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاهان نخل مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا، آزمایش گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار، زیر فضای مسقف شیشه‌ای، در محوطه دانشکده علوم دانشگاه گیلان و شرایط دمای محیط اجرا شد. در مدت انجام آزمایش، میانگین دمای هوا ۱۸/۲۵ و میانگین رطوبت هوا ۷۷/۲۵ بود (اداره کل هواشناسی استان گیلان). خاک مورد استفاده از منطقه ای در حاشیه جنگل شفارود واقع در استان گیلان از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر به‌طور تصادفی برداشت و الک شد. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی (Walkley and Black, 1934; Richards 1954) (جدول ۱) و همچنین مقدار فلزات سنگین با استفاده از دستگاه (ICP-OES) Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer مدل (ARCOS, Spectro, Germany) در نمونه خاک اولیه و قبل از شروع آزمایش سنجش شد (Salt et al., 1998; AL-Oud Saud, 2003) (جدول ۲). تیمارهای آزمایشی

شامل دو گروه بودند: آب شهری به عنوان تیمار اول (شاهد)، تیمار دوم پساب زباله‌های شهری که از محل دفن زباله سراوان در استان گیلان برداشت شد. پساب به صورت ماهانه جمع‌آوری و در دبه‌های مخصوص و در سایه نگهداری می‌شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک اولیه (شاهد) (Nokande et al., 2022).

Table 1. Physicochemical properties of primary soil (control)

هدایت الکتریکی ds/m	اسیدیته گل اشباع	کربن آلی %	ازت کل %	شن %	سیلت %	رس %	فسفر قابل جذب ppm	پتاسیم قابل جذب ppm	بافت خاک
۰/۸۸	۶/۶۳	۳/۱۹	۰/۳۸	۶۴	۲۲	۱۴	۱۳/۵	۱۳۱	لومی-شنی

جدول ۲- مقادیر فلزات سنگین در خاک اولیه (شاهد) (Nokande et al., 2022).

Table 2. The amounts of heavy metals in primary soil (control)

Mg	Ni	Mn	Cu	Pb	Cr	Zn	فلزات سنگین مورد بررسی
۲۴۰۰	۹	۲۴۰	۲۰	۸	۱۴	۱۶	ppm

آماده سازی گلدان‌ها

گیاهان سالم نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا از محل‌های رشد و نمو آن‌ها در حوالی شهر رشت جمع‌آوری شدند و بوته‌های هم‌وزن پس از تقسیم‌بندی در گلدان‌های پلاستیکی به عرض ۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر با ۱۱ کیلوگرم خاک الک شده کاشته شدند. برای جلوگیری از تاثیر تنش بر گیاهان و سازگاری با شرایط جدید، تمامی گیاهان آزمایشی به مدت ۴ هفته با آب شهری (هفته‌ای دو بار و هر بار ۳۰۰ میلی‌لیتر) آبیاری شدند. پس از یک ماه از شروع

کشت، گلدان‌های شاهد با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب شهری و گلدان‌های تیمار با ۳۰۰ میلی‌لیتر پساب شهری ۲ بار در هفته به مدت ۱۴ ماه به طور جداگانه آبیاری شدند. در طول آزمایش، برگ‌هایی که در طی فصل رشد ریخته می‌شد نیز جمع‌آوری و خشک می‌شدند. به گیاهان اجازه داده شد در شرایط آب و هوای محیطی معمول زیر یک سقف شیشه‌ای رشد کنند. همچنین برای تعیین میزان کل عناصر اضافه شده از پساب به خاک، گلدان‌هایی با ۱۱ کیلوگرم خاک پر شده بدون گیاه در نظر گرفته و مانند گلدان‌های حاوی گیاهان آبیاری شدند.

برداشت خاک و گیاه

پس از گذشت ۱۴ ماه از شروع کشت، هر گلدان به آرامی برگردانده و خالی شد. مقداری از خاک هر گلدان نیز (پس از مخلوط و همگن کردن کل خاک) برداشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد آن به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. همچنین خصوصیات pH و EC در خاک نهایی (خاک گلدان‌های بدون گیاه) که تحت آبیاری آب شهری و پساب شهری قرار داشتند اندازه‌گیری شد (Richards, 1954; Uba et al., 2009) که نتایج آن قبلاً منتشر شده است (Nokande et al., 2022). برای pH مقادیر ۵/۴۳، ۶/۵۷ و برای EC مقادیر ۰/۷۹، ۸/۱۲ به ترتیب در تیمارهای آب شهری و پساب شهری می‌باشد.

ارزیابی طول ریشه، اندام‌هوایی و زیست توده کل

پس از برداشت کل گیاهان، اندازه‌گیری طول اندام ریشه و اندام‌هوایی انجام شد، سپس گیاهان ابتدا با آب معمولی شهری و سپس آب مقطر شستشو شدند. برای ارزیابی وزن خشک، اندام‌های گیاهان شاهد و تیمار در آن تحت

دمای (میانگین) ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت (میانگین) ۹۶ ساعت خشک و سپس وزن شدند.

ارزیابی غلظت فلزات سنگین موجود در اندام گیاهان

اندام‌های (ریشه و اندام‌هوایی) خشک شده گیاهان توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر شدند سپس با استفاده از دستگاه (ICP-OES)، غلظت نهایی فلزات سنگین در بخش‌های مختلف گیاهان و همچنین خاک سنجش شد (Salt et al., 1998; AL-Oud Saud, 2003). میزان کل عناصر فلزی که از طریق پساب شهری به صورت تیمار به گلدان‌ها داده شده بود، در جدول ۳ آمده است. با توجه به مطالعه قبلی ما (Nokande et al, 2022) مقدار تمام فلزات اندازه‌گیری شده به غیر از عناصر کروم و نیکل، در گلدان‌های بدون گیاه (که جهت برآورد نهایی کل عناصر فلزی اضافه شده از پساب به خاک تعبیه شده بودند) از میزان استانداردهای جهانی بیشتر بودند (USEPA, 2005; WHO, 2000).

جدول ۳- مقادیر کل عناصر فلزی سنگین در خاک گلدان‌های شاهد (بدون گیاه) پس از پایان آزمایش و مقایسه با استاندارد خاک (USEPA, 2005; WHO, 2000).

Table 3. Total amount of heavy metals added to the soil, after 14 months, under different treatments (water and urban wastewater) and the standard rate of heavy metals in the soil (USEPA, 2005; WHO, 2000).

فلز سنگین ppm							نوع خاک
Mg	Ni	Mn	Cu	Pb	Cr	Zn	
۷۵۶۶/۶۷	۲۴	۶۶۳/۳۳	۷۹/۶۷	۵۲/۳۳	۴۲/۶۷	۱۱۷/۶۷	خاک پساب شهری
-	۳۳/۷	۴۳۷	۳۰	۱۰	۶۵	۵۰	استاندارد خاک

شاخص انباشت فلزات (MAI) Metal accumulation index

با توجه به اینکه اندام‌های گیاهی قادرند هم‌زمان چند نوع فلز را در ساختار خود جمع کنند، شاخص انباشت فلزات (MAI) برای بررسی مقدار تجمع هم‌زمان فلزات (Mg, Ni, Mn, Cu, Pb, Cr, Zn) در هر سه گیاه از طریق رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$MAI = \left[\frac{1}{N} \right] \sum_{j=1}^N I_j$$

در این رابطه N تعداد فلزات اندازه‌گیری شده که در این آزمایش برابر با ۷ بود، I_j برای هر فلز از تقسیم میانگین غلظت فلز در اندام گیاه شامل ریشه و برگ (X) به مقدار انحراف معیار آن (δx) به دست آمد (Liu et al., 2007).

شاخص جذب Uptake index

برای محاسبه UI، غلظت فلز در اندام هوایی گیاه ضربدر وزن خشک اندام‌هوایی گیاه شد (Bi et al., 2011; Zoufan et al., 2016).

شاخص تحمل Tolerance index

برای محاسبه TI، وزن خشک کل گیاه در خاک آلوده به فلز سنگین تقسیم بر وزن خشک کل گیاه در خاک شاهد شد (Kabata-Pendias, 2000; Ng et al., 2020).

سنجش قند محلول برگ

برای این منظور، ۰/۵ گرم پودر بافت خشک اندام هوایی با ۱۰ میلی لیتر محلول اتانول ۸۵ درصد و در حمام آب در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی جمع آوری شد. ۲ میلی لیتر از محلول رویی با ۱ میلی لیتر محلول فنل ۵ درصد مخلوط شد. سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به محلول بالا اضافه شد و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت (Schlegel, 1956) و با کمک منحنی استاندارد میزان قندهای محلول در گیاهان تیمار و شاهد مشخص شد.

سنجش محتوی فنل کل

ابتدا ۰/۱ گرم از پودر بافت خشک اندام هوایی در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ عصاره گیری شد. به محلول حاصل ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۵ میلی لیتر فولین ۵ درصد و ۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد. شدت جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی، خوانده شد (Ainsworth et al., 2007). از غلظت‌های مختلف گالیک اسید جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد و در نهایت میزان فنل کل براساس میلی گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بیان شد.

سنجش فلاونوئید کل

۰/۲ گرم از پودر بافت خشک اندام هوایی در ۱۰ میلی لیتر متانول عصاره گیری شد. به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره، ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد تا حجم

۵ میلی لیتر به دست آمد. سپس ۰/۳ میلی لیتر NaNO_2 ۵ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از AlCl_3 ۱۰ درصد اضافه شد. در نهایت ۲ میلی لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و شدت جذب محلول در طول ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد (Chang et al., 2002). در این سنجش با استفاده از غلظت های مختلف کاتچین نمودار استاندارد تهیه و در آخر میزان فلاونوئید کل براساس میلی گرم بر گرم وزن خشک ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) بیان شد.

سنجش آنتوسیانین کل

ابتدا ۰/۵ گرم پودر بافت خشک اندام هوایی با متانول اسیدی (به نسبت ۱ به ۹۹) عصاره گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در یخچال نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از رابطه ۲ استفاده شد (Masukasu et al., 2003).

رابطه ۲:

$$A = \varepsilon BC$$

در این رابطه A، جذب محلول، ε برابر با ضریب خاموشی $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ، B مساوی با ۱ سانتی متر عرض کووت و C، غلظت محلول مورد نظر 10^{-3} ، براساس میکروگرم بر گرم وزن خشک بود.

سنجش تانن کل

ابتدا ۱ میلی لیتر از عصاره متانولی با ۱۰۰ میلی گرم پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی نگهداری شد. سپس مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه

سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس میزان تانن کل از حاصل تفاضل میزان فنل کل و فنل فاقد تانن به دست آمد (Omidbaigi, 2008).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH

در این روش، توانایی دادن الکترون یا اتم هیدروژن توسط عصاره سه گیاه، از روی میزان بی رنگ کردن محلول بنفش رنگ رادیکال ۲-و-۲ دی فنیل-۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) در متانول، سنجیده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از پودر بافت خشک اندام هوایی توسط متانول استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) عصاره گیری و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس سانتریفوژ (۱۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰) و بخش روشناور نمونه ها جداسازی شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره ها داخل لوله های فالتون کوچک ریخته شد و ۹۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی نرمال به آن ها اضافه شد. محلول حاصل به سرعت به هم زده شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. نمونه بلانک و استاندارد به ترتیب شامل ۱ میلی لیتر حلال استخراج و ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ نرمال DPPH بود. سپس میزان جذب استاندارد و نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Hatano et al., 1988).

رابطه ۳:

$$\text{Antioxidant activity (DPPH\%)} = (A_{\text{cont}} - A_{\text{samp}}) / A_{\text{cont}} \times 100$$

DPPH% = درصد بازدارندگی رادیکال

DPPH = میزان جذب DPPH

A_{samp} = میزان جذب (نمونه + DPPH)

تجزیه و تحلیل آماری

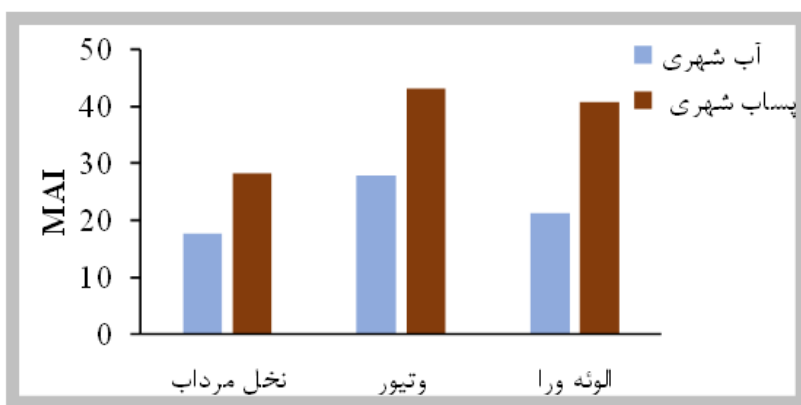
آنالیز واریانس برای هر یک از شاخص‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS (24)، آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال $P \leq 0.05$ انجام شد. همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft excel 2019 رسم شدند.

نتایج و بحث

شاخص انباشت فلزات MAI

با توجه به نتایج شاخص انباشت فلزات Mg، Ni، Mn، Cu، Pb، Cr، Zn در گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا در پژوهش حاضر، مشخص شد که MAI هر سه گیاه، تحت تیمار پساب شهری بالاتر از تیمار شاهد بود (شکل ۱). بالاترین مقدار MAI در گیاه وتیور و در تیمار پساب شهری (۴۳/۲۲) مشاهده شد. مقادیر MAI به ترتیب در گیاه آلوئه‌ورا و گیاه نخل‌مرداب ۴۰/۷۶ و ۲۸/۳۰ بود. با توجه به اینکه عملکرد کلی گیاهان برای تجمع هم‌زمان عناصر فلزی بر اساس انحراف معیار آن در جذب فلز توسط MAI نشان داده می‌شود (Liu et al., 2007) می‌توان گفت از نظر شاخص انباشت فلزات یا MAI بررسی شده در این تحقیق، گیاه وتیور عملکرد بهتری نسبت به گیاه آلوئه‌ورا و گیاه آلوئه‌ورا عملکرد بهتری نسبت به گیاه نخل‌مرداب داشت. گیاهان در برابر تنش

فلزات سنگین ناشی از پساب‌های شهری، دارای حساسیت و استراتژی‌های متفاوتی می‌باشند. میزان سمیت فلزات سنگین در گیاهان مختلف، متناسب با عواملی مانند نوع گیاه، مقدار فلز در پساب، نوع خاک و اقلیم، قابلیت دسترسی زیستی فلزات، میزان جذب فلز توسط گیاه و مقدار جابه‌جایی آن در اندام‌های گیاهی، تغییر می‌کند (Wang et al., 2006; Usman et al., 2005).



شکل ۱- شاخص انباشت فلزات (روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم) در کل گیاه (مجموع ریشه‌ها و اندام‌هوایی) نخل مرداب، وتیور، آلوه‌ورا تحت تیمار آب شهری و پساب شهری.

Fig 1. Metal accumulation index (Zn, Cr, Pb, Cu, Mn, Ni, Mg) of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. under water and urban wastewater treatments.

مطالعات قبلی پیشنهاد کردند که گونه‌های گیاهی با ارزش MAI بالا باید به عنوان موانعی بین مناطق آلوده و آسیب پذیر مانند پارک‌ها و مناطق مسکونی استفاده شوند (Nadgorska-Socha et al., 2017) اما بررسی شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه در خاک به خصوصی که گیاه پالایی در آن صورت می‌گیرد، نیز یکی از ضروریاتی است که در تحقیقات گیاه پالایی مورد تاکید می‌باشد (Ruilian et al., 2012). بر اساس نتایج آنالیز واریانس برخی شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک در این تحقیق، (جدول

۴) مشاهده شد که اثر تک تیمار بر همه شاخص‌های آزمایش شده به غیر از قند محلول برگ در سطح اطمینان $P \leq 0.05$ معنی دار بود. اثر تک گونه نیز بر شاخص‌های طول ریشه، طول اندام هوایی، زیست توده کل، شاخص جذب، شاخص تحمل و محتوی فنل کل در سطح اطمینان ۵ درصد معنی دار بود. همچنین اثر متقابل تیمار و گونه گیاهی نیز در سطح اطمینان ۵ درصد بر شاخص‌های طول اندام هوایی، زیست توده کل، شاخص جذب، شاخص تحمل و محتوی فنل کل معنی دار بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر پساب شهری بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سه گیاه نخل مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

Table 4. The variance analysis of urban wastewater effects on some morphological and physiological indices of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f.

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	طول اندام هوایی	زیست توده کل	شاخص جذب (UI)	شاخص تحمل (TI)
تیمار	۱	۹۴۴/۶۷*	۸۳۸۰/۸۰*	۰/۵۹*	۵۲۱۹۴۴/۹۶*	۰/۸۸*
گونه گیاه	۲	۴۸۹/۱۲*	۱۰۷۴۸/۶۶*	۰/۵۰*	۱۳۹۶۷۷۳/۷۴*	۰/۶۹*
اثر متقابل تیمار و گونه گیاه	۲	۸/۵۴ ^{ns}	۴۴۳/۸۰*	۰/۰۱*	۱۳۹۳۷۳/۴۹*	۰/۰۶*
خطا	۱۲	۶/۷۲	۵۲/۴۰	۰/۰۰	۱۴۹۸۴/۵۹	۰/۰۰

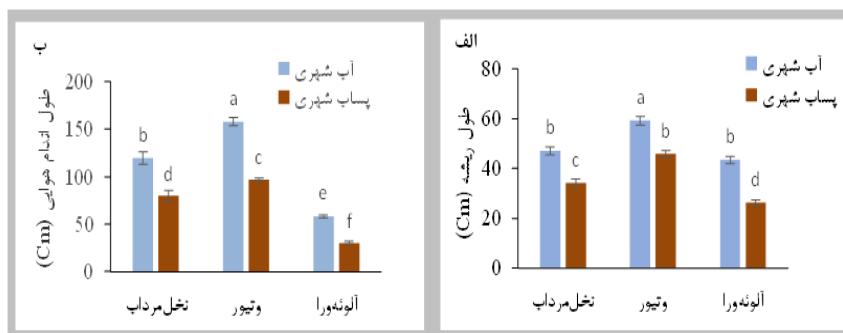
میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	قند محلول کل	فنل کل	فلاونوئید کل	آنتوسیانین کل	تانن کل
تیمار	۱	۷۷۵/۹۴ ^{ns}	۰/۲۳*	۲۸/۵۰*	۰/۰۰*	۰/۲۵*
گونه گیاه	۲	۲۲۳/۵۷ ^{ns}	۰/۰۲*	۰/۳۵ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}
اثر متقابل تیمار و گونه گیاه	۲	۱۰۶۴/۴۷ ^{ns}	۰/۰۱*	۰/۵۴ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}
خطا	۱۲	۳۴۳/۰۵	۰/۰۰	۰/۳۹	۰/۰۰	۲۲/۹۳

*معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

*Significant at 0.05 probability level

طول ریشه و اندام‌هوایی

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین آزمون دانکن، بعد از ۱۴ ماه تیماردهی گیاهان با پساب شهری، از طول ریشه (شکل ۲-الف) و طول اندام‌هوایی (شکل ۲-ب) هر سه گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری کاسته شد. بالاترین درصد کاهش در طول ریشه و طول اندام‌هوایی مربوط به گیاه آلوه‌ورا به ترتیب با ۳۹/۷۲ و ۴۸/۰۷ درصد کاهش بود. ریشه‌ها به عنوان اولین اندام جذب کننده آب و مواد غذایی، تاثیر زیادی در جذب آب و املاح دارند و عوامل مختلف محیطی از طریق تاثیر بر ریشه می‌توانند بر رشد گیاه اثر بگذارند. تنش فلزات سنگین از جمله عوامل محدودکننده رشد ریشه است و کاهش رشد ریشه باعث تغییراتی در فعالیت‌های رشدی گیاه می‌شود. در این تحقیق آلودگی زیاد پساب شهری و همچنین بیشتر بودن MAI در گیاه آلوه‌ورا ممکن است سبب عدم طویل شدن و گسترش مناسب سیستم ریشه‌ای و باعث کاهش سطوح جذب کننده مواد غذایی یا تغییر در ساختار غشا سلولی و کاهش جذب و محتوی آب شود که این امر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز اثر گذاشته و در نهایت موجب کاهش رشد در سایر قسمت‌های گیاه شود (Sharma and Dubey, 2005).



شکل ۲ - تاثیر پساب شهری بر (الف) طول ریشه و (ب) طول اندام‌هوایی گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا. در نمودار مقادیر میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان‌گر فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.

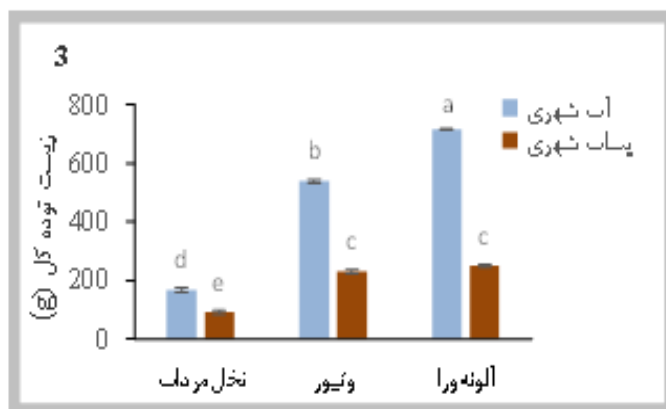
Figures 2. The effects of urban wastewater on (A) the root length and (B) shoot length of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. The data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

زیست توده کل

با توجه به شکل ۳، وزن خشک کل بوته در هر سه گیاه کاهش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد خود داشت. کاهش زیست توده گیاهان بعد از ۱۴ ماه تیماردهی، برای گیاه آلوئه‌ورا ۶۵/۲۳ درصد، گیاه وتیور ۴۹/۴۵ درصد و برای گیاه نخل‌مرداب ۴۵/۲۷ درصد بود که نشان می‌دهد گیاه آلوئه‌ورا کاهش بیش‌تری در زیست توده نسبت به گیاه شاهد خود داشته است. Malik و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که سطوح بالای فلزات در خاک، بسیاری از عملکردهای متابولیک گیاه را مهار می‌کند و در نتیجه باعث تاخیر در رشد و در نهایت باعث محدود شدن رشد ریشه و اندام‌های هوایی می‌شود. احتمالاً با

افزایش تنش، میزان تولیدات گیاهی، اندازه سلول‌ها و در نتیجه وزن خشک اندام‌ها کاسته می‌شود (Yadollahi *et al.*, 2016). گزارش شده است که در پساب شهری، علاوه بر فلزات سنگین، ترکیبات آلی سمی دیگری نیز وجود دارد که مانع رشد گیاه شده و در نهایت باعث کاهش وزن خشک گیاهان می‌شود (Hosseini & Pourakbar, 2013; Ramirez-Sosa *et al.*, 2013; Mohsenzadeh *et al.*, 2016).

لازم به ذکر است که علاوه بر سمیت ناشی از فلزات سنگین و سایر ترکیبات موجود در پساب، مقادیر اضافی برخی عناصر غذایی نیز می‌تواند موجب کاهش تولید و تجمع زیست توده و در نتیجه کاهش وزن شود (Taiz & Zeiger, 2014; Mohsenzadeh *et al.*, 2016).



شکل ۳- تاثیر پساب شهری بر زیست توده کل گیاهان نخل مرداب، وتیور و آلوه ورا. در نمودار مقادیر میانگین $\pm$ SE تکرار ۳ است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان‌گر فقدان اختلاف معنی دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.

Figures 3. The effects of urban wastewater on biomass of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. The data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

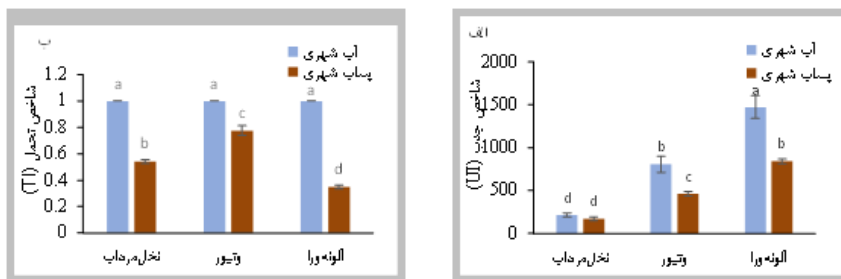
شاخص جذب (UI)

بررسی شاخص UI با توجه به وزن خشک کل گیاه نشان داد که مقدار این شاخص در هر سه گیاه رشد یافته در پساب شهری با توجه به گیاه شاهد خود کاهش یافت (شکل ۴- الف). طبق نتایج این تحقیق، تحت تیمار پساب شهری نسبت به تیمار آب شهری گیاهان فلز بیش‌تری جذب کرده ولی همزمان وزن خشک گیاه نیز کم شده و به این ترتیب شاخص جذب (UI) هم عدد کمتری را نشان می‌دهد. بیش‌ترین درصد کاهش (۴۲/۹۱ و ۴۲/۸۸ درصد) در این شاخص به ترتیب در گیاه آلوئه‌ورا و وتیور مشاهده شد. مطالعات گذشته نشان دادند که غلظت فلزات در اندام گیاهی و تولید زیست‌توده گیاهی از مهم‌ترین عوامل برای تعیین راندمان گیاه که از طریق بررسی شاخص جذب می‌توان به آن دست یافت. البته در برخی مطالعات نیز از افزایش مقدار UI در تنش کم فلزات سنگین و کاهش مقدار UI در تنش شدید فلز سنگین گزارش شده است (Zoufan et al., 2016 and 2018; Tahmasbian & Safari, 2016).

شاخص تحمل (TI)

با توجه به شکل ۴- ب، در هر سه گیاه با اثر پساب شهری به‌طور معنی داری از میزان TI کاسته شد. طبق نتایج تحقیق حاضر گیاه آلوئه‌ورا بیش‌ترین درصد کاهش (۶۶) و گیاه وتیور پایین‌ترین درصد کاهش (۲۳) را نسبت به گیاهان شاهد خود داشتند که نشان می‌دهد بین سه گیاه مورد مطالعه، گیاه وتیور شاخص تحمل بهتری داشت. در مطالعات دیگر نیز از پارامتر TI برای ارزیابی حساسیت گیاه در تنش فلزات سنگین استفاده شده است (Moradi & Sadaghiani, 2019; Ng et al., 2019).

al., 2020) و کاهش شاخص تحمل در تنش‌های شدید به‌خصوص تنش هم‌زمان چند فلز نسبت به تنش یک فلز گزارش شده است (Ng et al., 2020).



شکل ۴- تاثیر پساب شهری بر الف) شاخص جذب و ب) شاخص تحمل گیاهان نخل مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در نمودار مقادیر میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان‌گر فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال (P ≤ 0.05) است.

Figures 4. The effects of urban wastewater on (A) the uptake index and (B) tolerance index of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. The data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

قند محلول کل

طبق شکل ۵- الف، سه گیاه بررسی شده، الگوی مشابهی در تغییرات قند محلول کل برگ نداشتند، به‌طوری‌که قند محلول کل در گیاهان نخل مرداب و وتیور به ترتیب افزایش ۲۵/۷۹ و ۳۵/۵۲ درصدی داشت و در گیاه آلوئه‌ورا کاهش ۱۴/۸۷ درصدی مشاهده شد. تجمع قند به‌عنوان نتیجه‌ای از تنش فلزات

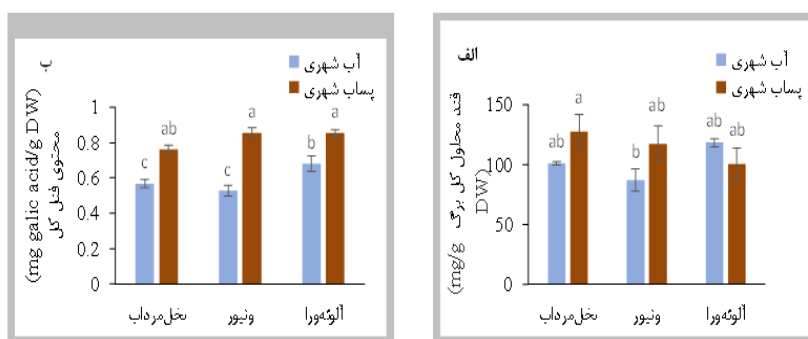
سنگین گزارش شده است که می‌تواند به مقاومت گیاه در برابر تنش کمک کند (Turakainen *et al.*, 2004; Hajiboland *et al.*, 2014; Aghaei *et al.*, 2019; Farjadi & Norastehnia, 2021). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد این افزایش احتمالاً مکانیسم سازشی گیاه برای حفظ پتانسیل اسمزی در شرایط تنش فلزات سنگین است. از طرفی با افزایش قندهای محلول، گیاه می‌تواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط تنش در حد مطلوب نگه دارد (WJeddi *et al.*, 2021; Turakainen *et al.*, 2004). البته مطالعاتی نیز از کاهش قند محلول گیاهان در تنش شدید و یا بلند مدت موجود است (Grace *et al.*, 2008) بنابراین همه گیاهان در شرایط تنش، تجمع قند ندارند (zan *et al.*, 2007).

محتوی فنل کل

با توجه به شکل ۵- ب، تحت تیمار پساب شهری، محتوی فنل کل در هر سه گیاه افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. بالاترین درصد افزایش (۶۵/۸۴ درصد) مربوط به گیاه وتیور بود و بعد از آن نخل‌مرداب و آلوئه‌ورا با درصد افزایش ۳۵/۸۴ و ۲۸/۱۷ قرار داشتند. در تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین، افزایش سطوح ترکیبات فنلی گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2019; Mishra & Singh, 2019; Farjadi & Norastehnia, 2021; Mohammadi *et al.*, 2022).

افزایش ترکیبات فنلی در تیمار پساب احتمالاً برای مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در تنش است. ترکیبات فنلی رایج‌ترین و وسیع‌ترین گروه از متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دفاعی بررسی شده در گیاهان هستند. گیاهان تحت تنش، مکانیسم‌های دفاعی

خاصی را از قبیل افزایش غلظت فنل کل در برابر استرس اکسیداتیو به کار می گیرند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از ویژگی اکسیداسیون- احیای آن هاست که می تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال های آزاد داشته باشد و مانع پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی شود (Joyce et al., 2005; Turumtay et al., 2014).



شکل ۵- تاثیر پساب شهری بر الف) قند کل محلول و ب) محتوی فنل کل گیاهان نخل مرداب، وتیور و آلوئه ورا.

در نمودار مقادیر میانگین $\pm$ SE تکرار ۳ است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان گر فقدان اختلاف معنی دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.

Figures 5. The effects of urban wastewater on (A) the total soluble of *Cyperus alternifolius* L., sugar and (B) total phenol contents The *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

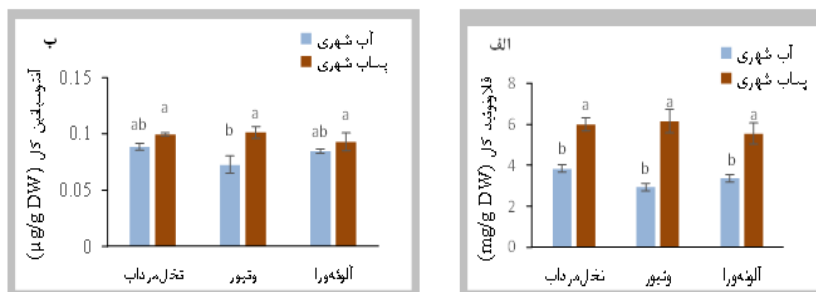
فلاونوئید کل

بر اساس نتایج، هر سه گیاه مورد بررسی در تغییرات میزان فلاونوئید کل، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد خود داشتند. در مطالعات گذشته نیز، افزایش فلاونوئید کل در تنش فلزات سنگین گزارش شده است (Farjadi & Norastehnia, 2021). با توجه به شکل ۶-الف، بالاترین افزایش در میزان فلاونوئید کل در گیاه وتیور مشاهده شد که به حدود سه برابر مقدار شاهد خود رسید. کم‌ترین افزایش در میزان فلاونوئید کل مربوط به گیاه نخل‌مرداب (۵۵/۲۶ درصد) بود. به نظر می‌رسد که هر سه گیاه مورد مطالعه در زمان تنش به علت تضعیف شدن سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی خود را افزایش دادند. فلاونوئیدها جزو ترکیبات فنلی می‌باشند که می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی، خاموش‌کننده و حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاهان عمل کنند. گزارش شده است گیاهان با تولید فلاونوئیدها و تجمع آن در لایه‌های اپیدرمی برگ و ساقه، می‌توانند باعث کاهش اثرهای تنش اکسیداتیو در پی تنش‌های محیطی شوند (Joyce et al., 2005).

آنتوسیانین کل

میزان آنتوسیانین کل نیز در گیاهان وتیور، نخل‌مرداب و آلوئه‌ورا تحت تیمار پساب شهری افزایش یافت. به‌طوری که به ترتیب افزایش ۴۰/۲۷، ۱۲/۵ و ۹/۵۲ درصدی نسبت به شاهد خود داشتند شکل (۶-ب). متداول‌ترین گروه فلاونوئیدهای رنگیزه‌ای، آنتوسیانین‌ها هستند که نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه می‌توانند از تولید بیشتر

آن‌ها در گیاه جلوگیری کنند. گیاهان با تولید و تجمع آنتوسیانین در لایه‌های اپیدرمی می‌توانند باعث کاهش اثرهای تنش اکسیداتیو شوند (Hare & Cress, 2007; Mishra & Singh, 2019).



شکل ۶- تاثیر پساب شهری بر الف) محتوی فلاونوئید کل و ب) آنتوسیانین کل در برگ گیاهان نخل مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در نمودار مقادیر میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان‌گر فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.

Figures 6. The effects of urban wastewater on (A) the total flavonoids and (B) of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) total anthocyanins. The data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

تانن کل

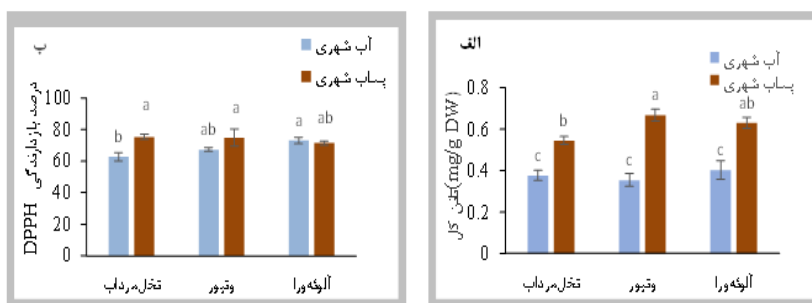
در هر سه گیاه مورد مطالعه، میزان تانن کل به طور معنی‌داری تحت تیمار پساب شهری افزایش یافت. بیش‌ترین درصد افزایش در میزان تانن نسبت به گیاه شاهد در گیاه وتیور با ۸۸/۵۷ درصد مشاهده شد و پس از آن، گیاه آلوئه‌ورا با ۵۷/۵ درصد افزایش در رتبه دوم قرار داشت (شکل ۷- الف). تانن کل نیز همانند فنل کل، جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که در

سطوح بالای تنش‌های محیطی می‌تواند افزایش یابد و نقش آنتی اکسیدانی ایفا می‌کند. تانن‌های گیاهی در تنش فلزات سنگین و از نظر کلات شدن با فلزات سنگین مورد توجه محققین هستند (Lavid *et al.*, 2001). گزارش شده است که تانن‌های موجود در گیاهان می‌توانند به عنوان جاذب رنگ‌ها، سورفکتانت‌ها و محصولات شیمیایی داخل پساب‌ها عمل کنند (Kavitha *et al.*, 2020).

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

نتایج نشان داد که تیمار پساب شهری باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH یا میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. در گیاهان نخل مرداب و وتیور به ترتیب افزایش ۲۰/۳۱ و ۱۱/۲۲ درصدی در میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده شد (شکل ۷-ب). در تحقیقات دیگر نیز افزایش درصد بازدارندگی در تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین گزارش شده است (Mishra & Singh, 2019; Arsenov *et al.*, 2021; Jeddi *et al.*, 2021). اما در گیاه آلوئه‌ورا کاهش ۲/۲۱ درصدی (نسبت به گیاهان شاهد خود) در میزان درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH ایجاد شد. در برخی مطالعات نیز در تنش‌های شدید محیطی، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (Nokandeh *et al.*, 2015). به طور کلی تنش‌های غیرزیستی مسیرهای درگیر در بیوسنتز سه گروه اصلی از متابولیت‌های ثانویه شامل ترپن‌ها، فنل‌ها و ترکیبات حاوی نیتروژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و احتمالاً از این طریق مقادیر آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش و یا کاهش می‌دهند (Erturk *et al.*, 2007; Kabiri *et al.*, 2017; Mishra & Singh, 2019). تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دیده شده در دو گیاه وتیور و نخل مرداب مشابه با تغییرات میزان فنل کل بود که در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است که افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار

رایکال آزاد افزایش می‌دهد. اما در گیاه آلوئه‌ورا علی‌رغم افزایش فنل، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان افزایش معنی‌داری نداشت که می‌توان آن را به تفاوت در ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی دانست و ممکن است با وجود بالا بودن میزان فنل (فنل‌های با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کم)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم شده باشد (Klimczak et al., 2007; Nokandeh et al., 2015).



شکل ۷- تاثیر پساب شهری بر الف) تانن کل و ب) درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در برگ گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در نمودار مقادیر میانگین $\pm$ SE تکرار ۳ است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیان‌گر فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $(P \leq 0.05)$ است.

Figures 7. The effects of urban wastewater on (A) the total tannins and (B) DPPH radical-scavenging percentage of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. The data represents the average of three replicates $\pm$ standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p \leq 0.05$.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس داده‌های به‌دست آمده از عوامل بررسی شده در این تحقیق، هر سه گیاه نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا توانایی انباشت فلز را داشتند، اما دو گیاه وتیور و آلوئه‌ورا از نظر شاخص انباشت هم‌زمان فلزات نسبت به گیاه

نخل مرداب موفق تر بودند و به نظر می‌رسد به طبع انباشت فلز زیاد، تحت تنش بیش‌تری نسبت به گیاه نخل مرداب قرار گرفتند. طبق نتایج، گیاه آلوه‌ورا تحت تیمار پساب شهری در خصوصیات مورفولوژیکی، زیست‌توده کل، شاخص جذب، شاخص تحمل و همچنین قند کل، درصد کاهش بیش‌تری نشان داد و گیاه نخل مرداب و وتیور بهتر بودند. علاوه بر این، نتایج عوامل بررسی شده نشان داد که گیاه وتیور در عین این‌که انباشت فلز بیش‌تری در تیمار پساب شهری داشت و در پالایش موفق بود، توانست با بالا بردن قند محلول کل، فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل، تانن کل و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، مقاومت بهتری داشته باشد. بنابراین در رتبه اول وتیور به عنوان گیاه پالایشگر برای کشت و ایجاد کمربند سبز در خاک پساب شهری سراوان پیشنهاد می‌شود. البته با توجه به پالایش قابل توجه فلزات در گیاه آلوه‌ورا، همچنین پیشنهاد می‌شود از گیاه آلوه‌ورا برای کشت و ایجاد کمربند سبز در خاک آلوده مسیرهای خروجی پساب شهری (با فاصله دورتری از محل اصلی دفن زباله شهری سراوان) استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق آن‌ها را یاری کردند، اعلام دارند.

عدم تعارض منافع

در این راستا منافع تجاری وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

فهرست منابع

- Adriano, D. C. (2001). Trace Elements in Terrestrial Environments; Biochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Springer-Verlag, New York.
- Ainsworth, E. A. and Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, Nature Protocols, 2(4): 875-877.
- Aghaei, K., Rahkhosravani, B., Moghanlu, L. and Ghotbi Ravandi, A. A. (2019). Study of the effect of cadmium accumulation on some physiological and biochemical characteristics of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Plant Process and Function, 8 (33):107-122. (In Persian).
- AL-Oud Saud, S. (2003). Heavy Metal Contents in Tea and Herb Leaves. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6: 208-21.
- Arsenov, D., Zupunski, M., Pajević, S., Nemes, I., Simin, N., Alnuqaydan, A. M. and Mimica-Dukic, N. (2021). Roots of *Apium graveolens* and *Petroselinum crispum*-Insight into phenolic status against toxicity level of trace elements. Plants, 10(9): 1785.
- Bi, R., Schlaak, M., Siefert, E., Lord, R. and Connolly, H. (2011). Influence of electrical fields (AC and DC) on phytoremediation of metal polluted soils with rapeseed (*Brassica napus*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). Chemosphere, 83:318–26.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182.
- Erturk, U., N. Sivritepe, C. Yerlikaya, M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan. (2007). Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro. Biologia Plantarum, 51: 597-600.
- Farjadi, M. and Norastehnia, A. (2021). The effects of heavy metal mercury on some physiological responses in *Nicotiana Tabacum*. Nova Biologica Reperta, (8): 118-129. (In Persian).
- Grace, O. M., Simmon, M. S. J., Smith, G. F. and Van Wyk, A. E. (2008). Therapeutic uses of *Aloe* L (Asphodelaceae) in Southern Africa. Journal Ethnopharmacology, 119,604-614.

- Hare, P.D. and Cress, W.A. (2007). Metabolic implications of stress-induced accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21:79–103.
- Hatano, H. K. T., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989). Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effect. *Chemistry and Pharmacology Bulletin*, (36): 1090-1097.
- Hajiboland, R., Keyvanfar, N., Joudmand, A., Rezaee, h. and Yousefnejad, m. (2014). Effect of selenium Treatment on Drought Tolerance of Canola Plants. *Iranian Journal of Biology*, 27(4): 557-568. (In Persian).
- Hosseini, Z. and Pourakbar, L. (2013). Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays* L. *Journal of Plant Biology*, 16: 1-12. (In Persian).
- Jalali, M. and Hemati Matin, N. (2019). Nutritional status and risks of potentially toxic elements in some paddy soils and rice tissues. *International Journal of Phytoremediation*, 18: 1-9.
- Jeddi, K., Siddique, K. H., Chaieb, M., and Hessini, K. (2021). Physiological and biochemical responses of *Lawsonia inermis* L. to heavy metal pollution in arid environments. *South African Journal of Botany*, 143: 7-16.
- Joyce, C., Pennycooke, S. and Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in *Petunia*, (*Petunia* × *hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53: 225-232.
- Kavitha, V. U. and Kandasubramanian, B. Tannins for wastewater treatment. (2020). *SN Applied Sciences*, 2: 1081 (2020).
- Kibria, M. Gh. and Hoque, Md. (2017). Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science*, 24: 155-162.
- Klimczak, I., Maecka, M., Szlachta, M. and Gliszczyn, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 313-322.
- Kouhi, S. M. M. and Moudi, M. (2020). Assessment of phytoremediation potential of native plant species naturally growing in a heavy metal-polluted saline-sodic soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(9): 10027-10038.

- Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S. K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R. and Thukral, A. K. (2019). Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1): 1-21.
- Lavid, N., Schwartz, A. and Yarden, A. (2001). The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta*, 212: 323–331.
- Ling, W., Shen, Q., Gao, Y., Gu, X. and Yang, Z. (2008). Use of bentonite to control the release of copper from contaminated soils. *Soil Research*, 45(8): 618-623.
- Liu, Y. J., Zhu, Y. G. and Ding, H. (2007). Lead and cadmium in leaves of deciduous trees in Beijing, China: development of a metal accumulation index (MAI). *Environmental Pollution*, 145: 387-390.
- Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science*, 164: 2: 259 - 265.
- Mishra, B. and Singh Sangwan, N. (2019). Amelioration of cadmium stress in *Withania somnifera* by ROS management: active participation of primary and secondary metabolism. *Plant Growth Regul*, 87: 403-412.
- Mohammadi, S., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S. and Popovic-Djordjevic, J. (2021). The effect of EDTA and citric acid on biochemical processes and changes in phenolic compounds profile of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under mercury stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111607.
- Mohsenzadeh, S., Naderi, N. and Nazari, M. (2016). Physiological responses of *Vetiver zizanioides* to municipal waste leachate. *Plant Biology*, 8 (28) :79-96.
- Moradi, N. and Rasouli-Sadaghiani, M. (2019). The assessment of the potential of two rangeland plants for absorption and accumulation of lead (Pb) in a contaminated calcareous soil. *Journal of Agricultural Engineering Soil Science and Agricultural Mechanization. Scientific Journal of Agriculture*, 42(2), 115-130.
- Nakbanpote, W., Panitlertumpai, N., Sukadeetad, K., Meesungneon, O., and Noisa-nguan, W. (2010). Advances in phytoremediation research: a case

- study of *Gynura pseudochina* (L.) DC. Advanced knowledge application in practice. Sciyo, Croatia. 353-378.
- Ng, C. C., Boyce, A. N., Abas, M. R., Mahmood, N. Z. and Han, F. (2020). Evaluation of vetiver grass uptake efficiency in single and mixed heavy metal contaminated soil. *Environmental Processes*, 7(1): 207-226.
- Nokandeh, S. E., Mohammadian, M. A., Damsi, B. and Jamalomidi, M. (2015). The effect of salinity on some morphological and physiological characteristics of three varieties of (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 16(4), 498-507.
- Nokande, S.E., Razavi, S.M. and Mohammadian, M.A. (2022). The capacity of heavy metal remediation by *Cyperus alternifolius*, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty, and *Aloe vera* (L.) Burm.f. under industrial and urban wastewater treatment. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 21(4): e2022057.
- Omidbaigi, R. (2008). Production and processing of medicinal plants. 1st Ed, Beh-Nashr publication. Mashhad. pp: 112.
- Petoussi, M. A. and Kalogerakis, N. (2022). Olive mill wastewater phytoremediation employing economically important woody plants. *Journal of environmental management*, 302: 114076.
- Pilon Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15–39.
- Placido, D. F. and Lee, C. C. (2022). Potential of industrial hemp for phytoremediation of heavy metals. *Plants*, 11(5): 595.
- Ramirez-Sosa, D. R., Castillo-Borges, E. R., Mendez-Novelo, R. I., Sauri-Riancho, M. R., Barcelo-Quintalb, M. and Marrufo-Gomez, J. M. (2013). Determination of organic compounds in landfill leachates treated by Fenton-Adsorption. *Waste Management*, 33: 390-395.
- Richards, L. A. (1954). Agriculture, Handbook, phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant and Soil. US Department of Agriculture, Washington.
- Salt, D. E., Smith, R. D. and Raskin, I. (1998). Phytoremediation: Annual Rev Plant Physiology. *Plant Molecular Biology*, 49: 643–668.
- Schlegel, H. G. (1956). Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. *Planta*, 47: 510-515
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Journal of Plant Physiology*, 17(1): 35–52.

- Tahmasbian, I. and Safari Sinegani, A. A. (2016). Improving the efficiency of phytoremediation using electrically charged plant and chelating agents. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3): 2479-2486.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2014). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Turakainen, M., Hartikainen, H. and Seppanen, M. M. (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52: 5378–5382.
- Turumtay, E. A., İslamoglu, F., Cavus, D., Sahin, H., Turumtay, H. and Vanholme, B. (2014). Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Industrial Crops and Products*, 52: 687-694.
- Uba, S., Uzairu, A. and Okunola, O. J. (2009). Content of heavy metals in *Lumbricus Terrestris* and associated soils in dump sites. *International Journal of Environmental Research*, 3(3): 353- 358.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2005). United States of Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standards. EPA 440/5-86-001, p. 273.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2021). <http://www.epa.gov/hw/household-hazardous-waste-hhw>.
- Usman A., Kuzyakov, Y. and Stahrk, L. a. (2005). Effect of immobilizing substances and salinity on heavy metals availability to wheat grown on sewage sludge-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination*, 14: 329-344.
- Walkley, A. and Black, I. A. (1934). An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1): 29-38.
- Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W. Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., Luo, H. B. and Li, S.H. (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC plant biology*, 10 (1): 34.

- Weinberg, Z. G., Ashbell, G., Chen, Y., Gamburg, M. and Sela, S. (2004). The effect of sewage irrigation on safety and hygiene of forage crops and silage. *Animal feed science and technology*, 116(3-4); 271-280.
- WHO. (2000). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. International Programme on Chemical Safety. WHO Food Additive Series 52.
- Yadollahi, P., Asgharipour, M. and Golshani, F. (2016). Effect of foliar application of Humic Acid on *Aloe vera* (*Aloe vera* L.) In Cadmium Contaminated Soil. *Journal of plant process and function*, 4: 51-59 (In Persian).
- Zoufan, P., Shiralipour, N. and Rastegharzadeh, S. (2016). Investigation of uptake and accumulation of zinc in *Malva parviflora*: a population collected from areas surrounding production industries of steel in Ahvaz. *Journal of Plant Process and Function*, 5 (15): 43-56
- Zoufan, P., Shiralipour, N. and Rastegharzadeh, S. (2018). Assessment of some growth indices and Cd accumulation in shoots and roots of *Malva parviflora* L. under hydroponic system. *Iranian Journal of Biology*. 31(2), 316-331. (In Persian).
- Zan, M. J., Chang, H. W., Zhao, P. L. and Wei, J. G. (2007). Physiological and ecological characters studies on *Aloe vera* under soil salinity and seawater irrigation. *Process Biochemical*, 42: 710–714.

بررسی اثر کلر بر زنده‌مانی و تغییرات فراساختاری

Acanthamoeba castellanii

زینب اسدی^۱، سمیه بهرامی^{۲*}، مهدی زارعی^۳، حسین حمیدی نجات^۴

چکیده

مقدمه: از کلر به عنوان یک گندزدای موثر در از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سیستم تصفیه آب شهری استفاده می‌شود. با این حال مطالعات نشان داده‌اند که *Acanthamoeba* از منابع آبی مختلف کشورمان علی‌رغم تصفیه جدا می‌شود. در این مطالعه به بررسی اثر غلظت‌های متداول کلر که در سیستم تصفیه آب شهری استفاده می‌شود بر زنده‌مانی *Acanthamoeba castellanii* و تغییرات فراساختاری ناشی از آن پرداخته شده‌است.

روش‌ها: تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *Acanthamoeba* در زمان‌های مختلف (۳۰ دقیقه، ۱ و ۲ ساعت) با غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ ppm) هیپوکلریت کلسیم، تیمار شدند. برای بررسی تغییرات فراساختاری تروفوزوئیت آمیب از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره استفاده شد.

نتایج و بحث: نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های متداول کلر قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *A. castellanii* نیست. همچنین کیست‌ها به غلظت‌های مختلف کلر مقاوم‌تر بوده و در زمان و غلظت برابر کلر، درصد کمتری از کیست‌ها در مواجهه با کلر از بین می‌روند. تغییر نفوذپذیری غشای سلولی، کاهش تعداد پاهای کاذب، افزایش میتوکندری، واکوئله شدن سیتوپلاسم و تغییر در شبکه‌ی اندوپلاسمی از تغییرات فراساختاری ایجاد شده در آمیب بود. این مطالعه ضرورت بازنگری دستورالعمل بکارگیری گندزداهایی نظیر کلر را در تصفیه‌ی سیستم آب شهری مطرح می‌کند. چرا که علاوه بر بیماری‌زا بودن آمیب، مخزن بودن آن و انتقال عوامل میکروبی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: آکانتاموبا کستلانی، تغییرات فراساختاری، کلر، زنده‌مانی.

۱. دانشجوی دکترای انگل‌شناسی بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران. اهواز، اهواز، ایران.
۲. نویسنده مسئول: دانشیار بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. پست الکترونیک: s.bahrami@scu.ac.ir
۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۴. استاد بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

مقدمه

آمیب‌های آزادی، از جمله *Naegleria fowleri* و *Acanthamoeba* انگل‌های تک‌یاخته‌ای فرصت‌طلب با گسترش جهانی هستند. این تک‌یاخته‌ها از مکان‌های مختلف از جمله هوا، آب، خاک، گرد و غبار، لنزهای تماسی، تجهیزات بیمارستانی و نمونه‌های بالینی جدا شده‌اند (Karamati et al., 2016; Niyyati et al., 2018). سبک زندگی آمفیزوئیک (Amphizoic) این تک‌یاخته‌ها به آن‌ها این امکان را می‌دهد که در شرایط مختلف محیطی زنده بمانند و باعث عفونت‌های انسانی شوند (Lekkla et al., 2005). آمیب‌های آزادی می‌توانند به عنوان عامل انتقال و یا محافظت گروهی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌هایی نظیر *Cryptococcus neoformans*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydomydia* و *Legionella* باشند (Thomas et al., 2010).

تک‌یاخته‌ی آزادی *Acanthamoeba* اولین بار توسط کاستلانی در حین کشت قارچ *Cryptococcus pararrayos* کشف شد (Castellani., 1930). این آمیب بعنوان عامل بالقوه‌ی بیماری‌زا در انسان شناخته شده است که در محیط‌های مختلف، گسترش یافته است. کراتیت *Acanthamoeba* بی‌بیماری چشمی ناشی از این تک‌یاخته است که تهدیدی برای سلامت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود و به سرعت در حال گسترش است (McKelvie et al., 2017; Król-Turmińska et al., 2018). همچنین آنسفالیت گرانولوماتوز آمیبی، پنومونی، آکانتاموبیاز پوستی و آکانتاموبیاز منتشر از جمله عفونت‌های تهدید کننده در زندگی انسان هستند که بر اثر *Acanthamoeba* ایجاد می‌شوند (Juárez et al., 2018).

چرخه‌ی زندگی *Acanthamoeba* شامل دو مرحله تروفوزوئیت و کیست است. در شرایط مساعد محیطی تروفوزوئیت‌ها دچار تقسیم میتوز می‌شوند و

قادر به فاگوسیتوز کردن باکتری‌ها و مخمرها هستند. تحت شرایط نامطلوب محیطی مانند گرسنگی، خشکی، هیپراسمولاریته و وجود عوامل بیوسیدال، تروفوزوئیت‌ها به کیست تبدیل می‌شوند (Neff. 1962; Weisman. 1976). کیست‌ها می‌توانند در شرایط مساعد محیطی به تروفوزوئیت‌ها متمایز شوند (Neff. 1962; Rubin et al., 1976). کیست *Acanthamoeba* نسبت به بسیاری از عوامل ضد عفونی کننده مقاوم است (Heaselgrave et al., 2016). بنابراین مطالعات زیادی همواره برای شناسایی ترکیبات جدید با اثر بیشتر و عوارض جانبی کمتر در حال انجام است. کلر از عوامل ضد میکروبی متداول در تصفیه‌ی آب، صنایع غذایی و دیگر بخش‌ها است.

کلر زنی یکی از روش‌های رایج تصفیه آب آشامیدنی و فاضلاب است که قابلیت غیر فعال کردن طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و کاهش میزان بیماری‌های میکروبی منتقله از آب آشامیدنی را دارد (Dunnick & Melnick., 1993). کلر در آب به اسید هیپوکلروس HOCL و هیپوکلریت ClO^- هیدرولیز می‌شود (Albrich et al., 1986). مشخص شده است که HOCL عمدتاً پوشش سلولی را مورد هدف قرار می‌دهد و حمل و نقل ATP، الکترون و متابولیت را مهار می‌کند. همچنین نفوذپذیری غشا را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث مهار سنتز DNA می‌شود (Albrich & Hurst., 1982). تاکنون زنده‌مانی تک‌یاخته‌هایی مانند *Cryptosporidium*، *Giardia* و *Entamoeba histolytica* در برابر بیوسیدهای مورد استفاده در تصفیه‌ی آب (کلر، مونوکلرامین و دی‌اکسید کلر) مورد بررسی قرار گرفته‌است (Maillard., 2004). اخیراً آمیب‌های آزادی مانند *Acanthamoeba* نیز به عنوان اهداف مهم در تصفیه‌ی آب در نظر گرفته شده‌اند (Loret & Greub., 2010). در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده‌است علی‌رغم استفاده از کلر

برای گندزدایی آب‌ها، آمیب *Acanthamoeba* در آب زنده مانده و جداسازی می‌گردد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های متداول کلر که برای گندزدایی آب و سطوح در صنایع کشورمان استفاده می‌شود بر آمیب *Acanthamoeba castellanii* بوده‌است. ضمن اینکه تغییرات فراساختاری تروفوزوئیت‌های مواجه شده با کلر در این مطالعه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مراحل مختلف آمیب

در این مطالعه از سویه‌ی استاندارد *A. castellanii* ATCC30010 استفاده شد. برای کشت تروفوزوئیت‌های *Acanthamoeba* از محیط PYG (Peptone Yeast Glucose) در فلاسک‌های 25 cm^2 استفاده شد. آمیب‌ها در دمای 26°C درجه‌ی سانتی‌گراد در محیط PYG انکوبه شدند و هر سه روز یکبار پاساژ جدیدی از آن تهیه می‌گردید. برای تبدیل تروفوزوئیت‌ها به کیست، تروفوزوئیت‌ها روی پلیت آگار بدون باکتری کشت داده شدند. پس از هفت روز کیست‌های ایجاد شده با محلول AS (*Amoeba salin*) شستشو داده شدند. محلول AS شامل دو محلول A و B است. برای تهیه‌ی محلول A، $1/2$ گرم کلرید سدیم، $0/04$ گرم سولفات منیزیم و 7 آب، $1/42$ گرم فسفات مونوهیدروژن سدیم، $1/36$ گرم فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم در 100 میلی-لیتر آب مقطر استریل حل گردید. محلول B نیز متشکل از $0/04$ گرم کلرید کلسیم دو آب در 100 میلی-لیتر آب مقطر استریل بود. محلول نهایی AS متشکل از 10 میلی‌لیتر محلول A و 10 میلی‌لیتر محلول B و 980 میلی‌لیتر آب مقطر است. pH محلول توسط KOH حدود $6/91$ تنظیم گردید. پس از

شست و شو با محلول AS، کیست‌ها با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و در نهایت در محیط PAS (Page's Amoeba Saline Solution) برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند (Zarei et al., 2019).

مواجهه‌ی آمیب با کلر

برای بررسی اثر کلر بر آمیب، در ابتدا از فلاسک حاوی آمیب کشت شده که به مرحله لگاریتمی رشد خود رسیده بود با استفاده از سمپلر مقدار ۲۰ میکرولیتر تروفوزوئیت برداشته شد. قبل از برداشت تروفوزوئیت‌ها به علت چسبندگی آنها، فلاسک حاوی آمیب روی کیسه یخ قرار داده شد تا به راحتی تروفوزوئیت‌ها از سطح فلاسک جدا شوند. تعداد آمیب‌ها به روش شمارش مستقیم و با استفاده از لام نئوبار و زیر میکروسکوپ اینورت شمارش گردید.

برای شمارش تروفوزوئیت *Acanthamoeba* از خانه‌ی مربوط به گلبول‌های سفید لام هموسیتومتر استفاده شد. لام نئوبار به صورت یک مربع به ابعاد ۳×۳ سانتی‌متر است که ۴ خانه‌ی آن مربوط به گلبول سفید و یک خانه‌ی مرکزی مربوط به شمارش گلبول‌های قرمز است. برای شمارش *Acanthamoeba*، تعداد تروفوزوئیت‌ها، ۴ خانه مربوط به WBC که شامل ۱۶ خانه‌ی کوچک است، در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. از آن جایی که طول و عرض هر خانه‌ی بزرگ ۱ میلی‌متر و ارتفاع بین لامل و خانه‌های لام حدود ۰/۱ میلی‌متر است، به این ترتیب حجم هر خانه‌ی بزرگ ۰/۱ میلی‌متر مکعب است. پس مقدار انگل در هر خانه ۰/۱ میلی‌متر مکعب شمارش شده و برای تبدیل آن به ۱ سی‌سی عدد بدست آمده در ۱۰۰۰۰ ضرب می‌گردد.

CC/تعداد آمیب = ۱۰۰۰۰ × میانگین تعداد آمیب انگل شمارش شده

۴خانه بزرگ WBC

مطابق مطالعات انجام گرفته تعداد تروفوزوئیت جهت مواجهه با رقت‌های مختلف کلر 10^6 آمیب در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Mogoa et al., 2010). آزمایش مواجهه، در پلیت ۶ خانه انجام شد و تروفوزوئیت‌ها با غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ ppm) هیپوکلریت کلسیم مواجه شدند. غلظت‌های انتخاب شده غلظت‌هایی است که به طور متداول برای کلر استفاده می‌شود. مواجهه بصورت سه تکرار و در سه زمان مختلف ۳۰ دقیقه و ۱ و ۲ ساعت انجام گرفت. ضمن اینکه برای هر تکرار و هر زمان یک نمونه کنترل که حاوی 10^6 تروفوزوئیت مواجهه نشده و رقیق شده با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در نظر گرفته شد. پس از مواجهه در زمان‌های تعیین شده از تیوسولفات سدیم ۰/۱ مولار به عنوان متوقف کننده واکنش استفاده شد و با استفاده از سمپلر به میزان ۲۰ میکرولیتر از این محلول به میکروتیوب‌ها اضافه گردید. با استفاده از لام نئوبار و رنگ حیاتی تریپان‌بلو زنده‌مانی آمیب‌ها بررسی شد. آمیب‌های مرده به رنگ آبی و آمیب‌های زنده بدون رنگ دیده شدند. بر اساس نتایج، بهترین زمان و غلظت برای LC50 (۵۰ درصد کشندگی) تعیین گردید و برای بررسی فراساختاری تروفوزوئیت‌ها با آن غلظت مواجه گردیدند.

بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر

برای بررسی تغییرات فراساختاری آمیب از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره استفاده و این تغییرات مورد بررسی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی نگاره یا FESEM (Field emission scanning electron microscopy) نوعی میکروسکوپ الکترونی است که قابلیت عکس‌برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد. در ابتدا درون هر

چاهک از پلیت ۶ چاهکه کشت سلولی یک صفحه آلومینیومی به ابعاد ۱×۱ cm که از قبل طراحی و استریل شده بود، قرار گرفته شد. تعداد 10^6 تروفوزوئیت شمارش و به آرامی بر روی صفحه آلومینیومی درون چاهکها منتقل شد و در نهایت با غلظت انتخابی کلر (۵ ppm) به مدت دو ساعت مواجه گردید. پس از اتمام دوره انکوباسیون دو ساعته، در زیر هود و در شرایط استریل مایع داخل چاهکها با کمک سمپلر به آرامی تخلیه شد و فرصت داده شد که صفحات آلومینیومی داخل چاهکها خشک شوند. سپس سلولهای روی صفحات آلومینیومی با استفاده از گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد سرد به مدت ۲ ساعت فیکس گردیدند. در نهایت گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد درون چاهکها تخلیه و و بعد از خشک شدن صفحات آلومینیومی، سلولهای روی صفحات با سریال الکلی ۲۰ الی ۱۰۰ درصد و برای هر سریال به مدت ۵ دقیقه آگیری شدند. پس از اتمام مرحله آگیری و پس از خشک شدن، صفحات در یک محفظه از قبل طراحی شده قرار گرفتند و در مکانی با دمای مناسب و عاری از گرد و خاک نگهداری شدند. در نهایت جهت بررسی مطالعات ریخت شناسی و سایر مطالعات به مرکز میکروسکوپ الکترونی مستقر در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. با این روش تصاویر سه بعدی از ساختار، نمونه به دست می آید.

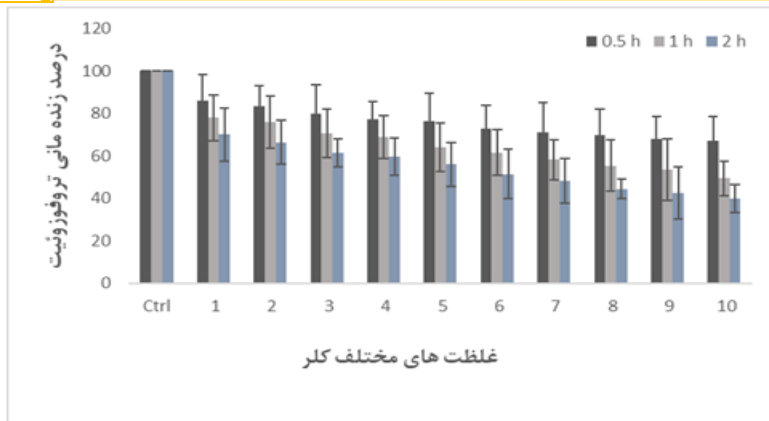
برای بررسی تغییرات فراساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره یا TEM (Transmission electron microscopy) تعداد 10^6 تروفوزوئیت شمارش و به میکروتیوب منتقل شد و با غلظت انتخابی کلر (۵ ppm) به مدت دو ساعت مواجه گردید. بعد از اتمام زمان گرماگذاری و خارج کردن محلولها، با اضافه کردن گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد سرد به مدت ۲ ساعت، سلولها تثبیت شده و سپس با شستشو با یک پیت پاستور استریل

سلول‌ها از دیواره فلاسک جدا شده و به یک فالکون استریل منتقل و به مدت ۷ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد، مجدداً گلو تار آلدیئد ۲/۵ درصد سرد به رسوب اضافه شده و به آرامی پی پتینگ کرده و به یک میکروتیوب استریل منتقل گردید و به مدت ۷ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مشخصات سلول‌ها، تاریخ و نوع ماده فیکس کننده بر روی میکروتیوب درج و به مرکز تحقیاتی انسیتو پاستور ایران جهت تهیه بلوک، برش و مقاطع، رنگ آمیزی و عکسبرداری ارسال شد.

نتایج و بحث

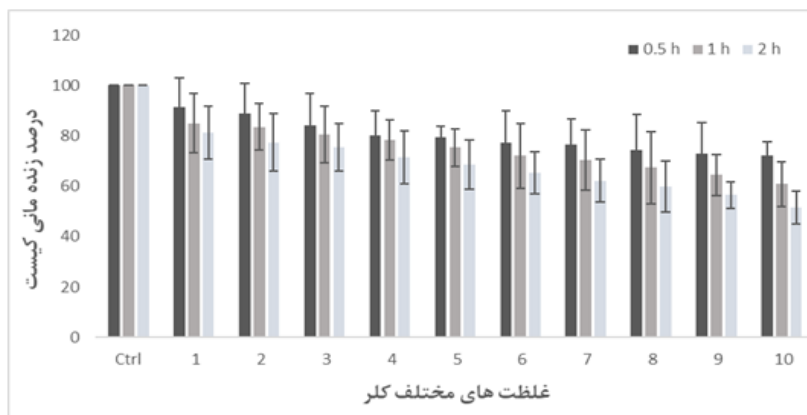
نتایج مواجهه‌ی تروفوزوئیت و کیست *A. castellanii* با رقت‌های متداول کلر

همان‌طور که نمودارهای شکل ۱ و ۲ نشان می‌دهد غلظت‌های متداول کلر که به‌عنوان ضد عفونی کننده استفاده می‌شوند قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت‌ها و کیست‌های *A. castellanii* نیست. تروفوزوئیت‌های آمیب در نیم، یک و دو ساعت پس از مواجهه با کلر با غلظت ۱۰ ppm، به ترتیب ۶۷/۲، ۴۹/۵ و ۳۹/۸ درصد زنده بودند. این در حالیست که کیست‌های *A. castellanii* در نیم، یک و دو ساعت پس از مواجهه با کلر با غلظت ۱۰ ppm، به ترتیب ۷۲/۱، ۶۰/۸ و ۵۱/۴ درصد زنده بودند. بنابراین نتایج تست مواجهه نشان داد که کیست‌ها مقاوم تر بوده و در زمان و غلظت برابر کلر، درصد کمتری از آن‌ها در مواجهه با کلر از بین می‌روند.



شکل ۱- نمودار مواجهه‌ی تروفوزوئیت‌های *A. castellanii* با غلظت‌های مختلف کلر (۱-۱۰ ppm) در سه زمان نیم، یک و دو ساعت را نشان می‌دهد. Ctrl: کنترل

Figure 1. The chart shows the exposure of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites to different concentrations of calcium hypochlorite (1-10 ppm) in 30 minutes, 1, and 2 hrs.

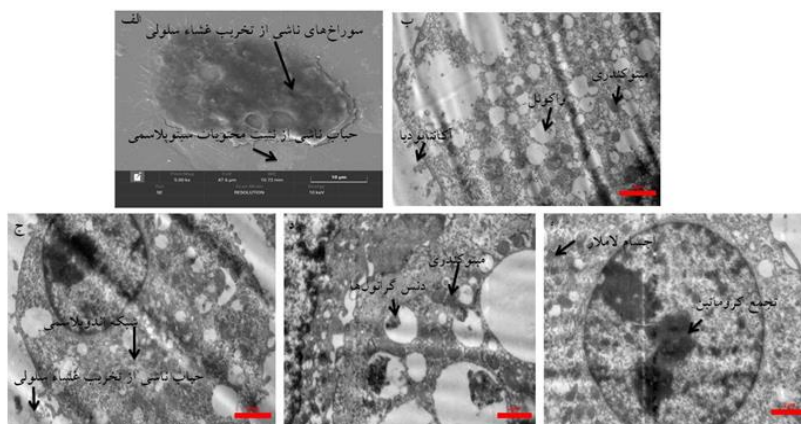


شکل ۲- نمودار مواجهه‌ی کیست‌های *A. castellanii* با غلظت‌های مختلف کلر (۱-۱۰ ppm) در سه زمان نیم، یک و دو ساعت را نشان می‌دهد. Ctrl: کنترل

Figure 2. The graph shows the exposure of *Acanthamoeba castellanii* cysts to different concentrations of calcium hypochlorite (1-10 ppm) in 30 minutes, 1, and 2 hrs.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر در غلظت ۵ ppm با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره

در تصاویر حاصل از میکروسکوپ FESEM کاهش اندازه تروفوزوئیت، تغییر شکل سلول و گرد شدن آن مشاهده شد. در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM بطور دقیق تر برخی از آکانتاپودیها دو شاخه شده و تبدیل به پای کاذب پیژپودیوم شده بودند. در بررسی فراساختاری مشخص گردید که غشای پلاسمایی سلول های مواجه شده آسیب دیده است. این آسیب ها همراه با نشت محتویات سیتوپلاسمی و حضور حباب بر روی سطح آمیب بود (شکل ۳: الف و ج). تعداد واکوئل های سیتوپلاسمی در سلول های مواجه شده با کلر افزایش یافت (شکل ۳: ب). همچنین در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM افزایش تعداد میتوکندری ها دیده شد (شکل ۳: ب و د). با افزایش تعداد میتوکندری ها و از هم گسیختگی آن ها اجسام لاملار دیده شد که این امر ممکن است با فرایند تخریب میتوکندری مطابقت داشته باشد (شکل ۳: د). پارگی شبکه اندوپلاسمی در سلول های مواجه شده و تغییر آن ها به وزیکول مشاهده شد (شکل ۳: ج). همچنین ظهور دنس گرانول ها احتمال وجود بقایای کلر در واکوئل ها را مطرح کرد (شکل ۳: د). از دیگر تغییرات، تغییرات در هسته همراه با تجمع کروماتین بود (شکل ۳: د).



شکل ۳- تغییرات فراساختاری در آمیب مواجه شده با هیپوکلریت کلسیم. الف: نشان دهنده تغییرات غشای سلولی، ایجاد منافذ روی تروفوزوئیت و حضور حباب ناشی از تخریب غشا تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ نگاره (FESEM) است. ب: نشان دهنده افزایش تعداد واکوئل‌ها، تغییرات میتوکندری و کاهش و تغییر در تعداد پاهای کاذب تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) است. ج: نشان دهنده تغییر در ساختار شبکه اندوپلاسمی و حضور حباب ناشی از تخریب غشای سلولی تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است. د: نشان دهنده وجود دِنس گرانول‌های ناشی از تغییرات سلولی تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است. ه: نشان دهنده تغییرات هسته و حضور اجسام لاملار ناشی از تخریب میتوکندری تروفوزوئیت مواجه شده با کلر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره است.

Figure 3. Ultrastructural changes of amoeba exposed to calcium hypochlorite. **A:** It shows cell membrane changes, the creation of pores on the trophozoite, and bubbles caused by the destruction of the trophozoite membrane exposed to chlorine using a field emission scanning electron microscope (FESEM). **B:** It shows an increase in the number of vacuoles, changes in mitochondria, and a decrease and change in the number of pseudopods of the trophozoite exposed to chlorine using the transmission electron microscope (TEM). **C:** It shows the change in the endoplasmic reticulum structure and the presence of bubbles caused by the destruction of the cell membrane of the trophozoite exposed to chlorine using the TEM. **D:** It shows the presence of dense granules caused by the cellular changes of trophozoites exposed to chlorine using the TEM. **E:** It shows the changes in the nucleus and the presence of lamellar bodies caused by the destruction of trophozoite mitochondria exposed to chlorine using the TEM.

گونه‌های مختلف *Acanthamoeba*، سبب بیماری‌های قابل توجه، از جمله انسفالیت، ضایعات پوستی و کراتیت چشمی می‌شوند. بیشتر موارد آکانتاموبیاز به صورت کراتیت چشمی است که در افراد سالم استفاده کننده از لنز تماسی نرم گزارش می‌شود. این عفونت در افراد با ضعف سیستم ایمنی و مبتلایان به بیماری‌های مزمن، ممکن است، موجب ایجاد ضایعات ریوی، پوستی و مغزی شود. آب، یکی از مخازن مهم آمیب‌های آزادزی از جمله *Acanthamoeba* است و آب‌های آلوده می‌توانند یک منبع خطر برای گروه‌های مستعد، مانند افراد استفاده کننده از لنزهای تماسی، افراد دچار ترومای چشم و یا دچار ضعف سیستم ایمنی باشد. علاوه بر این، برخی ارگانیسم‌ها، مانند *Vibrio cholerae* و *Legionella* قادر هستند که داخل این آمیب‌ها رشد و تکثیر داشته باشند که این مسئله نیز از نظر بهداشت عمومی و انتقال بیماری‌ها حائز اهمیت است. در مطالعه‌ی شهنی (۱۳۹۷) از مجموع ۱۰۰ نمونه‌ی آب جمع‌آوری شده از مکان‌های مختلف استان خوزستان (اهواز، آبادان، ماهشهر، مسجدسلیمان، بهبهان، شوشتر، سوسنگرد، باغ‌ملک و دزفول) که شامل کانال‌های کشاورزی، رودخانه‌ها و استخرهای شنا بود در ۵۶٪ آب‌های مورد مطالعه با روش ملکولی آلودگی به *Acanthamoeba* تشخیص داده شد (Eydi Shehni., 2018). در مطالعه‌ای که توسط Eftekhar و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، میزان آنتی‌بادی علیه آمیب *Acanthamoeba* در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید ۵۷ درصد گزارش شد که این یافته شیوع بالای آمیب را در محیط نشان می‌دهد (Eftekhar et al., 2010). در تحقیقی که توسط Mahmoudi و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی آب‌های استان گیلان انجام گرفت، میزان شیوع آمیب *Acanthamoeba* ۷۰ درصد گزارش گردید (Mahmoudi et al., 2012). مطالعه‌ی Niyyati و

همکاران در سال ۲۰۱۲ روی رودخانه‌های اطراف شهر تهران مشخص کرد که ۸۰ درصد آب‌ها آلوده به آمیب *Acanthamoeba* بوده است (Niiyati et al., 2012). مطالعه‌ای دیگر توسط Badirzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۲۸ نمونه از چشمه آب گرم اردبیل نشان داد که ۴۳ درصد نمونه‌ها آلوده به آمیب *Acanthamoeba* بوده است (Badirzadeh et al., 2011). در مطالعه‌ای که توسط Nazar و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی آب‌های میادین و پارک‌های شهر تهران انجام دادند، میزان شیوع ۳۲ درصد و ۸۷/۵ درصد ژنوتیپ آن‌ها T₄ گزارش شد (Nazar et al., 2011). مطالعه‌ی دیگر توسط Bagheri و همکاران در سال ۲۰۱۰ در آب شیر بیمارستان ایران بر پایه‌ی مطالعه‌ی مورفولوژیکی نشان داد میزان آلودگی آب شیر بیمارستان‌های شهر اهواز ۵۰ درصد است که این موضوع خطر ابتلا در بیمارستان‌ها را نشان داده و بیش‌تر در مورد افراد نقص ایمنی حائز اهمیت است (Bagheri et al., 2010). در مطالعه‌ی Niiyati و همکاران در سال ۲۰۱۲ از میان ۱۰ نمونه آزمایش شده از منابع محیطی مختلف از جمله خاک، آب و مدفوع حیوان، ژنوتیپ غالب T₄ گزارش شده است (Niiyati et al., 2012). بنابراین مطالعات مذکور نشان می‌دهد که آب‌های مناطق مختلف آلوده به آمیب *Acanthamoeba* با غالبیت ژنوتیپ T₄ است.

کلر به عنوان یک ضدعفونی‌کننده اکسیداتیو به طور گسترده برای ضدعفونی کردن سطوح و حذف بیوفیلم‌ها، در سیستم‌های توزیع آب و به طور عمده در تصفیه‌ی آب آشامیدنی استفاده می‌شود. مکانیسم اثر کلر تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق فرایند فنتون است. رادیکال‌های آزاد ترکیبات به‌شدت واکنش‌پذیر هستند که می‌توانند به ماکرومولکول‌ها آسیب بزنند. هنگامی که تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و

رادیکال‌های آزاد از بین رود، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که در این صورت به بیومولکول‌های حیاتی آسیب وارد می‌گردد. این آسیب‌های برگشت ناپذیر منجر به تغییر در عملکرد سلول و یا مرگ سلول می‌شود (2004 Maillard).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات ساختاری و فراساختاری آمیب مواجه یافته با کلر در غلظت ۵ ppm با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره نشان داد که تروفوزوئیت مواجه یافته با کلر با کاهش اندازه، تغییر شکل و گرد شدن سلول همراه است. این امکان وجود دارد که از بین بردن قدرت تحرک *A. Castellanii* اولین هدف کلر باشد. همچنین تصاویر نشان داد که تعداد آکانتاپودیها در آمیب مواجه شده کاهش می‌یابد. آکانتاپودیا در چسبندگی به سطوح و کسب غذا موثر است و تنها در مرحله‌ی تروفوزوئیت آمیب دیده می‌شود. این ساختارها به دلیل اتصال به اپیتلیوم قرنیه در پاتوژن *Acanthamoeba* نقش دارند و برای ایجاد عفونت در انسان ضروری هستند (Khan, 2008). این تغییرات ممکن است به دلیل اثر تخریب کنندگی کلر به واسطه یک مکانیسم فعال با استفاده از تغییر در اکتین رخ دهد که منجر به تخریب پاهای کاذب شود. در مطالعه Fatimah و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر کلرگزیدین گلوکونات بر *Acanthamoeba* نشان داد که ساختار آکانتاپودیها دچار تغییر شده و تحت تاثیر این ماده تعداد آنها کاهش می‌یابد (Fatimah & Nakisah., 2013). در تصاویر حاصل از میکروسکوپ TEM بطور دقیق‌تر برخی از آکانتاپودیها دوشاخه شده و تبدیل به پای کاذب پیژپودیوم شده بودند. از دیگر آسیب‌های ایجاد شده در سلول مواجه شده با کلر، آسیب غشا پلاسمایی همراه با نشت محتویات سیتوپلاسمی و حضور حباب بر روی سطح آمیب بود. تغییرات غشایی مربوط به هجوم Ca^{+2} یکپارچگی غشا را به خطر می‌اندازد. بیوسیدهای کاتیونی هیپوکلریت کلسیم

در غشا سیتوپلاسمی اختلال ایجاد می کنند و در pH قلیایی، پروتئین های سطحی با بار منفی آمیب با کاتیون های بیوسید در تعامل هستند در نتیجه نشت یون ها، آب و اجزا سیتوپلاسمی اتفاق می افتد و سلول تخریب می شود (Korn et al., 1974). از طرف دیگر همان طور که پیش از آن اشاره شد مکانیسم اثر کلر تولید ترکیبات رادیکال آزاد است. این ترکیبات به ماکرومولکول هایی نظیر لیپیدها آسیب می زنند. آسیب ناشی از کلر به لیپیدهای غشای سلولی می تواند باعث از بین رفتن یکپارچگی غشا و افزایش نفوذپذیری آن شود. افزایش تعداد میتوکندری از دیگر یافته های مطالعه ی حاضر بود. میتوکندری در سلول های یوکاریوت در زنجیره انتقال الکترون، فعالیت های متابولیکی مرتبط با تغذیه، حرکت، تولیدمثل، و تنظیم مرگ سلول دخالت دارد. با افزایش تعداد میتوکندری ها و از هم گسیختگی آن ها اجسام لاملار دیده می شود که این امر ممکن است با فرایند تخریب میتوکندری مطابقت داشته باشد. این احتمال وجود دارد که آسیب به میتوکندری و متلاشی شدن کریستای آن از اهداف دیگر استرس اکسیداتیو ناشی از کلر باشد. همچنین با استفاده از میکروسکوپ TEM تغییرات در هسته همراه با تجمع کروماتین مشاهده شد. شبکه اندوپلاسمی نقش مهمی در برقراری هموستاز کلسیم داخل سلولی دارد (Ferri & Kroemer., 2001). پارگی شبکه ی اندوپلاسمی در سلول های مواجه شده نیز مشاهده گردید. افزایش تعداد واکوئل ها و مشاهده شدن دنس گرانول ها در آن ها احتمال وجود بقایای کلر در سلول را می دهد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه نشان داده شد که غلظت‌های متداول مورد استفاده‌ی کلر به‌عنوان ماده‌ی ضدعفونی کننده قادر به از بین بردن کامل تروفوزوئیت و کیست‌های است. با این حال تغییرات فراساختاری در سطح سلول تروفوزوئیت آمیب پس از مواجهه با کلر ایجاد می‌شود. این تغییرات عمدتاً شامل تغییرات مورفولوژی سطح سلول و تغییر در ساختار هسته، شبکه اندوپلاسمی، واکوئله شدن و تغییرات در میتوکندری بود. تولید رادیکال‌های آزاد توسط کلر و ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به تغییرات در سلول و یا مرگ سلول می‌شود. این مطالعه ضرورت بازنگری دستورالعمل بکارگیری گندزداهایی نظیر کلر را مطرح می‌کند. چرا که علاوه بر بیماری‌زا بودن آمیب، مخزن بودن آن و انتقال عوامل میکروبی و حتی ویروسی نیز حائز اهمیت است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه کرد پایان-نامه‌های دانشجویان (پایان نامه دکتری تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان متعهد می‌شوند که مقاله مستخرج از آنالیزهای مطالعه بوده و در انجام مطالعه و آنالیز اطلاعات صداقت علمی بکارگرفته شده است. اسامی کلیه افرادی که در انجام این مطالعه کوشش نموده‌اند در مقاله آماده است. همچنین نویسندگان متعهد می‌شوند این مقاله به نشریه و یا ژورنال دیگری جهت داوری ارسال نشده است.

فهرست منابع

- Albrich. J.M., Gilbaugh 3rd. J.H., Callahan. K.B. and Hurst J.K. (1986). Effects of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation* 78: 177– 184.
- Albrich. J.M., Hurst. J.K. (1982). Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. *FEBS Letters* 144: 157– 161.
- Badirzadeh. A., Niyayati. M., Babaei. Z., Amini. H., Badirzadeh. H. and Rezaeian. M. (2011). Isolation of free-living amoebae from Sarein hot springs in Ardebil province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 6(2): 1-8.
- Bagheri. H.R., Shafiei. R., Shafiei. F. and Sajjadi. S.A. (2010). Isolation of *Acanthamoeba* spp. from drinking waters in several hospitals of Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 5(2): 19-25.
- Castellani. A. (1930). An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:160.
- Dunnick. J.K., Melnick. R.L. (1993). Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *Journal of National Cancer Institut* 85: 817-822.
- Eftekhari. M., Athar. A., Haghighi. A., Mosaffa. N., Shahram. F. and et al. (2010). Seroprevalence of *Acanthamoeba* antibodies in rheumatoid arthritis patients by IFAT, Tehran, Iran, 2007. *Iranian Journal of Parasitology* 5(1): 35-40.
- Eydi Shehni. G. (2018). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* and *Balamuthia* from water resources of Khuzestan province [dissertation]. Ahvaz Iran: Shahid Chamran Unive.
- Fatimah. H., Nakisah. m. (2013). Visualization on the effect of chlorhexidine gluconate, a biocide on *Acanthamoeba* sp by electron microscopy. *Malaysian Journal of Microscopy* 9: 154– 159.

- Ferri. K. F., Kroemer. G. (2001). Mitochondria the suicide organelles. Bioassays 23: 111 -115.
- Heaselgrave. W., Shama. G., Andrew. P.W. and Kong. M.G. (2016). Inactivation of *Acanthamoeba* spp. and other ocular pathogens by application of cold atmospheric gas plasma. Environmental Microbiology 82(10):3143-3148.
- Juárez. MM., Tártara L.I., Cid. A.G., Real. J.P., Bermudez. J.M., Rajal. V.B and et al. (2018). *Acanthamoeba* in the eye, can the parasite hide even more latest developments on the disease. Contact Lens & Anterior Eye Journals 41:245–251.
- Karamati. S.A., Niyiyati. M., Lorenzo-Morales. J. and Lasjerdi. Z. (2016). Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. Acta Parasitologica 61(4):784-9.
- Khan. N.A. (2008). *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. Journal of Medical Microbiology 57: 1051-1057.
- Korn. E., Dearborn. D. and Wright. P. (1974). Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoeba and identification of the water-soluble products of acid hydrolysis. Journal of Biological Chemistry 249: 3335- 3341.
- Król-Turmińska. K. and Olender. A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 24(2): 254–260.
- Lekkla. A., Sutthikornchai. C., Bovornkitti. S. and Sukthana. Y. (2005). Free-living ameba contamination in natural hot springs in Thailand, The Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine and Public Health 36:5.
- Loret. J.F., Greub. G. (2010). Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. International Journal of Hygiene and Environmental Health 213:167–175.
- Mahmoudi. M.R., Taghipour. N., Eftekhar. M., Haghighi. A. and Karanis P. (2012). Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. The Journal Parasitology Research 110(1): 473-477.

- Maillard. J.Y. (2004). Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization, 5nd ed. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication 589Pp. New York NY.
- McKelvie. J., Alshiakhi. M., Ziaei. M. and et al. (2018). The rising tide of *Acanthamoeba* keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation, diagnosis and outcomes (2009–2016). *Clinical and Experimental Ophthalmology* 46: 600–607.
- Mogoa. E., Bodet. C., Legube. B. and Hechard. Y. (2010). *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. *Experimental Parasitology* 126: 97–102.
- Nazar. M., Haghighi. A., Niyyati. M., Eftekhari. M., Tahvildar Biderouni. F., Taghipour. N. and et al. (2011). Genotyping of *Acanthamoeba* isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. *Journal of Water and Health* 9(3): 603-608.
- Neff. R.H. (1962). The biochemistry of amoebic encystment. *Symposia of Society Experimental Biology* 23:51-81.
- Niyyati. M., Lasjerdi. Z., Nazar. M., Haghighi. A. and Nazemalhosseini Mojarad. E. (2012). Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *Journal of Water and Health* 10(1): 140-146.
- Niyyati. M., Naghahi. A., Behniafar. H. and Lasjerdi. Z. (2018). Occurrence of free-living amoebae in nasal swaps of patients of intensive care unit (ICU) and critical care unit (CCU) and their surrounding environments. *Iranian Journal of Public Health* 4 (6):908.
- Rubin. RW., Hill. MC., Hepworth. P. and Boehmer. J. (1976). Isolation and electrophoretic analysis of nucleoli, phenol-soluble nuclear proteins, and outer cyst walls from *Acanthamoeba castellanii* during encystation initiation. *Journal of Cell Biology* 68:740-751.
- Thomas. V., McDonnell. G., Denyer. SP. and Maillard. J.Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 34(3):231-59.

- Weisman. R.A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. Annual Review Microbiology 30:189-219.
- Zarei. M., Ghahfarokhi. ME., Fazlara. A. and Bahrami. S. (2019). Effect of the bacterial growth phase and coculture conditions on the interaction of *Acanthamoeba castellanii* with *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei*. Journal of Basic Microbiology 59(7): 735-743.

بررسی مقایسه ای اثر تلقیح دو سویه باکتری محرک رشد تولید کننده سایدرופور (*Bacillus cereus* و *Enterobacter cloacae*) بر دسترسی آهن در نهال های پسته (*Pistacia Vera* L.)

فائقه بهرامی نژاد^۱، فاطمه نصیبی^۲، حکیمه علومی^۳، رزا عرب^{۴*}

چکیده

کمبود آهن یکی از مهم ترین مشکلاتی است که رشد گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهد. در این پژوهش اثر دو سویه باکتری محرک رشد تولید کننده سایدرופور (*Enterobacter cloacae* و *Bacillus cereus*) بر ویژگی های بیوشیمیایی نهال های پسته در شرایط فراهمی و کمبود آهن بررسی گردید. در این تحقیق که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد، آهن فریک (Fe^{+3}) و آهن فروس (Fe^{+2}) با غلظت ۲۰ میکرومولار به نهال هایی که به مدت یک ماه رشد کرده بودند داده شد. گیاهان فاقد آهن (آهن صفر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد آهن فریک در غلظت ۲۰ میکرومولار و آهن صفر باعث کاهش رشد گیاه و آسیب به آنها گردید. با به کارگیری باکتری های محرک رشد در گیاهان تیمار یافته با آهن فریک، برخی از پارامترهای رشد مانند وزن تر، رنگیزه های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی، قندهای محلول، پراکسیداسیون لیپیدها و پرولین بهبود یافتند. تیمار گیاهان با باکتری های محرک رشد همچنین منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاهان تیمار شده با آهن فریک گردیدند. باکتری های محرک رشد همچنین منجر به افزایش جذب آهن در اندام های هوایی نهال های تیمار شده با آهن فریک شدند. به نظر می رسد در گیاهان تیمار شده با آهن فریک، باکتری های محرک رشد با تولید سایدرופور منجر به احیا آهن و افزایش آهن در دسترس گیاه و تخفیف تنش کمبود آهن شدند.

واژگان کلیدی: آهن فریک، باکتری های PGPR، پراکسیداسیون لیپید، کمبود آهن.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۲. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۳. دانشیار دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته کرمان.
۴. نویسنده مسئول: مربی گروه زیست شناسی، واحد بزم، دانشگاه آزاد اسلامی، بزم، ایران. پست الکترونیکی: rozaarab.iau@gmail.com

مقدمه

آهن جز عناصر کم مصرف گیاهان است که کمبود آن در کل جهان، یکی از مشکلات بزرگ کشاورزان است. برخی وظایف آهن در گیاهان عبارتند از: شرکت در واکنش های متابولیسمی گیاه بخصوص واکنش های اکسایش- احیا، جز اصلی برخی پروتئین ها و آنزیم ها، ایفای نقش در فرایندهای زیستی اساسی از قبیل فتوسنتز، سنتز کلروفیل، تنفس، تثبیت نیتروژن و مکانیسم های سنتز DNA از طریق عملکرد ریبونوکلوئتید ردوکتازها، کوفاکتور بسیاری از آنزیم های سنتز کننده هورمون های گیاهی مثل اتیلن و لیپواکسیژنازاها (Jeong & Connolly, 2009, Ferreira *et al.*, 2019). به طور کلی، آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+})، فرم قابل جذب برای گیاهان نیست و آهن دو ظرفیتی به فرم (Fe^{2+}) شکل اصلی آهن قابل جذب گیاهان است به همین دلیل گیاهان زیادی دچار کمبود آهن می شوند و باید برای برطرف شدن کمبود، به این گیاهان کود آهن داد (Rout & Sahoo, 2015). سایدرופورها و فیتوسایدرופورها به عنوان شلاتور مخصوص Fe^{3+} با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۵۰۰ Da) هستند که کمپلکس هایی را با آهن آزاد تشکیل می دهند و از طریق گیرنده های غشایی آن را وارد سلول می کنند (Johnstone and Nolan, 2015; Saha *et al.*, 2016). اتصال قوی بین Fe^{3+} و سایدروفر کمپلکس را در برابر هیدرولیز و تخریب آنزیمی در محیط محافظت می کند (Winkelmann, 2007).

امروزه برای برطرف کردن کمبود برخی عناصر تغذیه ای از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی استفاده می شود. کودهای زیستی میکروارگانیسم های مفید خاکری می باشند که در بستری از مواد نگهدارنده خاک حضور دارند. به عبارت دیگر این نوع کودها دارای گونه های باکتریایی مؤثر برای تأمین عناصر غذایی گیاهان هستند. میکروارگانیسم های موجود در این کودهای

زیستی، عناصر غذایی غیر قابل جذب را به مواد غذایی قابل جذب برای گیاه تبدیل می کنند. تبدیل این عناصر به مواد غذایی مورد نیاز گیاه فرآیند بیولوژیکی است که توسط این میکروارگانیسم ها انجام می شود (Rahmani, 2010, Ramesh, 2013). از جمله کودهای زیستی می توان به کودهای زیستی حاوی باکتری های محرک رشد گیاهی (Plant Growth Promotion Rhizobium یا PGPR) ها اشاره کرد. PGPR ها، از انواع باکتری های خاک بوده و در فعالیت های زیستی اکوسیستم خاک درگیر هستند و به نوبه ی خود در جذب مواد غذایی برای تولید محصول و افزایش رشد و افزایش حاصلخیزی و... نقش دارند. درجه ارتقا رشد به نوع گیاه و نوع باکتری بستگی دارد (Do Amaral *et al.*, 2016). PGPR ها دارای توانایی هایی از جمله تجزیه ی مواد آلی، افزایش تحمل گیاه به تنش، افزایش عملکرد گیاه، اثر بر سوخت و ساز گیاه، اثر بر فرایندهای سلولی و بیوسنتز گیاه، کاهش آلاینده های آلی، بهبود ساختار خاک آلوده به وسیله ی جداسازی فلزات سنگین و سمی، تحریک رشد ریشه و تنظیم سطح تنظیم کننده های گیاهی مثل: اکسین، اتیلن، جیبرلین و سیتوکینین می باشند (Do Amaral *et al.*, 2016, Cassán *et al.*, 2016). همچنین انحلال برخی عناصر مثل Fe و P، تثبیت نیتروژن، سنتز ویتامین ها، حفاظت در برابر پاتوژن و یا مهار آن ها، القای مقاومت سیستمیک در گیاهان و... از دیگر توانایی های آن ها می باشد (Ferreira *et al.*, 2019). علاوه بر این، طیف گسترده ای از PGPR ها دارای صفاتی از قبیل تولید سایدرافور، ۱-آمینو سیکلو پروپان ۱-کربوکسیلات (ACC)، هیدروژن سیانید (HCN)، فعالیت های نیتروژنازی، تولید اگزوپلی ساکاریدها (ESP) و ترشح آنتی بیوتیک می باشند (Singh *et al.*, 2015; Do Amaral *et al.*, 2016; La Torre-Ruiz *et al.*, 2016).

گیاهان آهن را به فرم دو ظرفیتی یا فرو (Fe^{2+}) جذب می کنند در حالیکه عمده آهن موجود در خاک به فرم سه ظرفیتی یا فریک (Fe^{3+}) است و بنابراین برای گیاهان قابل جذب نمی باشد و عموماً از دسترس گیاهان و میکروارگانیسم ها خارج است به همین دلیل در اکثر موارد کمبود آهن به دلیل موجود نبودن آهن در خاک نیست بلکه به دلیل در دسترس نبودن آهن و غیر قابل جذب بودن آن برای گیاه است. برخی میکروارگانیسم ها دارای مکانیسم های تکامل یافته ای هستند که باعث جذب آهن می شوند، این میکروارگانیسم ها با تولید سایدرופورها که تمایل زیادی برای اتصال به آهن دارند، جذب آهن را افزایش می دهند (Williamson et al., 2013, Fukushima, 2021). باکتری های تولید کننده سایدرופور، هم باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی را شامل می شوند. در باکتریها، کمپلکس سایدرופور- آهن تشکیل می شود و در غشا باکتری ها فرآیند کاهش رخ می دهد و Fe^{3+} به Fe^{2+} تبدیل می شود و در دسترس گیاه قرار می گیرد (Sah & Singh, 2015).

پسته از مهم ترین محصولات کشاورزی است و حدود 80 درصد سطح زیر کشت و تولید آن مربوط به استان کرمان است. شرایط حاکم بر باغ های پسته، مانند شوری آب آبیاری، بالا بودن pH، مقدار کربنات کلسیم و بیکربنات، و پایین بودن درصد مواد آلی و همچنین در مواردی بالا بودن فسفر می تواند باعث مشکلات تغذیه ای و کاهش فراهمی عناصر کم مصرف از جمله آهن در خاک و در نتیجه کمبود آن در این گیاه شود (Mirzapour andkhoshgoftarmanesh, 2013). تحقیقات انجام شده در مورد وضعیت تغذیه ای درختان پسته، در مناطق پسته کاری استان کرمان نشان داده است که باغ های پسته با عملکرد پایین به طور کلی دارای ترتیب نیاز عناصر غذایی $Mn > Zn > K > Fe > N > Cu > P > Ca > B > Mg$ است که در

این توالی Fe در اولویت چهارم از نظر کمبود در باغ های با عملکرد پایین قرار دارد (حسینی فرد و همکاران ۱۳۹۶). نتایج حسینی فرد و همکاران (۱۳۹۸) نشان داد که محلول پاشی کودهای آهن بر روی درختان پسته دارای کمبود این عنصر، اثرات مثبتی روی کمیت و کیفیت پسته داشته و باعث کاهش میزان پوکی، زود خندانی پسته و ریزش جوانه های زایشی شده است (حسینی فرد و همکاران ۱۳۹۸). بنابراین با توجه به اهمیت عنصر آهن در مناطق پسته کاری ایران و محدودیت در شرایط جذب این عنصر از خاک های آهکی این مناطق، یک گزینه مهم برای بالابردن کیفیت و عملکرد گیاه پسته می تواند استفاده از باکتری های محرک رشدی باشد که قابلیت تولید سایدرופور را داشته باشد. هدف از این پروژه تحقیقاتی بررسی اثرات دو سویه (*Enterobacter cloacae* و *Bacillus cereus*) از باکتری های محرک رشد ریشه ای تولید کننده سایدرופور، در افزایش دسترسی به آهن در نهال های پسته بوده است.

مواد و روش های آزمایشگاهی

کشت باکتری

باکتریای های مورد استفاده در این تحقیق *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) بودند. این سویه های باکتری که تولید کننده سایدرופور هستند در محیط کشت Nutrient Broth Agar پتری در انکوباتور با دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت رشد کردند و پس از رشد، محیط کشت های جامد در یخچال نگهداری شدند. برای انتقال باکتری ها به خاک، ابتدا باکتری ها رشد کرده از محیط کشت

جامد به محیط مایع انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر - انکوباتور قرار داده شدند تا رشد کرده و سوسپانسیون باکتری تهیه گردید.

کشت گیاه

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه پسته (*Pistacia vera*) رقم احمد آقایی بود. بذرهای پسته از منطقه نوق رفسنجان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. بذرهای قبل از کشت با هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند، سپس سه بار با آب مقطر شستشو گردیدند. بذرهای ضد عفونی شده به مدت بیست و چهار ساعت در آب خیسانده شده و پس از آن در پارچه نخی مرطوب قرار گرفتند و روزی یکبار پارچه تعویض گردید. پس از جوانه زنی، به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند و به تعداد یک عدد در هر گلدان که حاوی ماسه بادی الک شده، اسید شویی شده و اتوکلاو شده بود، کاشته شدند. پس از جوانه زنی بذرهای هفته‌ای یکبار به هر گلدان ۲۰ سی سی از سوسپانسیون باکتری داده شد (این کار تا یک ماه ادامه داشت). گلدان‌ها به صورت یک روز در میان آبیاری شدند و هفته‌ای ۱ بار به آنها مقدار یکسان محلول غذایی هوگلند (با رقت ۱/۲) نیز داده شد. محلول هوگلند در این مرحله فاقد آهن بود (Afrousheh et al., 2010). سپس گلدان‌ها در زیر گروه‌های تیماری برای تیمار با آهن قرار داده شدند.

روش تیمار آهن

پس از بهینه‌سازی آهن با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار در آزمایشات مقدماتی، غلظت ۲۰ میکرومولار انتخاب شد.

محلول های آهن هفته ای یکبار به گیاهانی که به مدت یک ماه رشد کرده بودند، داده شد. این تیمار دهی به مدت ۴ هفته انجام گردید. در گلدان های تحت تیمار آهن Fe^{3+} ، به مقدار ۳۰ سی سی محلول آهن فریک (Fe^{3+}) ۲۰ میکرومولار و در گلدان های تحت تیمار آهن Fe^{2+} به مقدار ۳۰ سی سی محلول آهن فروس (Fe^{2+}) ۲۰ میکرومولار، به گلدان ها داده شد. در این پژوهش FeO به عنوان کنترل و تیمار فاقد آهن، Fe^{2+} به عنوان فرم آهن مورد استفاده گیاه و Fe^{3+} به عنوان فرم آهن غیر قابل استفاده برای گیاه در نظر گرفته شد.

تست سایدروفور

برای اطمینان از تولید سایدروفور در باکتری های مورد استفاده، تست سایدروفور انجام شد. برای انجام تست سایدروفور ابتدا نمونه های باکتری در محیط مایع M9 تلقیح شدند. پس از تلقیح، نمونه ها به مدت ۴ روز در شیکر-انکوبار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری به مدت ۴ روز محلول های سنجش CAS و شاتل برای تست سایدروفور آماده گردید. پس از چهار روز از رشد باکتری ها، ۱ میلی لیتر از محیط کشت برداشته و درون ویال ریخته شد. به مدت ده دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ نمونه ها، به محلول رویی، محلول CAS و شاتل اضافه گردید و مجدداً ورتکس شد و جذب نمونه ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. محیط کشت بدون باکتری، حاوی محلول سنجش CAS و محلول شاتل به عنوان شاهد (بلانک) مورد استفاده قرار گرفت (Alexander & Zuberer, 1991).

$$\left[\frac{(Ar - As)}{Ar} \right] \times 100$$

A_2 : جذب شاهد (محلول شاتل + محلول سنجش CAS + محیط کشت) در ۶۳۰ نانومتر می باشد.

A_3 : جذب نمونه (محلول رویی + محلول سنجش CAS + شاتل) در ۶۳۰ نانومتر می باشد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

مالون دآلدئید (MDA) یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به عنوان شاخص تنش به روش (۱۹۶۹) Heath و Packer اندازه گیری شد.

تعیین مقدار پروتئین کل

جهت سنجش مقدار پروتئین کل از روش (۱۹۷۶) Bradford استفاده شد.

سنجش کربوهیدرات های محلول

برای سنجش کربوهیدرات های محلول از روش (۱۹۵۱) Fales و معرف آنترون استفاده گردید و غلظت هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه گیری محتوی پرولین

برای اندازه گیری پرولین از روش (۱۹۷۳) Bates و معرف نین هیدرین استفاده شد. برای محاسبه ی مقدار پرولین از منحنی استاندارد

پروکلین استفاده گردید و نتایج برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش مقدار ترکیبات فنلی

محتوای ترکیبات فنلی با استفاده از روش (Gao ۲۰۰۰) و همکاران اندازه گیری شد.

رنگیزه های فتوسنتزی برگ

سنجش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، شامل کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتنوئید و گزانتوفیل)، به روش (Lichtenthaler, 1987) انجام گردید.

سنجش مقدار آهن کل برگ به روش جذب اتمی

در هر تیمار به ۰/۲ گرم از وزن خشک برگ گیاه، سه سی سی اسید نیتریک غلیظ اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا مواد آلی کاملاً تجزیه شوند سپس با استفاده از حرارت، اسید موجود تبخیر و حجم نمونه ها با آب یون زدایی شده به ۱۰ سی سی رسانده شد. جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی خوانده شد و غلظت آهن کل بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد.

محاسبات آماری

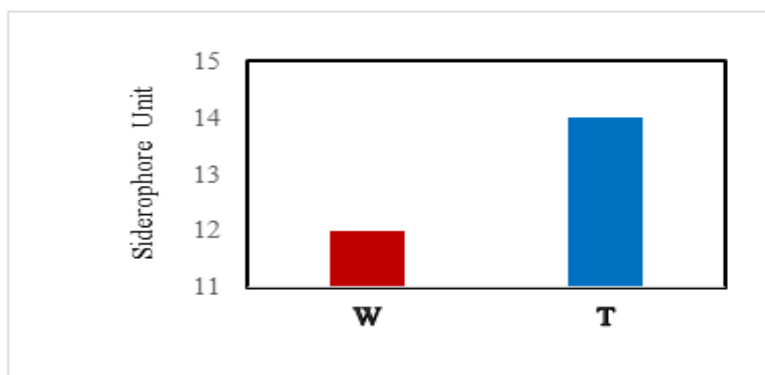
تجزیه و تحلیل های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل های آماری

داده های به دست آمده حاصل سنجش های کمی مختلف در این مطالعه، با استفاده از نرم افزار SPSS و به روش آنالیز واریانس انجام گرفت و اختلاف میانگین ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند. شکل های مربوطه با نرم افزار Excel 2007 رسم گردید.

نتایج

نتایج حاصل از سنجش تولید سایدرופور

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان تولید سایدرופور توسط باکتری های مورد استفاده در این تحقیق در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود باکتری *Enterobacter cloacae*(T) توانایی تولید سایدرופور بیشتری را نسبت به باکتری *Bacillus cereus*(W) داشت.



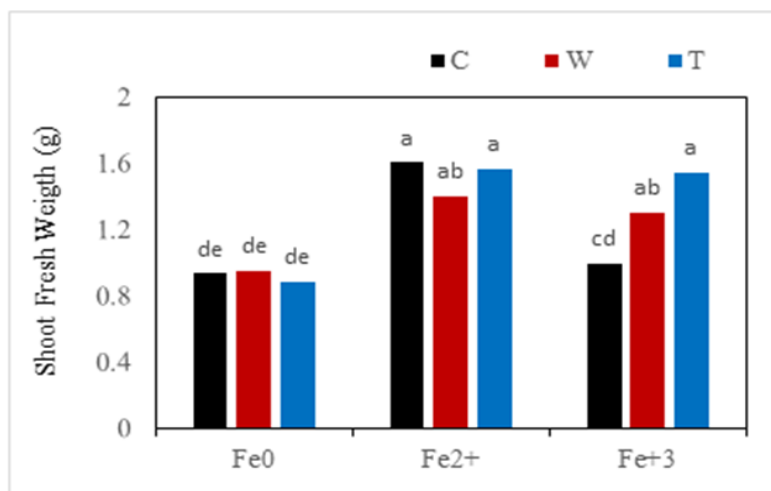
شکل ۱- نتایج حاصل از اندازه گیری تولید سایدرופور در دو سویه باکتریهای

Enterobacter cloacae(T)

Figure1. Results of siderophore production measurements in two bacterial strains *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) which used in this research

وزن تر اندام هوایی

نتایج حاصل از اندازه گیری وزن تر اندام هوایی نشان داد که گیاهان در تیمارهای Fe0 (تیمار شاهد) و Fe^{3+} (آهن غیر قابل دسترس)، دارای وزن کمتری نسبت به گیاهان تیمار شده با Fe^{2+} (آهن قابل جذب برای گیاه) می باشند. تیمار نهال های پسته با باکتری های T و W اثر معنی داری بر وزن تر گیاهان در تیمارهای Fe^{2+} و Fe0 در مقایسه با نمونه های تیمار نشده با باکتری، نداشت. درحالیکه در تیمار Fe^{3+} باکتری T و باکتری W باعث افزایش معنی دار وزن تر اندام هوایی نسبت به گیاهان بدون تیمار با باکتری گردید.

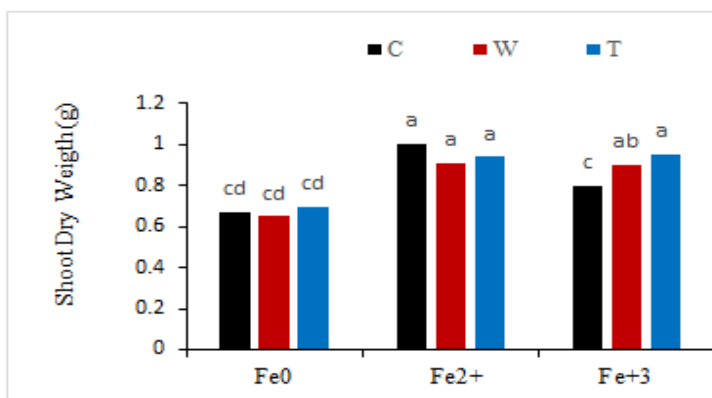


شکل ۲- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae* (T) و *Bacillus cereus* (W) در شرایط کمبود و فراهم بودن آهن بر وزن تر اندام هوایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. $SE \pm$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 2. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on fresh weight of shoots (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm$ SE. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

وزن خشک اندام هوایی

نتایج حاصل از اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی نشان داد که گیاهان بدون تیمار باکتری، تحت تیمارهای کمبود آهن (Fe^0 , Fe^{3+}) دارای وزن خشک کمتری نسبت به گیاهان تحت تیمار Fe^{2+} بودند. وزن خشک در گیاهان تیمار شده با باکتری های W و T تنها در تیمار Fe^{3+} افزایش معنی داری را در مقایسه با گیاهان بدون تیمار باکتری نشان داد. در تیمارهای Fe^0 و Fe^{2+} استفاده از باکتری ها تاثیر معنی داری بر وزن خشک در مقایسه با گیاهان بدون باکتری نداشت.



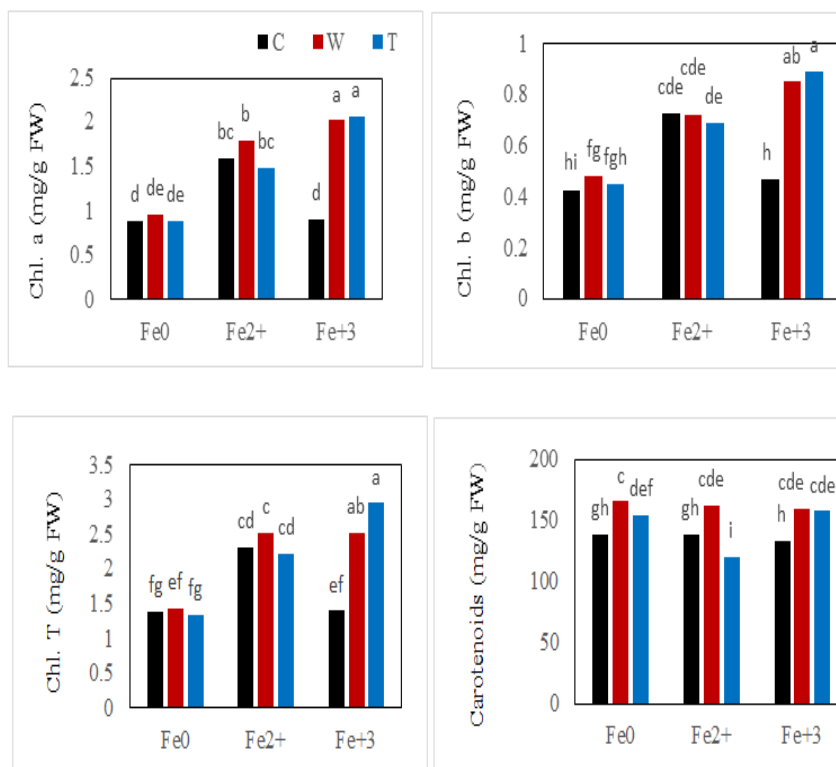
شکل ۳- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری (*Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط کمبود و فراهم بودن آهن، بر وزن خشک اندام هوایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 3. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on dry weight of shoots (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار کلروفیل و کاروتنوئیدها

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار کلروفیل های a، b و کلروفیل T برگ ها نشان داد که در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} و FeO مقدار کلروفیل ها به میزان قابل توجهی کمتر از گیاهان تیمار شده با Fe^{2+} است و گیاهان حالت رنگ پریدگی پیدا کردند. تیمار با باکتری ها در گیاهان تیمار شده با آهن FeO اثر معنی داری بر مقدار کلروفیل ها نداشت. اما در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} افزودن باکتری ها به محیط ریزوسفر مقدار کلروفیل ها را به مقدار معنی داری افزایش داد.

سنجش مقدار کاروتنوئیدها نشان داد که تیمار با فرم های مختلف آهن اثر معنی داری بر مقدار کاروتنوئیدها نداشت اما تیمار با هر دو سویه باکتری تقریباً در تمامی گیاهان مقدار کاروتنوئیدها را افزایش داد.

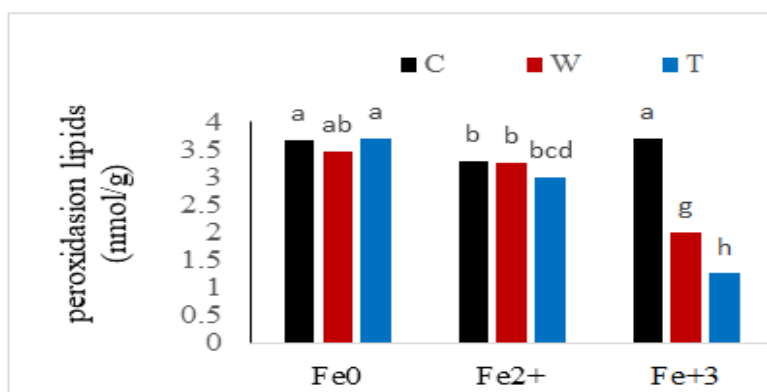


شکل ۴- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری (*Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط کمبود و فراهمی آهن، بر رنگیزه های فتوسنتزی برگ. (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm$ SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 4. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on photosynthetic pigments of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm$ SE. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

پراکسیداسیون لیپیدها

نتایج حاصل از اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نشان داد که گیاهان بدون تیمار باکتری، تحت تیمارهای کمبود آهن (Fe^{3+} , Fe^0) افزایش معنی داری را در مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آهن فروس داشته اند که نشان دهنده افزایش تنش تغذیه ای در آنها بود. تیمار گیاهان با باکتری های T و W پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} را کاهش داد هرچند اثر باکتری W در این گیاهان بیشتر از باکتری T بود اما تاثیر معنی داری در گیاهان تحت تیمار Fe^0 و Fe^{2+} نداشتند (شکل ۵).

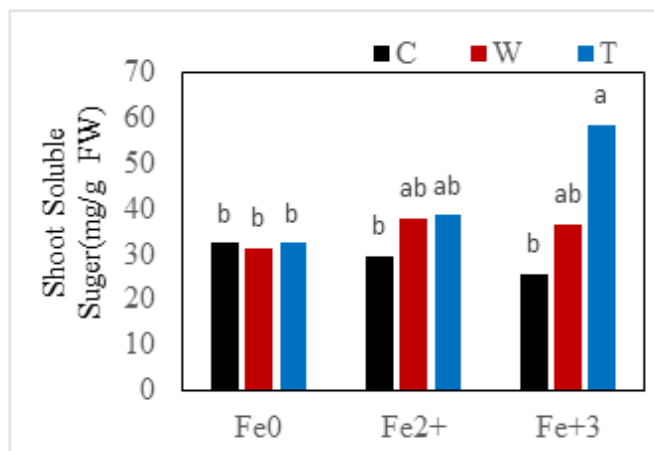


شکل ۵- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 5. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on lipid peroxidation of membrane (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار قندهای محلول

همانطور که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است تیمار با باکتری ها اثر معنی داری بر مقدار قندهای محلول در گیاهان تیمار شده با فرم های مختلف آهن نداشت. تنها باکتری T در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} مقدار قندهای محلول را افزایش داد.

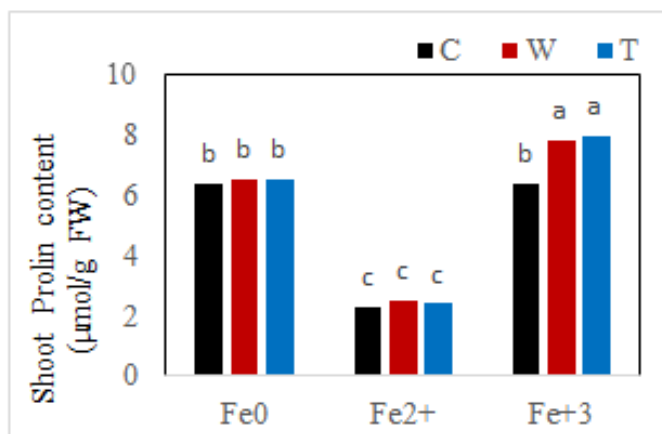


شکل ۶- اثر تیمار نهالهای پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae* (T) و *Bacillus cereus* (W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار کربوهیدراتهای محلول برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 6. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on soluble carbohydrates of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار پرولین

اندازه گیری مقدار پرولین نشان داد که مقدار پرولین در تیمارهای Fe^{3+} و Fe^{2+} که کمبود آهن وجود دارد افزایش معنی داری نسبت به تیمار Fe^{3+} داشت. تیمار ریشه ی گیاهان با باکتری های T و W در این شرایط فقط مقدار پرولین را در گیاهان تیمار شده با آهن Fe^{3+} افزایش داد.

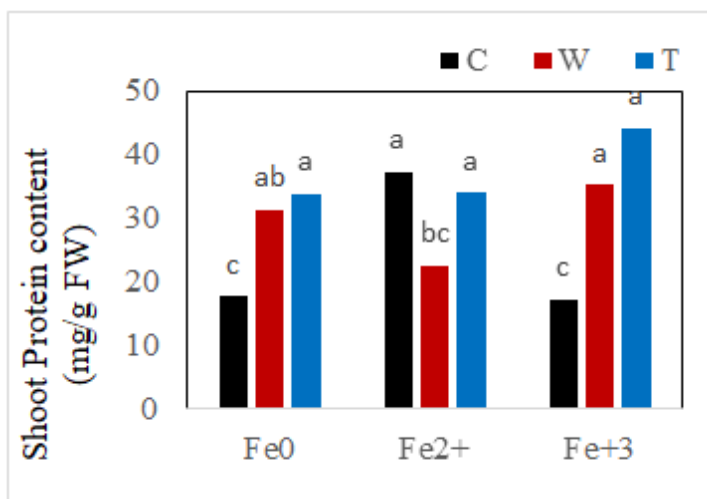


شکل ۷- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار پرولین برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است)، میانگین ها با آزمون مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 7. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on proline content of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار پروتئین

اندازه گیری پروتئین های محلول اندام هوایی نشان داد که باکتری ها مقدار پروتئین ها را در تیمارهای کمبود آهن افزایش دادند اما در تیمار Fe^{2+} باکتری W مقدار پروتئین را کاهش داد.

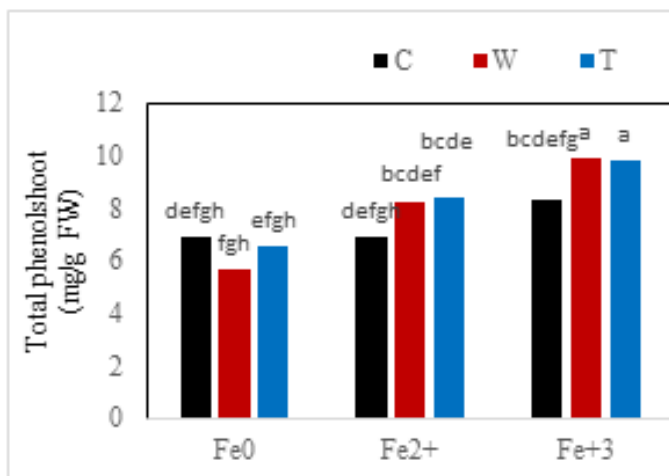


شکل ۸- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار پروتئینهای برگ. (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 8. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on protein content of the leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار ترکیبات فنلی کل

نتایج حاصل از اندازه گیری ترکیبات فنلی اندام هوایی نشان داد در گیاهان بدون تیمار باکتری، کمبود آهن اثر معنی داری بر مقدار ترکیبات فنلی نداشته است و تنها در گیاهان تیمار شده با آهن فریک، باکتریهای T و W مقدار ترکیبات فنلی را افزایش دادند.

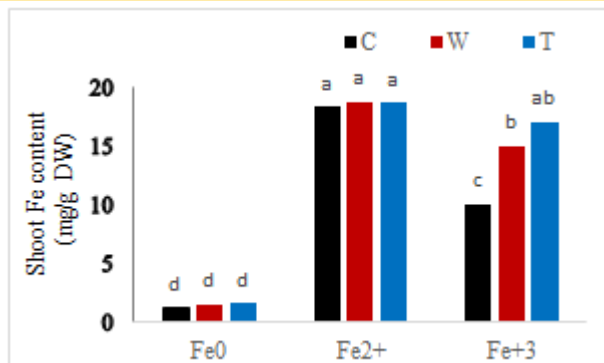


شکل ۹- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار فنل های کل (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm SE$ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure. 9 Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on total phenol (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm SE$. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

مقدار آهن

مقدار آهن در برگ های گیاهان کنترل و تحت تیمار Fe^{3+} کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار Fe^{2+} (فرم قابل جذب آهن) نشان داد. تیمار گیاهان با باکتری، در شرایط کنترل (بدون افزودن آهن) و در تیمار با آهن Fe^{2+} که فرم قابل جذب آهن است، تاثیر معنی داری بر مقدار آهن کل جذب شده گیاه نداشت اما در گیاهانی که با آهن Fe^{3+} تیمار شده بودند، تیمار با باکتری، مقدار آهن جذب شده توسط گیاه را به میزان معنی داری افزایش داد.



شکل ۱۰ - اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقای) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار آهن برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر $\pm$ SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 10. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on Fe content of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are $\pm$ SE. Same letters indicate no significant difference at the level of $P < 0.05$.

بحث

بهبود جذب آب و تولید فیتوهورمون ها به وسیله ی باکتری می تواند از دلایل بهبود رشد در گیاهان تیمار شده با باکتری های محرک رشد باشد (El-Ghany *et al.*, 2015). گزارش شده است که ترشحات باکتریایی باعث تحریک سنتز هورمون هایی مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین در گیاه می شوند که در بهبود رشد نقش دارند (Kant *et al.*, 2006). علاوه بر این رهاسازی ترکیبات احیاکننده و شلات کننده مثل سایدروفورها توسط باکتری های محرک رشد در ریزوسفر، دسترسی به Fe^{2+} را برای گیاهان بیشتر می کند و کمبود آهن گیاه را جبران کرده و اختلالات تغذیه ای حاصل

از کمبود آهن را کاهش می دهند (Rout & Sahoo, 2015, Esther et al., 2020; Aguado-Santacruz et al., 2012; Mimmo et al., 2014). بنابراین تولید سایدرופور و فراهم کردن آهن برای گیاهان می تواند یکی از اثرات مثبت باکتری ها باشد که باعث افزایش رشد گیاهان شده و بیوماس گیاه را افزایش می دهند (de Souza et al., 2015) که این افزایش رشد در اثر تیمار با باکتری در مطالعه حاضر نیز به وضوح مشاهده گردید. با توجه به اینکه سایدروفورهای باکتریایی نسبت به فیتوسایدروفورها تمایل بیشتری به آهن دارند و قادر به رها سازی آهن از کمپلکس های آهن-سایدروفور هستند، بنابراین تلقیح گیاهان با باکتری های تولید کننده سایدروفور به عنوان یک استراتژی برای غلبه بر کمبود آهن، مورد استفاده قرار گرفته است (Aguado-Santacruz et al., 2012). البته گزارش شده است که اثر این باکتری ها ممکن است از طریق القای ژن های گیاهی مرتبط با پاسخ های بیوشیمیایی به محدودیت آهن با واسطه باکتری و یا عملکرد مستقیم سایدروفورهای تولید شده توسط باکتری ها باشد (Zhang et al., 2009). در این پژوهش نیز اندازه گیری مقدار سایدروفور تولیدی نشان داد که باکتری های مورد استفاده قادر به تولید سایدروفور می باشند و احتمالاً نقش آنها در جبران کاهش رشد ناشی از کمبود آهن به همین دلیل است. در تحقیقات قبلی بر روی ذرت، آفتابگردان و خیار نیز نشان داده شده است که فعالیت میکروبی برای تجمع آهن در ریشه ها و انتقال آهن به برگ ها تعیین کننده است و تأیید می کند که سایدروفورهای باکتریایی نقش مهمی در فرآیند تأمین آهن در گیاهان دارند (Masalha et al., 2000; de Santiago et al., 2013; Pii et al., 2015). افزایش مقدار آهن کل در برگ ها نیز که در این پژوهش مشاهده شده می تواند به دلیل عملکرد مثبت باکتری ها در فراهمی

آهن قابل جذب در گیاهان پسته باشد. کلروزگی برگها یکی از مهمترین نشانه های کمبود آهن در گیاهان است و گزارش شده است که باکتری های محرک رشد، با در دسترس قرار دادن آهن، منجر به بهبود مسیر سنتز کلروفیل و برطرف شدن کلروزگی برگ ها می شوند. همچنین باکتری ها باعث کاهش نفوذپذیری غشاء و پراکسیداسیون لیپیدها و حفظ یکپارچگی و عملکرد غشاها می شوند و با مهار تولید گونه های فعال اکسیژن حفاظت گیاهان را در شرایط تنش برعهده دارند (Shukla *et al.*, 2012 , Sah & Singh, 2015). بنابراین شاید یکی از دلایل افزایش محتوای کلروفیل گیاهان در این پژوهش، پس از کاربرد باکتری های محرک رشد در شرایط کمبود آهن، به دلیل نقش موثر باکتری ها در فراهم کردن آهن همراه با حفاظت غشا و ساختار کلروپلاست با از بین بردن گونه های فعال اکسیژن باشد. علاوه بر این گزارش شده است که باکتری های محرک رشد با تولید سایدرافور، با تبدیل آهن فریک به آهن فروس کمبود آهن را جبران کرده و آهن قابل جذب را در اختیار گیاه قرار می دهند و از آسیب غشایی ناشی از کمبود آهن جلوگیری می کنند و با کاهش میزان مالون دآلدئید نقش حفاظتی برای غشا ایفا می کنند (Shukla *et al.*, 2012).

در این پژوهش مشاهده شد که در تیمار آهن غیر قابل جذب توسط گیاه، کاربرد باکتریهای PGPR باعث افزایش مقدار کربوهیدرات ها در مقایسه با گیاهان بدون تیمار باکتری گردید. این اثر باکتری ها در افزایش مقدار کربوهیدرات ها در مطالعات قبل نیز گزارش شده است و بیان داشته اند که این اثر می تواند به دلیل فراهم شدن آهن در دسترس گیاه، افزایش مقدار کلروفیل و متعاقب آن افزایش فتوسنتز و سنتز قندها، کاهش تنش اکسیداتیو و حفاظت از غشای کلروپلاستی و غشای سلول ها باشد (Bharti *et al.*, 2012).

(2016). افزایش محتوای پروتئین و پرولین پس از کاربرد باکتری در شرایط کمبود آهن، نیز احتمالاً به دلیل نقش موثر باکتری ها در بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و جلوگیری از وارد شدن آسیب های اکسیداتیو به پروتئین ها و تخریب آن ها می باشد (Morales et al., 2000, Ahluwalia et al., 2021). در این پژوهش، وجود آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+}) در خاک و عدم جذب آن، باعث ایجاد تنش و افزایش مقدار پرولین گردیده است که این افزایش پرولین هم در گیاهان فاقد آهن ($Fe0$) و هم گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} مشاهده شد. در این مطالعه با وجود اینکه تصور بر این بود که افزودن باکتری فراهمی آهن را افزایش دهد و مقدار پرولین را کاهش دهد اما علیرغم تصور ما افزایش پرولین در آنالیزها مشاهده شد.

در گیاهان تحت تنش، تعدادی از پروتئین ها کاهش می یابند اما برخی دیگر که نقش حفاظتی یا دفاعی دارند افزایش می یابند بنابراین در گیاهانی که تحت تنش قرار می گیرند، الگوی خاصی برای افزایش یا کاهش مقدار پروتئین های کل وجود ندارد و بستگی به جنس و گونه گیاه و نوع تنش و شرایط رشدی گیاه متفاوت است و مقدار پروتئین که اندازه گیری شده می تواند افزایشی و یا کاهش می باشد که در این مطالعه تیمار گیاهان با باکتری های محرک شد مقدار پروتئین محلول را در گیاه پسته افزایش داده است.

در این پژوهش افزایش مقدار فنل های گیاه در تیمار آهن فریک مشاهده شد. فنل های ترشح شده می توانند باعث افزایش پروتون و تبدیل آهن فریک به آهن فرو شوند که قابل جذب برای گیاه است. به نظر می رسد باکتری ها از طریق ارتباطات سیگنالینگ افزایش فنل را منجر می شوند تا مقدار آهن احیا شده و در دسترس گیاه بتواند از این طریق نیز افزایش یابد (Miransari, 2014, Siddiqui, 2005). در پژوهش های قبلی نیز گزارش شده

است که باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش ترکیبات فنلی در گیاه گوجه (Sharma & Sharma, 2017)، موز (Meena, 2000) و برنج (Maziah, 2010) تحت تنش شوری شده است.

به طور کلی در این مطالعه به نظر می‌رسد که باکتری‌ها با تولید سایدرافور و ایجاد کمپلکس آهن فریک-سایدرافور و احیا فرم آهن فریک به آهن فروس، آهن قابل جذب فروس را در اختیار گیاه قرار داده و کمبود آهن را در گیاه جبران کرده‌اند. بنابراین می‌توان در گیاهانی که دچار کمبود آهن هستند به جای استفاده از کودهای آهن از باکتری‌های PGPR استفاده کرد تا به روش زیستی آهن را احیا کرده و در اختیار گیاه قرار دهند و کاهش رشد گیاه را جبران نمایند.

فهرست منابع

- حسینی فرد، س ج، بصیرت، م، صداقتی، ن، و اخپانی، ا. (۱۳۹۶). دستورالعمل مدیریت تلفیقی حاصلخیزی خاک و تغذیه درختان پسته. انتشارات موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج.
- حسینی فرد، س ج، صداقتی، ن، محمدی محمد آبادی، ا، علی پور، ح، نیکویی دستجردی، م. (۱۳۹۸). اثرات محلولپاشی آهن از منابع سولفات و کلاته بر عملکرد و کیفیت میوه درختان پسته رقم اوحدی در استان کرمان. مجله علوم و فناوری پسته، جلد ۴. شماره ۸.
- Bates L.S., Waldern R.P. and Tare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 29:205-207
- Afrousheh, M., Ardalan, M., Hokmabadi, H. and Afrousheh, M. (2010). Nutrient deficiency disorders in *Pistacia vera* seedling rootstock in relation to eco-physiological, biochemical characteristics and uptake pattern of nutrients. *Scientia Horticulturae*, 124: 141-148.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: A synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35: 9-21
- Ahluwalia, O., Singh, P.C. and Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5:100032.
- Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1): 39-45.
- Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K. and Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific reports*, 6: 34768.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254
- Cassán, F., Vanderleyden, J. and Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-

- promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2): 440-459.
- De Santiago, A., Garc'ia-L'opezm A, M., Quintero, J. M., Avil'es, M., Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 598–605.
- De Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetic and Molecular Biology*, 38: 401–419.
- Do Amaral, F. P., Pankiewicz, V. C., Arisi, A. C. M., de Souza, E. M., Pedrosa, F. and Stacey, G. (2016). Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *Plant molecular biology*, 90(6): 689-697.
- El-Ghany, A., Masrahi, Y. S., Mohamed, A., Abboud, A. and Alawlaqi, M. M. (2015). Maize (*Zea Mays* L.) Growth and Metabolic Dynamics with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria under Salt Stresses. *J Plant Pathol Microb*, 6: 305.
- Esther, J., Pattanaik, A., Pradhan, N. and Sukla, L.B. (2020). Applications of Dissimilatory Iron Reducing Bacteria (DIRB) for recovery of Ni and Co from low-grade lateritic nickel ore. *Materials Today: Proceedings*, 30: 351-354.
- Fales, F.W. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*.193: 113-124.
- Ferreira, M.J., Silva, H. and Cunha, A. (2019). Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. *Pedosphere*, 29(4):409-420.
- Gao, L., Velioglu Y.S., Mazza G. and Oomah B.D (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 19;46(10): 4113-7.
- Heath R.L. and Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1;125:189-98
- Kant S., Kant P., Raveh E., and Barak S. (2006). Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline

- and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. Plant, Cell & Environment, 29 (7): 1220-1234.
- La Torre-Ruiz, D., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rincón-Molina, C. I., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Gutiérrez-Miceli, F. A. and Rincón-Rosales, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. Brazilian journal of microbiology, 47(3): 587-596.
- Lightenthaler H. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, Methods in Enzymology, 148:350-82.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biology and Fertility of Soils, 30: 433–439.
- Maziah, M. Z. (2010). Influence of boron on the growth and biochemical changes in plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated banana plantlets, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(5): 933-944.
- Meena, B. R. (2000). Induction of pathogenesis related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(17): 1181-1187.
- Mimmo, T., Del Buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Pinton, R., Zocchi, G., Cesco, S. (2014). Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. European journal of Soil Sciences, 65: 629–642
- Mirzapour, M. H. and Khoshgoftarmanesh, A. H. (2013). Effect of soil and foliar application of iron and zinc on quantitative and qualitative yield of pomegranate. Journal of plant nutrition, 36(1): 55-66.
- Morales, F., Belkhdja, R., Abadía, A. and Abadía, J. (2000). Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). Photosynthesis Research, 63(1): 9-21.
- Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T., Cesco, S. (2015). Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. Plant physiology and Biochemistry, 87: 45–52
- Rout, G. R. and Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. Reviews in Agricultural Science, 3: 1-24

- Sah, S. and Singh, R. (2015). Siderophore: structural and functional characterization—a comprehensive review. Agriculture (Polnohospodárstvo), 61(3): 97-114.
- Sharma, I., and Sharma, A. (2017). Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. Symbiosis, 71: 175-183.
- Shukla, P. S., Agarwal, P. K. and Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. Journal of plant growth regulation, 31(2): 195-206.
- Siddiqui, Z. A. (2005). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In PGPR: biocontrol and biofertilization, pp: 111-142).
- Singh, N., Mishra, K. and Varma, A. (2015). Isolation, screening and characterization of PGPRs from the semi-arid rhizospheric soil of *Jatropha curcas*. Journal of Endocytobiosis and Cell research, 2: 13-20.
- Williamson, A.J., Folens, K., Matthijs, S., Cortes, Y.P., Varia, J., Du Laing, G., Boon, N. and Hennebel, T. (2021). Selective metal extraction by biologically produced siderophores during bioleaching from low-grade primary and secondary mineral resources. Minerals Engineering, 163: 106774
- Zhang, H. M., Sun, Y., Xie, X. T., Kim, M. S., Dowd, S. E., Par' e, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. Plant Journal. 58: 568–577.

جداسازی و خالص سازی باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی از خاک های آلوده و شناسایی ترکیبات حاصل از تجزیه این مواد

سید افشین حسینی بلداجی^{۱*}، حامد سلطانی^۲، مریم تیموری^۳

چکیده

مقدمه: روش های مختلفی جهت حذف آلودگی های نفتی از منابع طبیعی وجود دارد که از این بین روش های زیستی به دلیل ارزان بودن، پایداری و زیست تخریب پذیر بودن، روش های مناسب تری به نظر می رسند. بر همین اساس هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی باکتری های دارای توانایی تجزیه نفت از خاک های آلوده به منظور بدست آوردن شرایط بهینه تجزیه کنندگی این باکتری ها در مطالعات تکمیلی بود.

روش ها: نمونه برداری از خاک های مناطق آلوده در اطراف پالایشگاه تهران صورت گرفت و پس از جداسازی باکتری های تجزیه کننده ی نفت در محیط کشت دارای ۲ درصد نفت سفید (به عنوان تنها منبع کربن)، توانایی این ایزوله ها در تجزیه ی نفت با استفاده از دو تکنیک FT-IR و GC-MS ارزیابی شد. در نهایت این ایزوله ها با استفاده از روش های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند.

نتایج و بحث: نتایج حاصل نشان داد که سه ایزوله ی تجزیه کننده ی نفت، قادر بودند ترکیبات آروماتیک نفت را کاهش داده و یا کاملاً از بین ببرند. آن ها آلکان های پیچیده ی نفت را به آلکان های ساده تر تجزیه کرده و در محیط کشت آن ها، موادی با گروه های عاملی آمین و کربوکسیل (ترکیبات آلی) نیز مشاهده شد. شناسایی این سه جدایه نشان داد که آن ها به گونه های نوکاردیا، باسیلوس سوبتیلیس و اسینتوباکتر بومانی تعلق دارند. به عنوان نتیجه گیری می توان عنوان نمود استفاده از روش پالایش زیستی با استفاده از گونه های مذکور جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکی و شیمیایی می باشد. جداسازی باکتری های بومی خاک که با مواد نفتی موجود در خاک سازش پیدا کرده اند می تواند در زمینه ی پالایش زیستی کمک کننده باشد.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری های تجزیه کننده، پالایش زیستی، هیدروکربن های آروماتیک.

۱. نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. آدرس الکترونیک: Afshin.h.b@gmail.com

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مقدمه

نگران کننده ترین آلاینده های محیط زیست، هیدروکربن ها در فرم های مختلف هستند. نشت نفت به محیط زیست بدلیل استفاده از حجم بالای نفتی به عنوان ماده خام مورد، تولید انرژی و مواد شیمیایی از مواد نفتی و همچنین حوادث در طول فرآیندهای عملیاتی، حمل و نقل، پالایش، ذخیره سازی و مصرف صورت می گیرد (Gerhardt et al. 2009; Nogales et al. 2011). نفت در تعارض با محیط زیست به دلیل برهم کنش با عوامل فیزیکی و بیولوژیکی، دچار تغییراتی در ویژگی های اصلی خود می شود. ماندگاری هیدروکربن های نفت در محیط به دلیل سرعت تجزیه زیستی آهسته آنهاست و می تواند کیفیت آب را به خطر بیندازد و نیز ممکن است در خاک، مواد غذایی مانند سبزیجات، ماهیچه ها و بدن موجودات آبرزی انباشته شود (Abdel-Shafy & Mansour 2016). پالایش زیستی یکی از فناوری های حذف آلودگی می باشد که در آن از سیستم های زیستی برای تخریب یا تغییر شکل مواد شیمیایی زیان بار استفاده می شود. هدف پالایش زیستی نفت، تجزیه کامل هیدروکربنها به آب و دی اکسید کربن توسط ریز جانداران است. این تکنیک نسبت به سایر روشهای حذف آلودگی نفتی مزایایی متعددی از جمله تبدیل مواد سمی به محصولات نهایی بی خطر، هزینه پایین، کاهش اثرات جانبی بر سلامت انسان و محیط زیست، تأثیر طولانی مدت و بالاخره توانایی حذف آلودگی به صورت درجا و بدون ایجاد اختلالی در اکوسیستم دارد. در میان روشهای زیستی، استفاده از باکتریها در حذف آلودگیها بازدهی بسیار خوبی دارد (Khosravinodeh et al. 2012). باکتریها و قارچها تنها گونه های بیولوژیکی دارای توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود هستند. هیدروکربنهای نفتی به طور متوسط به میزان ۱۳ تا ۵۰ درصد توسط باکتریها و نیز ۶ تا ۸۲ درصد توسط قارچها تجزیه می شوند. اما به دلایلی مانند فراوانی زیاد، افزایش سریع در سرعت رشد و توان

استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربنها، از باکتریها برای پاکسازی خاکهای آلوده استفاده می‌گردد (Doostaki et al. 2012). فرآیند پالایش زیستی بر عملکرد آنزیم‌های میکروبی جهت تبدیل یا تجزیه‌ی آلاینده‌های مضر استوار است و به‌وفور در کاهش آلودگی‌های هیدروکربنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wolicka et al. 2009). پالایش زیستی، به ویژه زمانی که بتوان آن را در محل آلودگی انجام داد، ابزاری مقرون به صرفه و مؤثر جهت پاکسازی آلودگی است. این فرآیند یک راه حل سازگار با محیط زیست برای رفع مشکل آلودگی با تأثیر اکولوژیک اندک است. محصولات نهایی تجزیه‌ی زیستی (کانی سازی) مثل آب و دی اکسید کربن برای انسان و محیط زیست بی‌ضرر هستند. طی روند پالایش زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی، چندین شاخص جهت ارزیابی اثربخشی پالایش در نظر گرفته می‌شوند. آنالیز شیمیایی پایه‌ای برای شناسایی آلاینده‌ها و تکنیک‌های استاندارد میکروب شناسی جهت سنجش کمی جمعیت‌های زنده‌ی میکروبی، از جمله‌ی این شاخص‌ها هستند. ابتدا ماهیت آلاینده‌ها باید از لحاظ غلظت و ماهیت شیمیایی و ماهیت ماتریکس آلوده تعیین شود. شاخص حیاتی دیگر در پایش، سنجش جمعیت‌های میکروبی درگیر در تجزیه و عوامل محیطی مؤثر بر نرخ متابولیسم میکروبی است (Kumar & Khanna 2010).

با افزایش حجم آلاینده‌های زیست محیطی، حفظ و حراست از محیط زیست و منابع طبیعی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات هیدروکربنی موجود در نفت خام یکی از انواع آلاینده‌هایی هستند که به طور متناوب، در حجم زیاد و از راه‌های متعدد وارد محیط زیست می‌شوند. آزادسازی این آلاینده‌ها در محیط زیست یا سوزاندن آن‌ها بدون فرآوری مشکلات بسیاری برای اکوسیستم ایجاد می‌کند. در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن روش‌های مؤثر جهت حذف آلودگی‌های نفتی انجام

شده است. یکی از این روش‌ها تجزیه‌ی زیستی مواد نفتی به کمک باکتری‌ها است (Sarkar et al. 2016). تجزیه زیستی هیدروکربن نفتی در محیط زیست فرآیندی پیچیده است. جنبه‌های کمی و کیفی بستگی به ماهیت و مقدار روغن یا هیدروکربن موجود و ترکیب جوامع میکروبی بومی دارد. باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن به طور گسترده در آب دریا و همچنین در زیستگاه‌های خاکی وجود دارند و استفاده از آن‌ها در پالایش زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن، که حاصل توانایی آن‌ها در تجزیه و یا سم‌زدایی آلاینده‌های آلی است، ثابت شده است که راهبردی مؤثر، مقرون به صرفه، کارا و سازگار با محیط زیست است (Greer & Juck 2017). در ایران نیز در سال‌های اخیر تحقیقاتی در خصوص جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی انجام شده است. در مطالعه پاپی و همکاران که به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های آلوده مناطق مختلف خوزستان انجام گرفت، ۴ گونه باکتری تجزیه‌کننده نفت به نام‌های *Kocuria Polar*، *Ochrobactrium ciceri* و *Planomicrobium chinense*، *Delfita lacutris* بر اساس توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی گردیدند، بر اساس نتایج بدست آمده باکتری *Planomicrobium chinense* بیشترین میزان تخریب/ قدرت رشد و باکتری *Delfita lacutris* کمترین میزان تخریب/ قدرت رشد را نشان دادند (Papi et al. 2016). در مطالعه کوجوری و اردستانی که به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده سروستان استان فارس انجام شد، ۴ گونه باکتری تجزیه‌کننده *Acinetobacter* sp.، *Bacillus*، *Pseudomonas* sp. SA75، *Enterobacter* sp. SA711، SA172، SA212، *Bacillus* sp. SA23 دارای بیشترین قدرت تخریب مواد نفتی معرفی شدند (Kojouri & Ardestani 2018). با توجه به مطالعاتی که به آنها اشاره شد، گونه‌های تجزیه‌کننده‌ی مواد نفتی در مناطق مختلف متعلق به

جنس‌های مختلف می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر یافتن سویه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده‌ی نفت و ارزیابی توانایی باکتری‌های جداسازی شده در تجزیه‌ی نفت، از خاکهای آلوده اطراف تهران بوده است.

مواد و روش‌ها

- **نمونه برداری:** از آنجایی که استخراج بلند مدت و تولید مشتقات نفتی متنوع باعث گسترش این آلودگی‌ها در خاک‌های اطراف مکان‌های استخراج و پالایش نفت می‌شود، نمونه برداری از زمین‌های آلوده به مواد نفتی اطراف پالایشگاه تهران جمع‌آوری شد. تعداد ۲۰ نمونه خاک سطحی (۳۰-۱۰ سانتی‌متر) تهیه گردید. این کار با مته نمونه برداری استریل انجام و نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی و در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شدند.
- **جداسازی و تخلیص ایزوله‌های باکتریایی:** نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده پس از رقیق شدن در سرم فیزیولوژی (۰/۹٪ کلرید سدیم)، روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. از کلنی‌های مختلفی که بر روی محیط کشت رشد یافتند کلنی‌های کاملاً خالص و عاری از آلودگی تهیه شد.
- **جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت:** به منظور جداسازی سویه‌هایی که دارای توانایی تجزیه‌ی نفت بودند، از محیط کشت حداقل بدون کرین CFMM با ۲ درصد نفت سفید استفاده شد. ترکیبات تشکیل دهنده‌ی این محیط کشت شامل ۳ گرم NH_4NO_3 ، ۰/۸ گرم KH_2PO_4 ،

۵/۵ گرم $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۵ گرم $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و ۰/۰۵ گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب بود. به این محیط کشت مقدار ۲٪ نفت سفید اضافه شد و پس از تنظیم pH (۷/۵)، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. از هر یک از کلنی‌های تخلیص شده مقداری با لوپ استریل برداشته شده و در این محیط کشت تلقیح شد. لوله‌های آزمایش تلقیح شده روی انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته محیط‌هایی که کدر شده بودند به عنوان سویه‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت گزارش شدند، چرا که این سویه‌ها قادر بودند از مواد نفتی به عنوان منبع کربن استفاده کرده و رشد یابند (Okerentugba & Ezerony 2003).

• **ارزیابی توانایی ایزوله‌ها در تجزیه‌ی نفت:** برای ارزیابی توانایی تجزیه‌ی نفت در ایزوله‌ها، سویه‌های انتخاب شده به مدت دو هفته در محیط کشت CFMM حاوی ۲٪ نفت سفید کشت داده شدند و بعد از انجام سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و جداسازی محیط کشت، از این محیط کشت‌ها برای بررسی توانایی تجزیه‌ی سویه‌ها و هیدروکربن‌های حاصل از فعالیت آن‌ها استفاده شد. از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. توانایی تجزیه نفت توسط ایزول‌ها با دو روش طیف‌سنجی مادون قرمز (Agilent Cary FTIR) 670، و کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (Shimadzu GC/MS) GCMS-TQ8040 NX ارزیابی شد (Weisman & Group 1998).

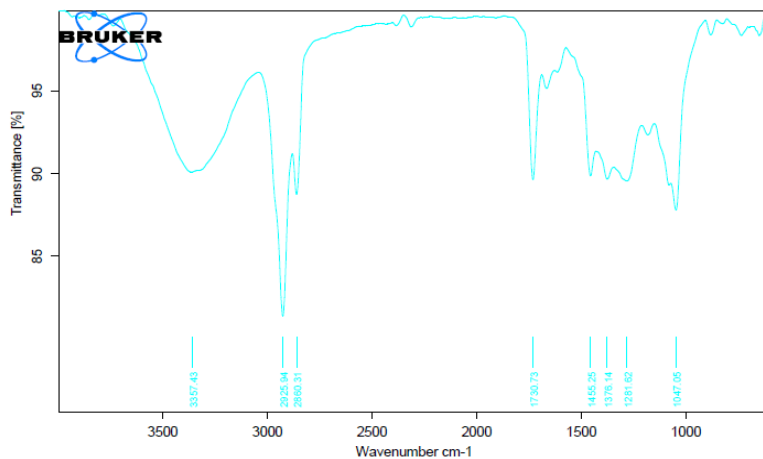
• **شناسایی ایزوله‌ها:** ایزوله‌های دارای توانایی تجزیه نفت با استفاده از روش‌های مورفولوژیک (بررسی شکل ظاهری کلنی‌ها و رنگ آمیزی گرم)، بیوشیمیایی

(تست‌های اکسیداز، کاتالاز، سیتрат، TSI، SIM و اوره‌آز) و همچنین مولکولی شناسایی شدند. به منظور شناسایی مولکولی، DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت تکاپوزیست-ایران و مطابق دستورالعمل استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید. سپس از تکثیر ژن 16SrRNA برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل CAGGCCTAACACATGCAAGTC برای پرایمر فوروارد و GGGCGGTGTGTACAAGGC برای پرایمر ریورس بود (Hongoh et al. 2003). واکنش PCR با یک سیکل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و با ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه اتصال در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در نهایت با یک سیکل گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت محصول PCR به ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR ژن 16SrRNA برای هر سه جدایه در پایگاه داده NCBI بلاست شد تا توالی جدایه‌های مورد نظر با توالی‌های ثبت شده در این پایگاه مقایسه شده و شناسایی گردد. درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 7.0.26 با روش Maximum Likelihood (ML) رسم شدند.

نتایج

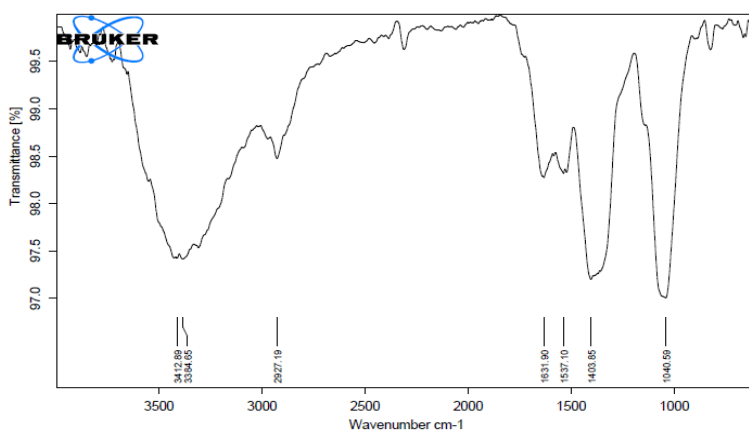
- **جداسازی ایزوله های موجود در نمونه های خاک:** کلنی های باکتریایی که در محیط کشت نوترینت آگار رشد کرده بودند با دقت بررسی شدند و در نهایت ۱۷ کلنی که از نظر ظاهری با هم تفاوت داشتند، انتخاب و تخلیص شدند.
- **جداسازی ایزوله های تجزیه کننده نفت:** ارزیابی توانایی تجزیه ی نفت در ایزوله های باکتریایی با استفاده از محیط کشت CFMM حاوی ۲٪ نفت سفید صورت گرفت. این محیط کشت فاقد منبع کربنی بوده و تنها میکروارگانیسم هایی می توانند در آن رشد کنند که قادر به استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن هستند. از میان ایزوله های مورد آزمایش، سه جدایه محیط کشت را کاملاً کدر کرده که نشان دهنده توانایی آنها در استفاده از نفت سفید به عنوان منبع کربن بود. این سه ایزوله، به صورت HS1 تا HS3 نامگذاری شده و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.
- **نتایج طیف سنجی FTIR:** پیک های موجود در طیف های حاصل از FTIR (شکل های ۴-۱) با استفاده از نرم افزار IRPal 2.0 آنالیز شدند و نتایج حاصل در جدول ۱ ذکر شده است. همان طور که مشاهده می شود، پیک های مربوط به O-H آروماتیک در حضور هر سه سویه، کاهش چشمگیری نسبت به نمونه ی شاهد داشته است حتی ایزوله ی HS2، O-H آروماتیک را کاملاً از بین برده است. همچنین هر سه جدایه توانسته اند C-C آروماتیک را به طور کامل از بین ببرند. آلکان های پیچیده مانند RCH_2CH_3 در حضور ایزوله های HS1 و HS3 به CH_2 تبدیل شده و در حضور HS2 به طور کامل از بین رفته اند. اسیدهای کربوکسیلیک و

ترکیبات آمینی نیز از دیگر ترکیبات ساده و آلی هستند که در حضور سویه‌های باکتریایی تولید شده‌اند.



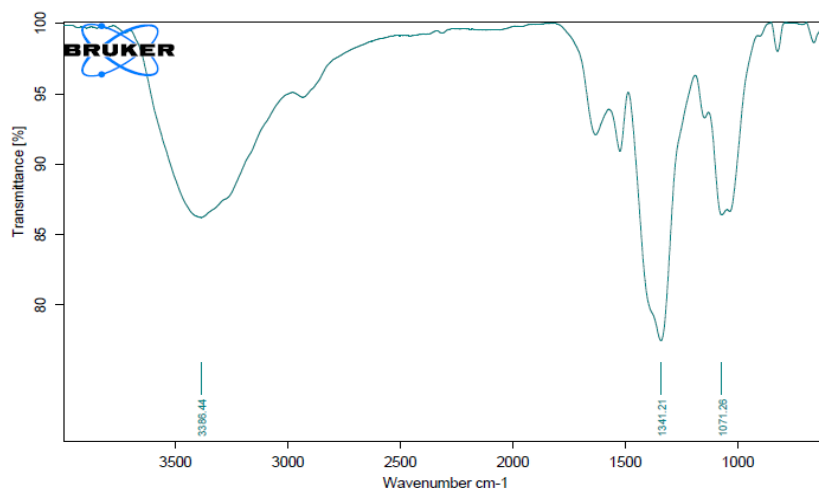
شکل ۱- طیف FTIR محیط حاوی نفت (نمونه شاهد)

Figure1. FTIR spectrum of petroleum containing medium (control)



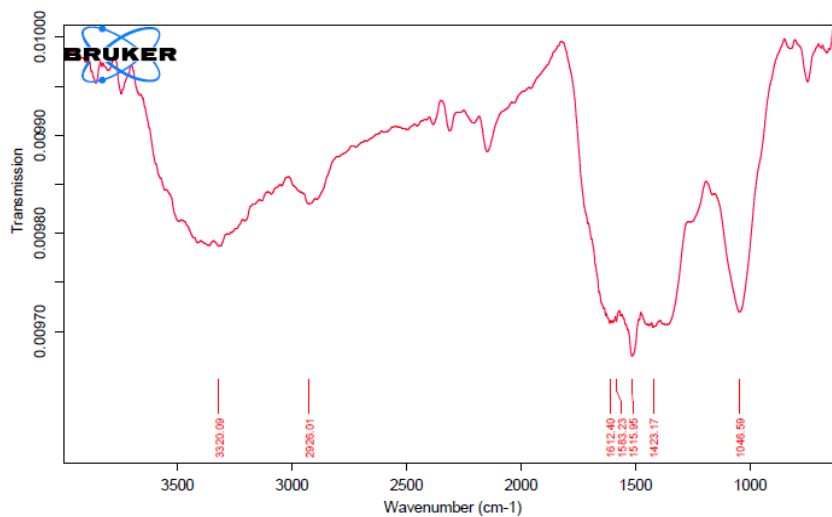
شکل ۲- طیف FT-IR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS1

Figure2. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS1 isolate



شکل ۳- طیف FTIR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS2

Figure3. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS2 isolate



شکل ۴- طیف FTIR محیط حاوی نفت در حضور ایزوله‌ی HS3

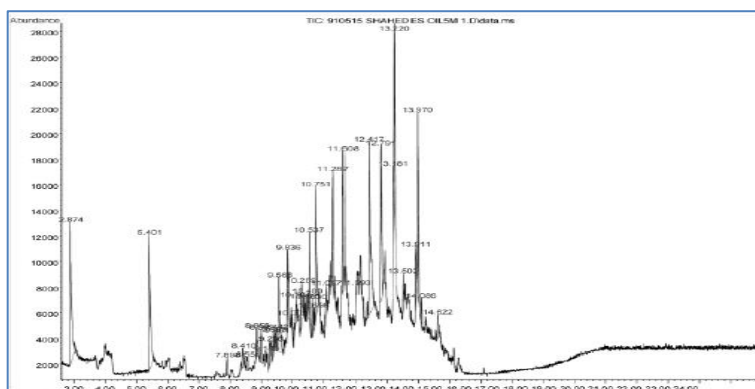
Figure4. FTIR spectrum of petroleum containing medium in presence of HS3 isolate

جدول ۱- تجزیه و تحلیل پیک‌های طیف FT-IR با استفاده از نرم‌افزار IRPal

Table1. Analysis of peaks of FTIR spectrum by IRPal software

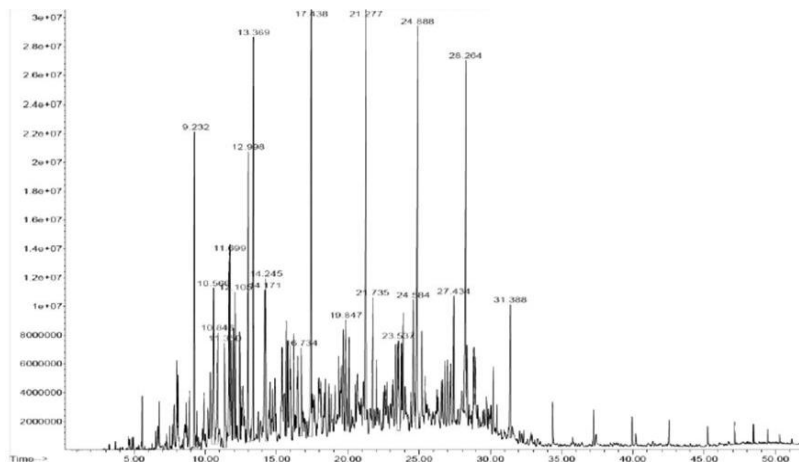
جدایه HS1		نمونه شاهد	
پیک	گروه عاملی	پیک	گروه عاملی
۳۳۵۷/۴۳	O-H آروماتیک	۳۴۱۲/۸۹	پیک RNH ₂ آمین
۲۹۲۵/۹۴	O-H آروماتیک	۳۳۸۴/۶۵	پیک RNH ₂ آمین
۲۸۶۰/۳۱	آلکان RCH ₂ CH ₃	۲۹۲۷/۱۹	O-H آروماتیک
۱۷۳۰/۷۳	اتر RCOOR-6Ring	۱۶۳۱/۹۰	CH ₂ آلکان
۱۴۵۵/۲۵	حلقه C-C آروماتیک	۱۵۳۷/۱۰	RCONHR آمید
۱۳۷۶/۱۴	آلکان RCH ₂ CH ₃	۱۴۰۳/۸۵	RCOO اسید کربوکسیلیک
۱۲۸۱/۶۲	CH ₂ X آلکیل هالید	۱۰۴۰/۵۹	پیک RNH ₂ آمین
۱۰۴۷/۰۵	آلکان RCH ₂ CH ₃	-	-
جدایه HS2		جدایه HS3	
پیک	گروه عاملی	پیک	گروه عاملی
۳۳۸۶/۴۴	پیک RNH ₂ آمین	۳۳۲۰/۰۹	CH ₂ آلکان
۱۳۴۱/۲۱	R-F آلکیل هالید	۲۹۲۶/۰۱	O-H آروماتیک
۱۰۲۷/۲۶	RCOO اسید کربوکسیلیک	۱۶۱۲/۴۰	آلکن ۵ حلقه‌ای
-	-	۱۵۸۳/۲۳	RCOO اسید کربوکسیلیک
-	-	۱۵۱۵/۹۵	N-O
-	-	۱۴۲۳/۱۷	RCOO اسید کربوکسیلیک
-	-	۱۰۴۶/۵۹	R-F آلکیل هالید

- **نتایج طیف سنجی GC/MS:** با استفاده از تکنیک GC-MS، ترکیبات هیدروکربنی حاصل از فعالیت سه ایزوله ی مورد مطالعه، بررسی شد و نتایج حاصل بر اساس مقایسه ی طیف به دست آمده با کتابخانه ی Adams GC/MS libraries آنالیز شدند (شکل های ۸-۵). نتایج حاصل از آنالیز دیگرام ها در جداول ۲ تا ۵ درج شده است. هرچه ارتفاع و سطح زیر پیک بیشتر باشد، مقدار ترکیب بیشتر است. در این شکل ها، ستون افقی نشان دهنده ی زمان ماند^۱ و ستون عمودی نشان دهنده ی غلظت فرآورده می باشد. شرایط دمایی ستون ابتدا از دمای ۵۰ درجه ی سانتی گراد شروع شده و ۳ دقیقه بر روی این دما متوقف شد و بعد با سرعت ۱۵ درجه ی سانتی گراد بر دقیقه تا دمای ۲۹۰ درجه ی سانتی گراد بالا رفته و به مدت ۶ دقیقه نیز در این دمای باقی ماند. با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه داده، مشخص شد که هر طیف مربوط به چه ماده ای می باشد و ترکیبات موجود با نمونه ی شاهد مقایسه شدند.



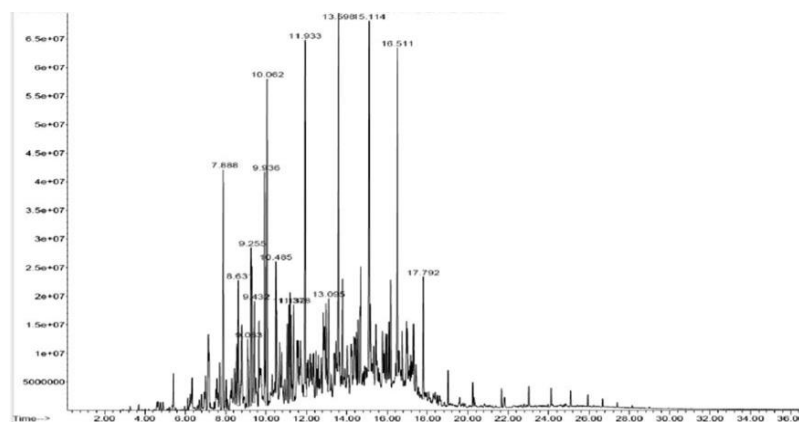
شکل ۵- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت (نمونه شاهد)

Figure5. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium (control)



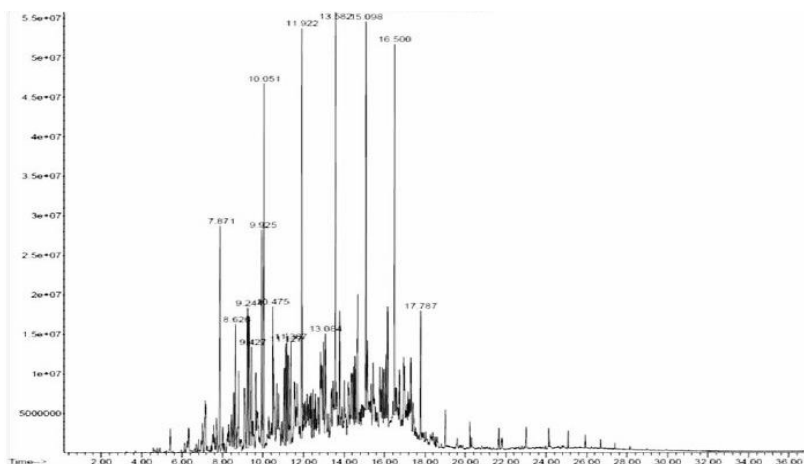
شکل ۶- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله ی HS1

Figure6. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS1



شکل ۷- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله ی HS2

Figure7. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS2



شکل ۸- کروماتوگرام حاصل از GC/MS محیط حاوی نفت در حضور ایزوله HS3

Figure6. GC/MS chromatogram of petroleum containin medium in presence of HS3

جدول ۲- ترکیبات موجود در نمونه شاهد بر اساس طیف GC/MS

Table2. Chemical composition of control sample according GC/MS spectrum

ردیف	ترکیب مربوطه	زمان ماند (دقیقه)	سطح زیر منحنی
۱	متیل-دی-۳-۱-دی-دوتریو-۲-پروپنیل اتر	۲/۸۷	۳۶۹۲۰
۲	اکسیم متوکسی فنیل	۵/۴۰	۳۴۹۳۹
۳	هپتادکان آمین (CAS)	۸/۸۵	۷۷۳۰
۴	۱۹-متیل ایکوزان	۸/۸۹	۷۵۰۱
۵	دودکان، ۱،۱'-آکسی بیس-(CAS)	۹/۴۴	۲۴۰۶
۶	تتراتراکونتان	۱۰/۷۵	۲۶۲۶۶
۷	پنتادکان، ۲، ۶، ۱۰، ۱۴-تترامتیل	۱۲/۷۹	۲۷۲۸۹
۸	هگزادکان ۱	۱۳/۹۷	۲۷۳۸۵

جدول ۳- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS1 بر اساس طیف GC/MS

Table3. Chemical composition of HS1 isolate according GC/MS spectrum

ردیف	ترکیب مربوطه	زمان ماند (دقیقه)	سطح زیر منحنی
۱	۲-متیل دکان	۹/۲۳	۱۹۸۳
۲	هپتادکان	۱۰/۵۰	۱۵۹۳۴
۳	۳-تترادکان	۱۱/۶۹	۱۳۰۵۲
۴	نونان-۲-متیل	۱۲/۹۰	۱۱۴۷۲
۵	تترادکان	۱۳/۳۶	۹۴۲۵
۶	هپتادکان	۱۷/۴۳	۹۴۲۰
۷	اکتان-۳،۴،۵،۶-تترامتیل	۱۹/۸۴	۹۱۶۳
۸	دودکان-۲،۶،۱۱-تری متیل	۲۱/۲۷	۴۴۰۲
۹	سیس-۹-اوکتادکان	۲۱/۷۳	۵۷۴۳
۱۰	اگزیران	۲۴/۸۸	۴۱۳۱
۱۱	هگزاتری اکونتان	۲۸/۲۶	۲۸۵۳
۱۲	اوکتادکان	۳۱/۸۸	۲۳۴۱

جدول ۴- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS2 بر اساس طیف GC/MS

Table4. Chemical composition of HS2 isolate according GC/MS spectrum

ردیف	ترکیب مربوطه	زمان ماند (دقیقه)	سطح زیر منحنی
۱	آن دکان	۷/۸۸	۶۲۴۴
۲	هپتادکان آمین	۸/۶۳	۶۰۳۲
۳	۲-متیل دکان	۹/۲۵	۱۸۵۳
۴	تترادکان	۱۰/۰۶	۱۶۳۳۹
۵	۳-تترادکان	۱۱/۹۳	۱۵۹۷۷
۶	هگزادکان	۱۳/۵۹	۱۸۴۳۵
۷	تری دکان	۱۶/۵۱	۱۶۴۲۸
۸	هپتادکان	۱۷/۷۹	۱۶۳۸۹

جدول ۵- ترکیبات موجود در نمونه مربوط به جدایه HS3 بر اساس طیف GC/MS

Table5. Chemical composition of HS3 isolate according GC/MS spectrum

ردیف	ترکیب مربوطه	زمان ماند (دقیقه)	سطح زیر منحنی
۱	آن‌دکان	۷/۸۷	۶۴۸۶
۲	۲-متیل‌دکان	۹/۹۲	۲۲۵۳
۳	تترادکان	۱۰/۰۵	۲۱۵۷۳
۴	ایکوزان	۱۱/۹۲	۱۴۷۳۶
۵	هگزادکان	۱۳/۵۸	۲۴۶۲۴
۶	تری‌دکان	۱۶/۵۰	۱۸۵۳۲
۷	۱-آن‌دکان-۴-متیل	۱۷/۷۸	۱۷۴۸۲

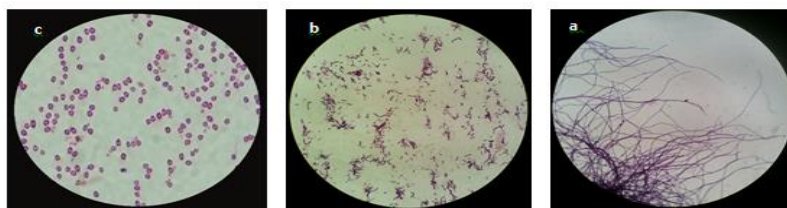
همان‌طور که مشاهده می‌شود، ترکیبات آروماتیک و ترکیبات پیچیده‌ی هیدروکربنی که در نمونه‌ی شاهد وجود داشتند، در حضور سویه‌های باکتریایی به شدت کاهش یافته‌اند (سطح زیر منحنی کاهش داشته است). همچنین در حضور سویه‌های باکتریایی، ترکیبات ساده‌ای مانند تری‌دکان و تترادکان ایجاد شده که در نمونه‌ی شاهد وجود نداشته و حاصل تجزیه‌ی نفت توسط باکتری می‌باشند.

- **شناسایی ایزوله‌ها:** شناسایی مورفولوژیک: شناسایی مورفولوژیک بر اساس کلید شناسایی Bergey انجام گرفت (Bergey et al. 1984). نمای ظاهری کلنی‌ها در شکل ۹ و فرم سلول‌های باکتری پس از رنگ‌آمیزی گرم در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بر اساس این ویژگی‌های مورفولوژیک، ایزوله‌ی HS1 به عنوان اکتینومیسست و ایزوله‌ی HS2 به عنوان باسیلوس شناسایی شد. در مورد ایزوله‌ی HS3 نیاز به آزمایشات دیگری برای شناسایی وجود داشت.



شکل ۹- شکل ظاهری کلنی ایزوله‌ها. a: جدایه HS1، b: جدایه HS2، c: جدایه HS3

Figure9. The colony morphology of isolates, a: HS1; b: HS2; c: HS3



شکل ۱۰- تصاویر جدایه‌ها زیر میکروسکوپ پس از رنگ‌آمیزی گرم. a: جدایه HS1، b: جدایه HS2، c: جدایه HS3

Figure10. The gram staning of isolates, a: HS1; b: HS2; c: HS3

- شناسایی بیوشیمیایی: با بررسی نتایج حاصل از تست مورفولوژیک همراه با تست‌های بیوشیمیایی مطابق با کلید شناسایی Bergey et al. (1984)، ایزوله‌ها در سطح جنس شناسایی شدند (جدول ۶).

جدول ۶- نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی بر اساس کلید شناسایی Bergey و همکاران (۱۹۸۴)

Table6. The results of morphological and biochemical identification according to Bergey et al. (1984)

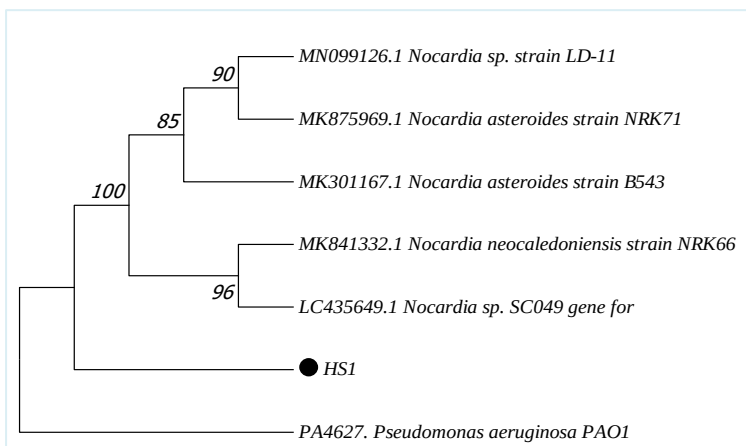
نتیجه کلید شناسایی	اسپور	شکل	گرم	اوره آز	سینرات	گاز	اندول	حرکت	TSI	اکسیداز	کانالاز	تست جدایه
<i>Actinomyces</i>	-	R	+	-	-	-	-	-	A/A	-	-	HS1
<i>Bacillus</i>	+	R	+	-	+	-	-	+	A/A	+	+	HS2
<i>Acinetobacter</i>	-	R	-	-	+	-	-	-	A/A	-	+	HS3

R: میله ای شکل، **A:** زرد (اسیدی)، **K:** قرمز (قلیایی)، **NC:** بدون تغییر
(No change)، **A/A:** دارای توان تخمیر گلوکز و لاکتوز، **K/A:** تنها توان
 تخمیر گلوکز را دارد

R: Rods shape; **A:** Yellow (Acidic); **K:** Red (Alkaline); **NC:** Not change; **A/A:** able to use Glucose and Lactose as Fermentation source; **K/A:** Only can use Glucose as fermentation source

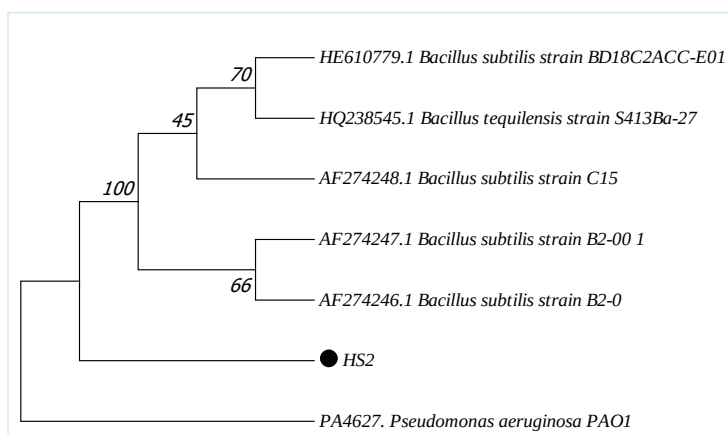
نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نیز مانند بخش مورفولوژیک، تایید کننده‌ی آن بود که ایزوله‌ی HS1، از اکتینومیست‌ها و ایزوله‌ی HS2 از باسیلوس‌ها می‌باشد. ایزوله‌ی HS3 نیز به عنوان اسینتوباکتر شناسایی شد.

- **شناسایی مولکولی:** نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR ژن 16SrRNA برای هر سه جدایه در پایگاه داده NCBI بلاست شد تا توالی جدایه‌های مورد نظر با توالی‌های ثبت شده در این پایگاه مقایسه شده و شناسایی گردد. درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 7.0.26 با مدل Maximum Likelihood (ML) رسم شدند. سویه *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 به عنوان برون گروه انتخاب شد. جدایه‌ی HS1 با ۱۰۰٪ شباهت به عنوان *Nocardia* sp. جدایه‌ی HS2 با ۹۵/۴۴٪ شباهت به عنوان *Bacillus subtilis* و جدایه‌ی HS3 با ۹۸/۹۹٪ شباهت به عنوان *Acinetobacter baumannii* شناسایی شدند.



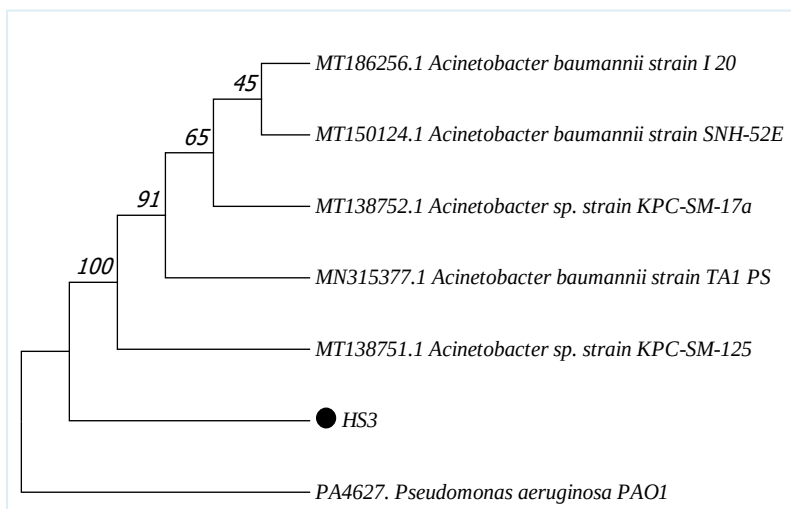
شکل ۱۱- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS1

Figure11. Phylogenetic tree of HS1 isolate



شکل ۱۲- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS2

Figure12. Phylogenetic tree of HS2



شکل ۱۳- درخت فیلوژنی ایزوله‌ی HS3

Figure13. Phylogenetic tree of HS3

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق از خاک‌های مناطق آلوده‌ی نفتی، نمونه‌برداری انجام شد و از طریق کشت باکتری‌های موجود، در محیط کشتی که تنها منبع کربن آن نفت سفید بود، سویه‌هایی که قادر به استفاده از آن به عنوان تنها منبع کربن بودند، جداسازی شدند. در این مرحله از نظر کیفی نشان داده شد که سه جدایه توانسته بودند با استفاده از هیدروکربن‌های نفتی رشد کنند. در مرحله-ی بعد با استفاده از دو تکنیک FTIR و GC/MS تلاش شد نوع ترکیبات حاصل از تجزیه‌ی نفت سفید پس از فعالیت باکتری‌ها مشخص شود.

یکی از مهم‌ترین آلودگی‌های نفتی، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای^۱ PAH است که با توجه به مضرات فوق‌العاده‌ی این مواد و امکان تجمع آن‌ها در

1. Polycyclic Hydrocarbon Aromatics (PAH)

گیاهان و جانوران، می‌تواند زمینه‌ساز بروز مشکلات عمده‌ای گردد (Jain et al. 2011). آنالیز طیف‌های حاصل از FTIR نشان داد که نمونه‌ی شاهد دارای پیک‌های مرتبط با گروه‌های عاملی آروماتیک بوده که در حضور سویه‌های باکتریایی میزان این ترکیبات کمتر شده و هیدروکربن‌های ساده جایگزین آن شده‌اند. نکته‌ی مهم دیگر حضور گروه عاملی کربوکسیلیک اسید و آمین در نمونه‌های حاوی سویه‌ی باکتریایی بود. این مساله نشان می‌دهد که این باکتری‌ها ترکیبات معدنی نفت را به ترکیب آلی تبدیل کرده‌اند، که از مشخصه‌های پالایش زیستی نفت می‌باشد. شناسایی هیدروکربن‌های آروماتیک توسط روش GC/MS امکان‌پذیر است. در واقع این روش قادر به تفکیک آلکان‌ها، آروماتیک‌ها، نفتن‌ها، بنزن‌های آلکیل و سایر ترکیبات هیدروکربنی می‌باشد (De Carvalho Rocha & Sheen 2019). آنالیز طیف‌های حاصل از GC/MS نشان داد که در نمونه‌ی شاهد ترکیبات هیدروکربنی پیچیده حضور دارند اما در حضور سویه‌های باکتریایی این ترکیبات یا کاملاً از بین رفته و یا کاهش بسیاری داشته‌اند. همچنین هیدروکربن‌های ساده‌تر در حضور سویه‌های باکتریایی مشاهده شدند. در نهایت پس از مشاهده‌ی توانایی قابل قبول ایزوله‌ها در تجزیه‌ی نفت، این ایزوله‌ها شناسایی شدند که نتایج حاصل نشان داد که شامل یک سویه نوکاردیا *Nocardia* sp. باسیلوس سابتیلیس *Bacillus subtilis* و اسینتوباکتر بومانی *Acinetobacter baumannii* بودند.

میکروارگانسیم‌ها توانایی تبدیل ضایعات هیدروکربنی را به دی‌اکسید کربن، آب و توده‌ی سلولی دارند و در صورتی که در اثر پالایش زیستی، آلاینده‌ها به طور کامل حذف نشوند، عمدتاً به مواد کم ضررتر تبدیل می‌شوند (Souza et al. 2014). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از FTIR و GC/MS نشان داد که در حضور سویه‌های باکتریایی ترکیبات آروماتیک نفتی کاهش

چشمگیری داشته و همچنین ترکیبات پیچیده ی هیدروکربنی، به ترکیبات آلی تبدیل شده بودند.

در تحقیق حاضر یکی از سویه های جداسازی شده، اکتینومیسست نوکاردیا بود. اکتینوباکترها متعلق به خانواده اکتینومایستاسه می باشند. این گروه از باکتری ها به دلیل توانایی تولید متابولیت های ثانویه متعدد در برابر میکروارگانیسم های بیماری زا، به خوبی شناخته شده اند. این باکتری ها بیشتر از منابع خاکی استخراج شده اند. این گروه از باکتری های رشته ای با محیط زیست و خاک به خوبی سازگاری یافته اند و می توانند پلیمرهای پیچیده زیستی را تجزیه نمایند (Shahaby et al. 2015). در منابع مختلفی نشان داده شده است که اکتینومیسست ها قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند (Thampayak et al. 2008; Lakshmipathy et al. 2010; Chakraborty et al. 2015) و همانطور که می دانیم، تولید بیوسورفکتانت به تجزیه ی مواد نفتی کمک می کند و سویه های تجزیه کننده ی نفت این ماده را جهت پیشبرد واکنش های تجزیه ای تولید می کنند (Kumari et al. 2012). در مورد سویه ی TSH1 نوکاردیا اوتیتی دیسکاو یاروم (*Nocardia otitidiscaviarum*)، Zeinali و همکاران بیان کرده اند که این سویه قادر است ترکیبات فنانترن و آنتراسن را تجزیه کند (Zeinali et al. 2008). آن ها همچنین بیان داشتند که سویه ی *Nocardia* قادر به رشد بر روی محیط حاوی هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای (PAH) هستند (Zeinali et al. 2007). Kalme و همکاران نیز گزارش کرده اند که نوکاردیا می تواند بنزین و کروزن را تجزیه کند (Kalme et al. 2008). این یافته های با نتایج حاصل از آزمایش حاضر همسو بود و در آزمایش حاضر نیز نشان داده شد که سویه ی نوکاردیا (ایزوله ی HS1) ترکیبات آروماتیک دارای حلقه ی C-C را کاملاً حذف کرده و ترکیبات دارای O-H

آروماتیک را نسبت به نمونه شاهد کاهش می‌دهد. در طیف FTIR حاصل از محیط کشت این سویه، ترکیبات آمینی و کربوکسیلی و همچنین آلکان‌های ساده مشاهده شدند که حاصل تجزیه‌ی مواد نفتی بودند. همچنین در آنالیز GC/MS آلکان‌های ساده‌تری نسبت به نمونه‌ی شاهد، در حضور نوکاردیا مشاهده شد. بنابراین در آزمایش حاضر هم‌راستا با تحقیقات مشابه نشان داده شد که نوکاردیا قار به تجزیه‌ی مواد نفتی به مواد ساده‌تر و نیز مواد آلی می‌باشد.

سویه‌ی دیگری که در آزمایش حاضر به عنوان سویه‌ی تجزیه کننده‌ی نفت شناسایی شد، باسیلوس سوبتیلیس (جدایه‌ی HS2) بود و نشان داده شد که در حضور این سویه ترکیبات آروماتیک نفتی کاملاً تجزیه شده و ترکیبات آلی دارای گروه عاملی آمین و کربوکسیل جایگزین آن‌ها شده است. همچنین در طیف GC/MS نمونه‌ی حاوی این سویه، آلکان‌های ساده جایگزین ترکیبات هیدروکربنی پیچیده‌ی موجود در نمونه‌ی شاهد شده بودند. توانایی باسیلوس سوبتیلیس در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی در تحقیقات بسیاری گزارش شده است (Das & Mukherjee 2007; Montagnolli et al. 2015; Darsa et al. 2014). باسیلوس‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولید کننده‌ی انواع بیوسورفکتانت هستند (Arjes et al. 2020). در تحقیقات بسیاری تولید بیوسورفکتانت توسط باسیلوس سوبتیلیس نشان داده شده است، از جمله Arjes و همکاران بیان کردند که یک مکانیسم وابسته به بیوسورفکتانت در باسیلوس سوبتیلیس سبب پابرجا ماندن قطبیت غشا در شرایط تخلیه‌ی اکسیژن می‌گردد (Arjes et al. 2020). Parthipan و همکاران نیز گزارش کردند که بیوسورفکتانت همراه با آنزیم‌های تجزیه‌ای موجب تجزیه‌ی روغن خام توسط باسیلوس سوبتیلیس می‌شود (Parthipan et al. 2017). در تحقیق

حاضر نیز هم‌راستا با تحقیقات ذکر شده، نشان داده شد که باسیلوس سوبتیلیس قادر به تجزیه‌ی نفت سفید می‌باشد که احتمالاً به دلیل توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط این باکتری است.

سومین ایزوله‌ی شناسایی شده، سویه‌ی /سینتوباکتر بومانی بود. سوبه‌های بسیاری از /سینتوباکترها توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک و استفاده از آن‌ها به عنوان تنها منبع کربن را دارند به طوری که با تولید بیوسورفکتانت باعث افزایش حلالیت و سرعت تجزیه‌ی زیستی می‌شوند. بنابراین می‌توان از اسینتوباکترها در تجزیه و پاکسازی زیستی ترکیبات PAH استفاده کرد (Mishra و Vanbroekhoven et al. 2004). همکاران در سال ۲۰۰۱، گونه‌های مختلفی از /سینتوباکتر را از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی کردند (Mishra et al. 2001). Gallego و همکاران نیز طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیده‌اند که با تلقیح میکروبی حاوی سویه‌ی /سینتوباکتر بومانی بیشترین میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده مشاهده می‌شود (Gallego et al. 2007). قابلیت استفاده از تولوئن و آسفالتن، بنزن-الکل و هگزادکان به عنوان منبع کربن و انرژی توسط باکتری /سینتوباکتر بومانی به اثبات رسیده است (Nakamura et al. 2014). در این تحقیق نیز مشاهده شد که سویه‌ی /سینتوباکتر بومانی (ایزوله‌ی HS3) ترکیبات آروماتیک موجود در نفت را به خوبی کاهش داده و ترکیبات پیچیده را آلکان‌های ساده تبدیل کرده است. گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیل در نمونه‌ی حاوی این سویه نیز مشاهده شدند که همه‌ی این یافته‌ها هم‌راستا با سایر مطالعات مشابه، تایید‌کننده‌ی نقش /سینتوباکتر بومانی در تجزیه‌ی ترکیبات نفتی است.

یکی از ویژگی‌های مهم سوبه‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت، دسترسی آسان به آن‌ها می‌باشد. سوبه‌های باسیلوس و اکتینومیسست از فراوان‌ترین جوامع

میکروبی موجود در خاک هستند که در شرایط مختلف قادر به ادامه‌ی بقا می‌باشند. استفاده از این سویه‌ها به دلیل فراوانی آن‌ها و زیست‌دسترس‌پذیری بالا، می‌تواند فرایند زیست‌پالایی را تسهیل نماید. با توجه به این که ایران یکی از بزرگ‌ترین کشورهای دارای ذخایر نفتی می‌باشد، آلودگی‌های ناشی از نفت و هیدروکربن‌های آن یکی از مشکلات اصلی حاصل از بهره‌برداری از این منبع ارزشمند است که در موارد بسیاری منجر به بروز مشکلات متعددی شده است. شناسایی سویه‌های باکتریایی بومی با توانایی تجزیه نفت و هیدروکربن‌های نفتی و هم‌چنین افزایش دانش و آگاهی ما در مورد قابلیت‌های مختلف این سویه‌ها و تنوع میکروبی اکوسیستم‌های آلوده به نفت، گام بسیار مهمی در جهت استفاده از این باکتری‌ها برای مقاصد مختلف صنعتی و زیست محیطی است. از آن‌جا که میزان آلودگی‌های نفتی در ایران بسیار بالا است، قابل پیش‌بینی است که با منبعی غنی از باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی روبرو هستیم. در این پژوهش نیز سه سویه‌ی نوکاردیاء، *باسیلوس سوبتیلیس* و *اسینتوباکتر بومانی* به عنوان سویه‌های بومی از خاک محل‌های آلوده جداسازی شدند و توانایی آن‌ها در تجزیه‌ی مواد نفتی با آزمایشات FTIR و GC/MS نشان داده شد. امید می‌رود به توانایی‌های بالقوه‌ی منابع زیستی و میکروارگانیسم‌ها بیش از پیش توجه شود و از آن‌ها در جهت حذف آلودگی‌های نفتی و حفظ محیط زیست، بدون آسیب به سایر موجودات زنده، با هزینه‌ی اندک و پایداری بیشتر نسبت به سایر روش‌ها استفاده گردد. این مهم نیازمند مطالعات بیشتر و آزمایشات گسترده‌تر بوده که شایسته است سایر محققین به آن‌ها بپردازند تا بتوان از زیست‌پالایی نفت در مقیاس بزرگ استفاده نمود.

فهرست منابع

- Abdel-Shafy H.I. and Mansour M.S.M.A. (2016). Review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25: 107–123.
- Arjes H.A. Vo L. Dunn C.M. Willis L. DeRosa C.A. Fraser C.L. Kearns D.B. and Huang K.C. (2020). Biosurfactant-mediated membrane depolarization maintains viability during oxygen depletion in *Bacillus subtilis*. *Current Biology*. 30(6): 1011-1022.
- Bergey D.H. Hendricks D. Holt J.G. and Sneath P.H. (1984). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: Williams & Wilkins.
- Chakraborty S. Ghosh M. Chakraborti S. Jana S. Sen K.K. Kokare C. and Zhang L. (20154). Biosurfactant produced from *Actinomycetes nocardioopsis A17*: characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 405-12.
- Darsa K. Thatheyus A.J. and Ramya D. (2014). Biodegradation of petroleum compound using the bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*. 2(1): 20-25.
- Das K. and Mukherjee A.K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource*. 98(7): 1339-1345.
- De Carvalho Rocha W.F. and Sheen D.A. (2019). Determination of physicochemical properties of petroleum derivatives and biodiesel using GC/MS and chemometric methods with uncertainty estimation. *Fuel*. 243:413-22.
- Doostaki M. Ebrahimi S. Movahdei Naini S.A. and Olamaei M. (2012). Optimizing conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons by native and non-native microorganisms. *Water and soil conservation researches*. 20(4): 165-181. (In Persian).
- Gallego J.L.R. García-Martínez M.J. Llamas J.F. Belloch C. Peláez A.I. and Sánchez J. (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*. 18(3):269-281.
- Gerhardt K.E. Huang X. Glick B.R. and Greenberg B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil

- contaminants: potential and challenges. *Plant Science*. 176: 20–30.
- Greer C.W. and Juck D.F. (2017). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Spills in Cold Terrestrial Environments. Pages 645-660 in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*: Springer.
- Hongoh Y. Ohkuma M. and Kudo T. (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*. 44(2):231-42.
- Jain P. Gupta V. Gaur R. Lowry M. Jaroli D. and Chauhan U. (2011). Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 5(1):1-26.
- Kalme S. Parshetti G. Gomare S. and Govindwar S. (2008). Diesel and kerosene degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Current Microbiology*. 56(6): 581-586.
- Khosravinodeh M. Abbaspour A. Ebrahimi S.S. and Asghar H.R. (2012). Phytoremediation of a fuel oil-contaminated soil using alfalfa and grass with *pseudomonas putida* bacterium. *Water and soil conservation researches*. 20(4): 219-234. (In Persian).
- Kojouri M. and Ardestani F. (2018). Isolation, identification and evaluation of oil hydrocarbon decomposing bacteria from contaminated areas of oil fields. *Advances in Environmental Technology*. 3:139-147
- Kumari B. Singh S.N. and Singh D.P. (2012). Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochemistry*. 47(12): 2463-2471.
- Kumar M. and Khanna S. (2010). Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal of applied microbiology*. 108(4):1252-62.
- Lakshmipathy T.D. Prasad A.A. and Kannabiran K. (2010). Production of biosurfactant and heavy metal resistance activity of

- Streptomyces* sp. VITDDK3-a novel halo tolerant actinomycetes isolated from saltpan soil. *Biological Research*. 4(2):108-15.
- Mishra S. Jyot J. Kuhad R.C. and Lal B. (2001). Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*. 67(4): 1675-1681.
- Montagnolli R.N. Lopes P.R.M. and Bidoia E.D. (2015). Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental monitoring and assessment*. 187(1): 4116-4118.
- Nakamura F.M. Germano M.G. and Tsai S.M. (2014). Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon Dark Earth. *Diversity*. 6(2):339-353.
- Nogales B. Lanfranconi M.P. Piña-Villalonga J. and Bosch R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(2):275-98.
- Okerentugba P.O. and Ezerony O.U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2(9): 288-292.
- Papi Z. Ghasemi Ghofani S. Shafeinia A.R. Alami-saeed K. and Khalili moghadam B. (2016). Isolation and Identification of crude oil degrading bacteria from oil-contaminated soil areas in Khuzestan, Iran, (Thesis).
- Parthipan P. Preetham E. Machuca L.L. Rahman P.K. Murugan K. and Rajasekar A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-14.
- Sarkar J. Kazy S.K. Gupta A. Dutta A. Mohapatra B. Roy A. Bera P. Mitra A. and Sar P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in microbiology*. 7:1407.
- Shahaby A.F. Alharthi A.A. and Tarras A.E. (2015). Bioremediation of petroleum oil by potential biosurfactant-producing bacteria using gravimetric assay. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(5): 390-403.

- Souza E.C. Vessoni-Penna T.C. and de Souza Oliveira R.P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 89: 88-94.
- Thampayak I. Cheeptham N. Pathom-Aree W. Leelapornpisid P. and Lumyong S. (2008). Isolation and identification of biosurfactant producing Actinomycetes from soil. *Research Journal of Microbiology*. 3(7): 499-507.
- Vanbroekhoven K. Ryngaert A. Wattiau P. De Mot R. and Springael D. (2004). Acinetobacter diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*. 50(1):37-50.
- Weisman W. and Group TPHCW. (1998). Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media. Vol. 1. Amherst Scientific Publishers 98 Pp. Massachusetts.
- Wolicka D. Suszek A. Borkowski A. and Bielecka A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*. 100(13):3221-7.
- Zeinali M. Vossoughi M. and Ardestani S. (2007). Characterization of a moderate thermophilic Nocardia species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in Applied Microbiology*. 45(6): 622-628.
- Zeinali M. Vossoughi M. and Ardestani S. (2008). Degradation of phenanthrene and anthracene by Nocardia otitidiscaviarum strain TSH1, a moderately thermophilic bacterium. *Journal of applied microbiology*. 105(2): 398-406.

بررسی اثر نانوذره اکسید مس بر فعالیت و ساختار آنزیم پراکسیداز لیپیدیوم در ابا (LDP)

علی ریاحی مدوار^{۱*}، فرشید برزگری دهج^۲، رضا میرازی^۳، فهیمه بهرام نژاد^۲

چکیده

مقدمه: ورود نانوذرات به محیط زیست، امکان ورود آنها به بدن موجودات زنده را مهیا می‌نماید. ورود آنها به بدن می‌تواند بر روی ماکرومولکول‌های زیستی اثر گذاشته و حیات آنها را تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه، به منظور بررسی تاثیر نانوذره اکسید مس ($nCuO$) بر آنزیم نوترکیب پراکسیداز لیپیدیوم در ابا، تغییرات فعالیت و ساختار آنزیم در $nCuO$ مورد آنالیز قرار گرفتند.

روش‌ها: فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف $nCuO$ و با سه بار تکرار اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. از مطالعات فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره به منظور بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در حضور نانوذره استفاده گردید. از این مطالعات در حضور دماهای مختلف جهت تعیین پارامترهای ترمودینامیکی مانند نوع نیروهای درگیر در میانکنش نانوذره-آنزیم استفاده شد.

نتایج و بحث: فعالیت آنزیم در حضور $nCuO$ بصورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به محدوده غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار نانوذره است که بیش از ۴۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. شدت فلورسانس ذاتی در حضور نانوذره در روندی وابسته به غلظت کاهش یافت. پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتروپی (ΔS°) و آنتالپی (ΔH°) مربوط به میانکنش آنزیم با نانوذره بترتیب ۰/۱۰۸ و ۳/۸۱ محاسبه گردید. مثبت بودن این پارامترها، نشان دهنده نقش مهم میانکنش‌های هیدروفوب در این فرایند است. از طرف دیگر، منفی بودن تغییرات انرژی آزاد واکنش (ΔG°) نشان دهنده این است که این فرایند انرژی‌زا بوده و بصورت خودبخودی پیش می‌رود.

کلمات کلیدی: پارامترهای ترمودینامیکی، فلورسانس، میانکنش‌های هیدروفوب.

۱. نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد،

بجنورد، ایران. پست الکترونیکی: Riahi.ali@gmail.com

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

۳. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران.

مقدمه

امروزه استفاده از نانوذرات (مواد و ترکیباتی که حداقل یکی از ابعاد عملکردی آن‌ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن‌ها، که خود ناشی از اندازه و ابعاد آن‌ها است، به طور روز افزون در حال افزایش است (Ball, 2002; Brandes *et al.*, 2006). تولید و استفاده بیش از حد نانوذرات می‌تواند منجر به راه‌یابی این ذرات به اکوسیستم‌های مختلف - شود (Monica & Cremonini, 2009). مطالعات مختلف حاکی از اثرات مضر و زیانبار ترکیبات نانویی مختلف همچون نانولوله‌های کربنی و اکسید تیتانیوم بر روی سلول‌های جانوری در محیط آزمایشگاه و همچنین بر اندام‌های مختلف بدن جانوران از جمله ریه است (Brunner *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008).

نانوذرات فلزی با سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری سطحی بالا، نه تنها می‌توانند توسط تماس فیزیکی معمولی جذب شوند بلکه می‌توانند با پروتئین‌های زیستی میانکنش دهند و توسط سلول‌ها جذب گردند (Wang *et al.*, 2005). سریم اکسید (CeO_2) در مقیاس نانو می‌تواند با سرم آلبومین گاوی واکنش دهد و توسط سلول‌های سرطانی ریه جذب شود (Patil *et al.*, 2007). نانوذرات می‌توانند باعث تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها شوند که عموماً بر واکنش‌های بیولوژیکی آن‌ها اثر می‌گذارند (Brandes *et al.*, 2006). اندازه، شیمی سطح، بار و شکل نانوذرات، نقش اصلی در تعامل بین آن‌ها و پروتئین‌ها دارد (Saptarshi *et al.*, 2013).

از میان نانوذرات اکسید فلزی، نانوذرات اکسید مس با توجه به خواص جذاب آن‌ها مانند ثبات بالا، واکنش‌پذیری و دمای کریستال بالا، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. به همین دلیل است که در ابررساناها، سنسورهای گاز، لوازم آرایشی و کاربردهای فتوترمال مورد استفاده قرار گرفته‌اند

(Chang *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2000). بررسی‌های انجام شده بر روی جذب CuO توسط ریشه گیاه گندم با کمک یون‌ها (Na^{+2} ، Mg^{+2} و La^{+3}) و همچنین سورفاکتانت‌ها (مانند سدیم دودسیل بنزن سولفونات) و عواملی مانند Na_4EDTA و تکنیک اولتراسونیک صورت گرفته، نشان داد که این نانوذره به شدت توسط ریشه این گیاه جذب می‌گردد و در بخش‌هایی بصورت مکانیکی به آن متصل می‌گردد. مواد Na_4EDTA باعث حل بهتر نانوذره CuO و در نتیجه جذب بهتر آن شد (Zhou *et al.*, 2011).

آنزیم پراکسیداز به‌طور گسترده در طبیعت توزیع شده و می‌توان این آنزیم را به آسانی از بیشتر سلول‌های گیاهی، بعضی اندام‌ها و بافت‌های حیوانی استخراج نمود. آنزیم پراکسیداز از گروه اکسیدوردوکتازها است و حاوی گروه هم به‌عنوان گروه پروستتیک است. محدوده وزن مولکولی آن‌ها از ۳۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون است (Welinder, 1976). این آنزیم‌ها به‌طور گسترده در ایمنی‌سنجی، ژنتیک، بیوشیمی بالینی، پزشکی، کیت‌های تشخیصی، تصفیه فاضلاب‌ها، هیستوشیمی و سیتوشیمی، بیوسنسورها، سنتز پلیمر و ژن‌درمانی سرطان کاربرد دارند (Hamid *et al.*, 2009). به دلیل اهمیت پراکسیدازها در بیوتکنولوژی، اخیراً ژن کد کننده آنزیم پراکسیداز از گیاه *Lepidium draba* جداسازی و پس از شناسایی و تعیین توالی، در میزبان *E.coli* کلون و بیان شد. این آنزیم، از پلی‌پپتیدی با طول ۳۰۸ اسیدآمینو تشکیل شده است و وزن مولکولی آن ۳۴ کیلودالتون تخمین زده می‌شود. بر اساس این‌که pH ایزوالکتریک آن حدود ۷/۷ است و اینکه بالاترین تشابه را با ایزوآنزیم‌های خنثی HRP دارد این آنزیم متعلق به ایزوآنزیم‌های پراکسیداز خنثی ارزیابی شده است (Fattahian *et al.*, 2017a).

مطالعات مختلف نشان داده است که اتصال مواد و حتی داروها (لیگاندها) به پروتئین‌ها می‌تواند ساختار و حتی عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار دهد (Carter & Ho, 1994). اساساً در اتصال لیگاند به پروتئین چهار نوع میانکنش غیرکوالان شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروهای واندروالس، میانکنش‌های هیدروفوبی و الکتروستاتیک می‌تواند دخیل باشد. از روی علامت و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی (آنتالپی و آنتروپی) می‌توان به نوع نیروی دخیل در میانکنش‌های لیگاند- پروتئین در یک واکنش پی‌برد. مطالعات مختلف بیانگر این است که در اتصال نانوذرات به پروتئین‌های مکانیسم‌ها و نیروهای مختلف درگیرند. به عنوان مثال، Roy و همکاران، برهمکنش بین نانوذره اکسید مس با پروتئین آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانو ذره اکسید مس از طریق میانکنش‌های الکتروستاتیک و هیدروفوب به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود ولی تخریب کامل ساختار آنزیم در حضور نانوذره صورت نمی‌گیرد (Roy & Das, 2014).

Mahanthappa و همکاران، برهمکنش نانوذره سولفید مس با آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۲۵، ۲۸ و ۳۴ سانتی گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانوذره سولفید مس از طریق پیوند های واندروالسی و هیدروژنی به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود (Mahanthappa et al., 2018). Yang و همکاران، برهمکنش بین نانوذره اکسید آهن با آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۱۸، ۲۵ و ۴۰ سانتی گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانو ذره اکسید آهن از طریق پیوند الکتروستاتیکی به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث برخی تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود (Yang et al., 2009).

نظر به استفاده گسترده از نانوذره اکسید مس در صنایع مختلف و از آنجائیکه آنزیم پراکسیداز در بدن تمام موجودات زنده از جمله انسان وجود داشته و نقش کلیدی در حذف رادیکال‌های آزاد H_2O_2 دارد، در این مطالعه تغییرات فعالیت و ساختاری آنزیم پراکسیداز LDP در میانکنش با نانوذره اکسید مس مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل عصاره مخمر، تریپتون، کلرید سدیم، آگار جهت تهیه محیط کشت LB و LB-آگار، تترا متیل اتیل دی آمین، بیس آکریل آمید، SDS، تریس باز، اسید کلریدریک، ایزوپروپنول، ۲-بتا مرکاپتوتاتانول، بروموفنول بلو، کوماسی بلو، ایمیدازول، کلرید کلسیم، IPTG، از شرکت Merk آلمان تهیه گردید. آنتی بیوتیک کانامایسین از شرکت Roche خریداری شد.

8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) نمک‌های دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، Isopropyl- β -d- thiogalactopyranoside (IPTG) و 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) از شرکت سیگما خریداری شدند. نانوذره اکسید مس (CuO) با درصد خلوص ۹۹/۲، مساحت سطح $55 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ و میانگین اندازه ۶۰ نانومتر از شرکت ناباند تکنولوژی (NaBond Technologies Co., Ltd., China) خریداری گردید.

جهت تخلیص پروتئین نو ترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت Invitrogen خریداری شد. جهت تغلیظ پروتئین و

حذف نمک‌ها از فیلتر Amicon استفاده شد (Fattahian *et al.*, 2017a). این فیلتر از شرکت Milipor خریداری گردید.

روش‌ها

بیان و تخلیص آنزیم پراکسیداز LDP

جهت تخلیص آنزیم نو ترکیب LDP ابتدا باکتری حاوی ژن پراکسیداز لیپیدیوم درابا با استفاده از محیط کشت LB حاوی کانامایسین در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ کشت داده شد و پس از رسیدن OD_{600} به ۰/۷، بیان بیشتر با استفاده از IPTG ۱ میلی مولار به مدت ۷ ساعت در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۱۸ انجام گرفت. آنزیم نو ترکیب توسط ستون نیکل سفارز تخلیص گردید (Fattahian *et al.*, 2017a). جهت تأیید خلوص پروتئین از ژل SDS-PAGE استفاده شد. به منظور تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم LDP

فعالیت آنزیم از روش Krainer و همکاران اندازه‌گیری شد (Krainer *et al.*, 2014). بطور خلاصه، مخلوط واکنش شامل ۰/۰۷۱ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم LDP، ۱ میلی مولار H_2O_2 و ۰/۶ میلی مولار TMB به عنوان سوبستراهای آنزیم و در حجم نهایی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH ۶/۷۵ آماده شد. افزایش جذب در طول موج ۶۵۳ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه و در فواصل ۳۰ ثانیه‌ای سنجیده شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از ضریب خاموشی TMB اکسید شده در این طول موج ($3/9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم LDP در حضور نانوذره CuO

جهت بررسی فعالیت آنزیم در حضور نانوذره، بر اساس روش Sarvandi-Dehghanpoor و همکاران (۲۰۱۸) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱ میلی لیتر و با غلظت نهایی ۱ میلی مولار H_2O_2 ، ۰/۶ میلی مولار TMB، ۷۰ میکرولیتر آنزیم با غلظت نهایی ۰/۰۷۱ میلی گرم بر میلی لیتر و در حضور غلظت های متفاوت صفر (به عنوان کنترل)، ۳۵، ۸۰، ۱۸۰، ۱۳۰، و ۲۱۰ نانو مولار* نانوذره تهیه شد. مخلوط واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای محیط انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم مطابق روش ذکر شده سنجیده شد. میانگین داده های حاصل از سه بار تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ توسط آزمون دانکن (Duncan test) با در نظر در سطح معنی دار ۵ درصد مورد تجزیه واریانس یک عاملی (ANOVA way One) قرار گرفتند.

*مولار در اینجا همان مولاریته ذره یا Particle molarity است که برای نانوذرات مورد استفاده قرار می گیرد.

مطالعات ساختاری

به منظور بررسی اثرات نانوذره بر ساختار آنزیم از مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی استفاده شد. برای جلوگیری از ایجاد اختلال در طیف فلورسانس، ایمیدازول و نمک های موجود در محلول پروتئین با استفاده از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلودالتونی حذف شدند (Fattahian et al., 2017). طیف های مربوطه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian, Australia) Cary Elips ثبت شد.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس خارجی

جهت بررسی تغییرات هیدروفوبیسیته آنزیم در حضور نانوذره از طیف نشری فلورسانس مربوط به فلوروفور ANS استفاده شد (Riahi-Madvar et al., 2021). فلورسانس ANS در غلظت ۳۰ میکرومولار و غلظت ۷ میکرومولار آنزیم به صورت زیر انجام شد. ابتدا طیف فلورسانس ANS در محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۷۵ ثبت شد طبق شرایط ذیل ثبت گردید.

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۳۵۰ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر، Slit (پهنای باند نور تابیده‌شده یا ثبت‌شده توسط دتکتور): ۱۰ نانومتر.

سپس طیف مربوط به آنزیم LDP کمپلکس شده با ANS و آنزیم LDP کمپلکس با نانوذره CuO (غلظت ۲۱۰ نانومولار) با ANS که به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شده بود طبق شرایط ذکر شده ثبت گردید.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی LDP در میانکنش با نانوذره CuO

جهت مطالعه برهمکنش نانوذره اکسید مس با LDP آزمایش به صورت زیر انجام شد:

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۲۸۰ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۳۰۰-۵۰۰ نانومتر، سرعت اسکن ۵۰۰ نانومتر بر دقیقه و پهنای باند نور تابیده‌شده (۵ نانومتر) و ثبت‌شده توسط دتکتور: ۱۰ نانومتر.

حجم نهایی شامل پروتئین با غلظت نهایی ۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نانوذره با غلظت‌های نهایی صفر، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۸۰، ۹۰، ۱۱۰، ۱۳۰، ۱۵۰، ۱۷۰ و ۱۹۰ نانومولار در یک میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰

میلی-مولار با pH برابر ۶/۷۵ در سل کوارتز یک سانتی-متری بود. طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در طول موج تحریک ۲۸۰ نانومتر پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۲۹۸ درجه کلوین ثبت گردید. علاوه بر این، فلورسانس ذاتی پروتئین در دماهای ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین در حضور غلظت‌های مختلف این نانوذره اندازه‌گیری شد.

بررسی نوع مکانیسم میانکنش

جهت بررسی نوع مکانیسم میانکنش نانوذره با پروتئین، نمودار استرن-ولمر مربوط به هر یک از دماها، برحسب شدت فلورسانس در طول موج ۳۴۰ نانومتر و غلظت نانوذره (نانو-مولار) ترسیم گردید (Riahi-Madvar et al., 2021). پس از بدست آوردن معادله خط مربوط به نمودار، ثابت‌های خاموشی بر اساس معادله ۱ محاسبه گردید.

معادله ۱

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

در این معادله F_0 و F به ترتیب شدت‌های فلورسانس پروتئین در غیاب و حضور خاموش کننده، K_q ثابت سرعت خاموشی پروتئین، K_{SV} ثابت خاموشی دینامیک یا ثابت استرن-ولمر (عکس مولار.ثانیه)، $[Q]$ غلظت خاموش کننده برحسب مولار است (Gelamo et al., 2002; Lakowicz, 1999). τ_0 متوسط نیمه عمر پروتئین بدون خاموش کننده (۵ نانوثانیه) است (Xie et al., 2006).

مقدار K_q را می‌توان از معادله ۲ بدست آورد.

معادله ۲

$$K_{SV} = K_q \tau_0$$

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی

جهت تعیین نیروهای دخیل در میانکنش پروتئین با نانوذره، پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی و آنتروپی با استفاده از معادله ۳ محاسبه شدند.

معادله ۳

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

در این معادله؛ K: ثابت استرن ولمر در دماهای مختلف برحسب عکس مولار، ΔH^0 : تغییرات آنتالپی استاندارد واکنش برحسب کالری بر مول بر درجه کلون، ΔS^0 : تغییرات آنتروپی استاندارد واکنش برحسب (مول.کلون بر ژول) و R: ثابت گازها (مول.کلون بر ژول) است.

مقدار تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (کیلوکالری بر مول) بر اساس معادله ۴ محاسبه گردید.

در این رابطه K: ثابت استرن ولمر در دماهای مختلف برحسب عکس مولار، ΔH^0 : آنتالپی واکنش بر حسب کالری بر مول بر درجه کلون، ΔS^0 : آنتروپی واکنش بر حسب (مول.کلون) بر ژول و R: ثابت گازها (مول.کلون بر ژول) است (Sanei et al., 2011; Chen et al., 2011).

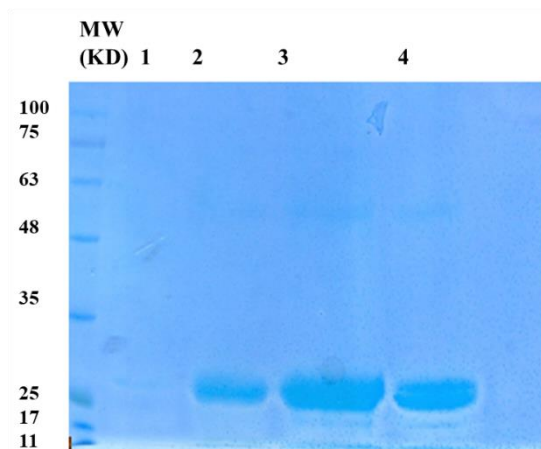
معادله ۴

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

نتایج

بیان و تخلیص آنزیم LDP

کیفیت نمونه‌های تخلیص شده با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE مشخص گردید (شکل ۱). از نمونه‌های تفکیک شده مربوط به ردیف‌های ۲ تا ۴ که از خلوص بالاتری برخوردارند جهت ادامه آزمایشات استفاده شد.



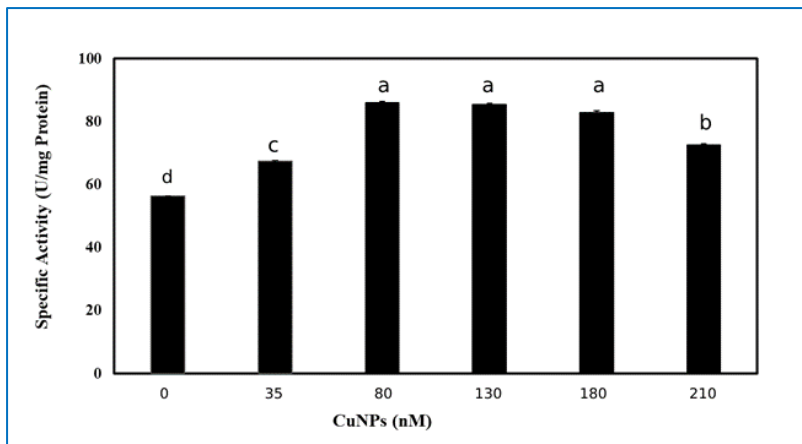
شکل ۱- تخلیص پروتئین نو ترکیب LDP با غلظت‌های مختلف ایمیدازول. MW نشانگر وزن مولکولی پروتئین، شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب مربوط به نمونه‌های تخلیص شده با ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول است.

Figure 6. Purification of recombinant LDP with different concentrations of imidazole. Lane MW is the protein ladder, numbers 1-4 are the purified sample related to the imidazole concentrations of 50, 100 and 200 300 mM respectively.

تغییرات فعالیت آنزیم LDP در حضور نانوذره CuO

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، فعالیت آنزیم کمپلکس شده با نانوذره در تمامی غلظت‌ها نانوذره نسبت به آنزیم آزاد به‌طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد افزایش نشان می‌دهد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به محدوده

غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار نانوذره است که بیش از ۴۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است. در حالی که افزایش فعالیت آنزیم در حضور بیشترین غلظت نانوذره و کمترین غلظت نانوذره به ترتیب ۲۸ و ۱۹ درصد است.

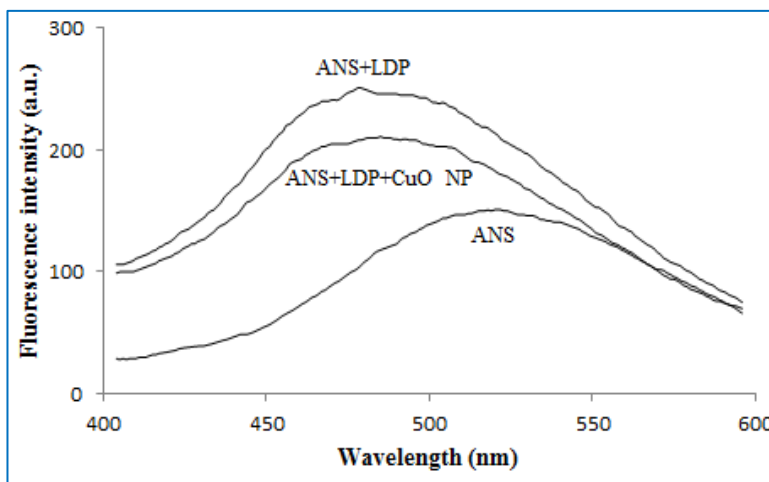


شکل ۲- تغییرات فعالیت ویژه آنزیم LDP در حضور نانوذره اکسید مس. ستون‌ها نشان دهنده میانگین حاصل از سه تکرار $\pm$ انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 2. Changes of LDP specific enzyme activity in the presence of nCuO. Bars represent means $\pm$ SD, n= 3. Signs with different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

فلورسانس ANS

با توجه به شکل ۳، ماکزیمم شدت نشر فلورسانس ANS در مورد آنزیم کمپلکس شده با نانوذره نسبت به آنزیم آزاد کاهش نشان می‌دهد.



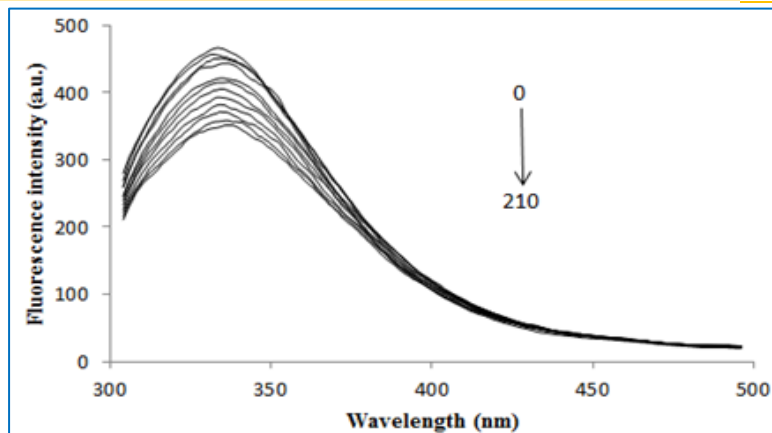
شکل ۳- طیف نشری فلورسانس ANS، ANS+LDP و ANS+LDP+NP

Figure 3. ANS, ANS-LDP and ANS-LDP+nCuO fluorescence spectra

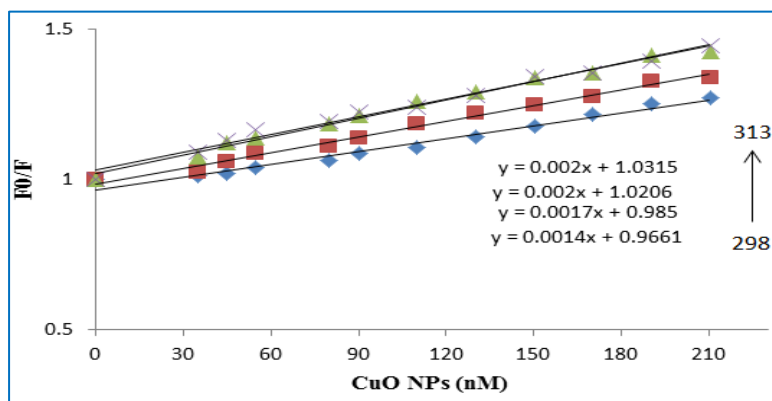
فلورسانس ذاتی LDP در حضور نانوذره اکسید مس در دماهای ۲۹۸، ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین

تأثیر دما بر میانگین پروتئین با نانوذره اکسید مس، با اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی LDP در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همانند آنچه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذره در محیط، شدت نشر فلورسانس ذاتی آنزیم کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی در دماهای بالاتر نیز بدست آمد.

نتایج بدست آمده از معادله استرن-ولمر در طول‌موج نشری ۳۴۰ نانومتر بر حسب غلظت‌های مختلف نانوذره نشان می‌دهد که میزان خاموش شدگی نشر فلورسانس با غلظت نانوذره رابطه خطی داشته و هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط میزان نشر نیز کاهش می‌یابد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با افزایش دما میزان کاهش شدت فلورسانس کمتر شده است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف (۰ تا ۲۱۰ نانومولار) نانوذره اکسید مس بر فلورسانس ذاتی LDP.
Figure 4. Effects of nCuO different doses (0-210 nM) on LDP intrinsic fluorescence



شکل ۵- مقایسه نمودار استرن-ولمر برهمکنش پروتئین LDP با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس در دماهای مختلف

Figure 5. Stern-Volmer plat comparison of interaction LDP with different concentrations of nCuO in different temperatures

تعیین نوع میانکنش LDP و نانوذره اکسید مس

ثابت خاموشی استرن-ولمر (K_{sv}) و ثابت سرعت خاموشی فلورسانس (K_q) از روی معادله خط مربوط به هریک از نمودارهای استرن-ولمر در دماهای مختلف محاسبه و در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول قابل مشاهده است هر دو ثابت خاموشی و ثابت سرعت با افزایش دما افزایش یافته است.

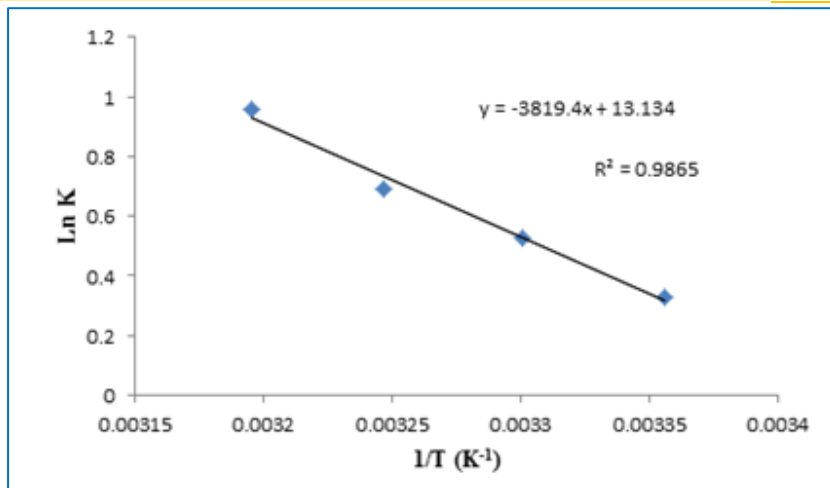
جدول ۱- ثابت‌های خاموشی مربوط به میانکنش LDP با نانوذره اکسید مس

Table 1. Quenching constants related to the LDP interaction with nCuO

کلوین) دما	K_{sv} ($1 \times 10^{-12} \text{ L mol}^{-1}$)	K_q ($1 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
۲۹.۸	۱/۴	۰/۲۸
۳۰.۳	۱/۷	۰/۳۴
۳۰.۸	۲	۰/۴
۳۱.۳	۲	۰/۴

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی در میانکنش LDP و نانوذره اکسید مس

با استفاده از معادله خط بدست آمد از نمودار وانت‌هوف (شکل ۶)، آنتالپی و آنتروپی میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۲ قابل مشاهده است علامت ΔH و ΔS مثبت است.



شکل ۶- نمودار وانت هوف مربوط به میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP.

Figure 6. Van't Hoff plat of interaction LDP with nCuO

از طرف دیگر بر اساس معادله ۴، مقدار تغییرات انرژی آزاد برای این میانکنش در دماهای مختلف محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می گردد علامت این پارامتر منفی بوده و با افزایش دما کاهش یافته است.

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP.

Table 2. Thermodynamic parameters of interaction LDP with nCuO

Temp (K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	$H\Delta$ (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K)
۲۹۸	-۲۸/۳۸	۳/۸۱	۰/۱۰۸
۳۰۳	-۲۸/۹		
۳۰۸	-۲۹/۴		
۳۱۳	-۳۰		

بحث و نتیجه گیری

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات از قبیل اندازه و ابعاد آن‌ها در سال‌های اخیر استفاده از آن‌ها در محصولات تجاری و صنعتی بطور چشمگیری افزایش یافته است (Roco, 1999). بنابراین دور از انتظار نیست که آن‌ها راهی برای ورود به اکوسیستم‌ها پیدا نموده و حیات موجودات زنده را تحت تاثیر قرار دهند (Riahi-Madvar *et al.*, 2021). با توجه به اینکه، آنزیم پراکسیداز در بدن تمام موجودات زنده از جمله انسان وجود داشته و نقش کلیدی در حذف رادیکال‌های آزاد H_2O_2 دارد، در این تحقیق، بمنظور بررسی تغییرات فعالیت و ساختاری آنزیم پراکسیداز LDP در میانکنش با نانوذره اکسید مس، ابتدا آنزیم نو ترکیب LDP با استفاده از ستون نیکل سفارز تخلیص شد و سپس کیفیت خلوص آن با تفکیک بر روی ژل SDS PAGE مورد تأیید قرار گرفت. بررسی فعالیت آنزیم LDP در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره CuO نشان داد که فعالیت آنزیم در روندی وابسته به غلظت نانوذره تحت تاثیر قرار گرفته است و در حضور تمامی غلظت‌ها، فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد بطور معنی‌داری در سطح ۵ درصد افزایش یافته است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، کمترین افزایش فعالیت در حضور پایین‌ترین غلظت نانوذره یعنی غلظت ۳۵ نانومولار مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت نانوذره در محیط در محدوده غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار، آنزیم بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد و با افزایش غلظت نانوذره در محیط، فعالیت آنزیم روند کاهشی بخود می‌گیرد. پژوهش‌های متعددی نشان داده است، زمانی که آنزیم‌ها در معرض نانوذرات قرار می‌گیرد، فعالیت آن‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مطالعات انجام شده توسط Kim و همکاران نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی (HRP) در حضور نانوذره مگنتیک (Fe_3O_4)

افزایش می‌یابد (Kim *et al.*, 2016). این مشاهدات با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد. احتمال می‌رود که تغییر فعالیت آنزیم‌ها در حضور نانوذره احتمالاً به دلیل تغییر در ساختار آنزیم است.

روش‌های مختلفی جهت مطالعه تاثیر مواد بر ساختار پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است که از مهمترین آنها می‌توان به روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی مرئی-ماورای بنفش، دورنگ‌نمایی حلقوی (CD) و رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR) اشاره نمود (Kandagal *et al.*, 2007; Volkova *et al.*, 2007). از بین روش‌های مذکور، فلورسانس به دلیل حساسیت بالا، انتخابگری و سهولت کار با آن به صورت گسترده‌تری مورد استفاده قرار گرفته است (Chen *et al.*, 2011). سنجش فلورسانس، اطلاعاتی در مورد محیط اطراف یک کروموفور خاص مانند ANS (فلورسانس خارجی) و یا اسید آمینه‌های آروماتیک (فلورسانس ذاتی) در یک پروتئین می‌دهد (Rodrigues *et al.*, 2013). گزارش شده که در ساختار آنزیم LDP یک تریپتوفان، ۶ تیروزین و ۱۹ فنیل آلانین وجود دارد (Fattahian *et al.*, 2017b). در این مطالعه جهت بررسی تغییرات ساختار آنزیم در حضور نانوذره مس از مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی استفاده گردید.

همانطور که در نتایج آمده است در دما ۲۹۸ درجه کلوین، در حضور نانوذره اکسید مس، فلورسانس ذاتی آنزیم کاهش یافته است. نمودار استرن-ولمر مربوطه (شکل ۵) نشان داد که رابطه بین میزان کاهش نشر و غلظت نانوذره خطی است. نتایج مشابهی توسط Huang و همکاران در برهمکنش HSA با کوانتوم دات CdTe:Zn^{2+} گزارش شده است (Huang *et al.*, 2015) که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. همچنین نتایج مشابهی در

برهمکنش نانوذره اکسید مس با HSA گزارش گردیده است (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

جهت بررسی تغییر در پاکت‌های هیدروفوب سطحی آنزیم در کمپلکس با نانوذره نسبت به آنزیم آزاد، از فلورسانس خارجی ANS استفاده شد. ANS یک فلوروفور هیدروفوب است که پس از اتصال به محیط‌های هیدروفوب، نشر آن افزایش می‌یابد. نتایج بررسی فلورسانس خارجی با استفاده از فلوروفور ANS نشان داد که نشر این فلوروفور پس از اتصال به پروتئین متصل شده به نانوذره نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. این مشاهدات با نتایج منتشر شده توسط Sen و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. آن‌ها مشاهده کردند که طیف نشری فلورسانس ANS در پروتئین آلبومین متصل شده به نانوذرات طلا نسبت به پروتئین متصل نشده به نانوذره کمتر است (Sen et al., 2011). کاهش نشر فلورسانس این فلوروفور، نشان دهنده این واقعیت است که میزان هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین در اثر میانکنش با این ذره کاهش یافته است. این مشاهدات با نتایج گزارش شده توسط Riahi-Madvar و Ghaseminesab در ارتباط با میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی مغایرت دارد. آن‌ها گزارش کردند که نشر فلورسانس ANS در حضور آلبومین سرم انسانی میانکنش داده با نانوذرات اکسید مس نسبت به سرم آلبومین میانکنش نداده افزایش یافته است (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

مجموع نتایج مربوط به تغییر فعالیت آنزیم و تغییرات فلورسانس ذاتی و خارجی در حضور نانوذره اکسید مس بیانگر نوعی میانکنش بین آن‌ها است. جهت بررسی نوع میانکنش بین نانوذره اکسید مس با آنزیم از مطالعات فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره در دماهای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین) استفاده شد. نتایجی مشابه آنچه که

در دما ۲۹۸ درجه کلوین مشاهده می‌شود (شکل ۴) در دماهای بالاتر (۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین) نیز مشاهده گردید. بر اساس نمودار استرن-ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس در دماهای مختلف (شکل ۵) چنین استنباط می‌شود که با افزایش دما، شیب نمودار مربوطه افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، با افزایش دما، میزان خاموشی فلورسانس ذاتی مربوط به اسیدآمین‌های آروماتیک در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره بصورت تابعی از غلظت نانوذره افزایش می‌یابد. این نتایج با مشاهدات مربوط به میانکنش نانوذره اکسید مس با HSA که نشان داد با افزایش دما، شیب نمودار استرن-ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس کاهش می‌یابد مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

بر اساس نتایج (جدول ۱) پارامترهای مربوط به ثابت خاموشی (K_q و K_{sv}) با افزایش دما از ۲۹۸ درجه کلوین به ۳۱۳ درجه کلوین افزایش می‌یابند. این مشاهدات با نتایج گزارش شده در اتصال کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ به HSA توسط Huang و همکاران (Huang *et al.*, 2015) و همچنین نتایج گزارش شده در ارتباط با میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). مطالعات مختلف نشان داده است که تاثیر نانوذرات بر پروتئین‌ها، علاوه بر نوع پروتئین، به ماهیت نانوذره و اندازه آن نیز بستگی دارد (Iranfar *et al.*, 2012; Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

نقش و اهمیت پارامترهای ترمودینامیکی، در ارتباط با انواع مختلف میانکنش‌هایی که در روند اتصال به پروتئین‌ها ممکن است رخ دهد توسط Ross و Subramanian در سال ۱۹۸۱ مشخص گردید. آنها مطرح کردند که اگر آنتالپی و آنتروپی هر دو بزرگتر از صفر باشد؛ میانکنش از نوع هیدروفوب و اگر هر دو پارامتر مذکور کوچکتر از صفر باشد، میانکنش‌های واندروالسی و

پیوند هیدروژنی در اتصال نقش دارد و اگر آنتالپی کوچکتر از صفر و آنتروپی بزرگتر از صفر باشد، میانکنش‌های الکتروستاتیک عامل اصلی اتصال است (Ross & Subramania, 1981). بر اساس نتایج حاصل هر دو پارامترهای ترمودینامیکی شامل، آنتالپی و آنتروپی بزرگتر از صفر است. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که میانکنش‌های هیدروفوب عامل اصلی اتصال نانوذره با آنزیم است. مطالعات اخیر نشان داده است که در میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس میانکنش‌های الکتروستاتیک دخیل است که با نتایج حاصل از این تحقیق مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). از طرف دیگر، مطالعات Rabbani و همکاران نشان داده است که در میانکنش اتصال نانوذرات اکسید مس با آنزیم بتا گالاکتوزیداز، پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالس دخالت دارد (et al., 2014 Rabbani). بنظر می‌رسد که نوع مکانسیم اتصال و نیروهای دخیل در اتصال تابعی از اندازه، غلظت و همچنین ماهیت نانوذره در محیط باشد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). مطالعات انجام شده توسط ایرانفر و همکاران نیز نشان دادند که با تغییر اندازه نانوذره نقره در محیط رفتارهای متفاوتی رخ می‌دهد، بطوریکه با افزایش اندازه نانوذره نقره در حضور Ciprofloxacin، ثابت سرعت خاموشی و همچنین ثابت معادله استرن-ولمر افزایش می‌یابد. آنها نتیجه گرفتند که نانوذرات با ابعاد مختلف عملکردهای متفاوتی در محلول پروتئینی از خود نشان می‌دهد که می‌تواند با لایه‌های مختلف آبیوشی اطراف آنها مرتبط باشد (Iranfar et al., 2012). علاوه بر این، ΔG° منفی بیانگر انرژی‌زا بودن واکنش میانکنش بین نانوذره اکسید مس با آنزیم LDP است که بطور خود به خودی پیش می‌رود (Huang et al., 2015). این نتیجه با مشاهدات مربوط به میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس، همخوانی دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

بر اساس نتایج ترمودینامیکی چنین استنباط می‌شود که میانکنش بین نانوذره اکسید مس و آنزیم LDP به صورت خود به خودی و با استفاده از میانکنش‌های هیدروفوب پیش می‌رود. مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی نشان داد که این میانکنش با تغییراتی در ساختاری آنزیم همراه است بطوریکه فشردگی ساختار آنزیم نسبت به نمونه کنترل کمتر شده است. تغییر در ساختار آنزیم پس از در معرض قرار گرفتن با نانوذره می‌تواند دلیلی بر تغییر فعالیت آنزیم در این شرایط باشد. از طرف دیگر، مغایرت‌هایی در مطالعه میانکنش نانوذره اکسید مس با آنزیم LDP در مقایسه با مطالعات مشابه مشاهده گردید که می‌تواند به دلیل رفتار متفاوت نانوذرات که ناشی از تغییر اندازه، ماهیت و همچنین شکل نانوذرات باشد که با پروتئین‌های مختلف به صورت‌های متفاوتی بروز می‌کند. در هر صورت، مطالعات بیشتری از قبیل زمان در معرض قرار گرفتن، دما، pH و ... باید مد نظر قرار گیرد تا رفتارهای نانوذرات با پروتئین‌ها مورد ارزیابی دقیق‌تر قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی جیرفت با قرارداد شماره ۹۸-۱۹۵-P انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد.

فهرست منابع

- Ball, P. (2002). Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology* 13: 15-28.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Brandes, N., Welzel, P.B., Werner, C. and Kroh, L.W. (2006) Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis. *J Colloid Interface Sci* 299(1): 56-69.
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A. and Stark, W.J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol* 40(14): 4374-4378.
- Carter, D.C. and Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153-203.
- Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J. and Xing, G. (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5(12): 2850-2871.
- Chen, L., Wu, M., Lin, X. and Xi, Z. (2011). Study on the interaction between human serum albumin and a novel bioactive acridine derivative using optical spectroscopy. *Luminescence* 26: 172-177.
- Dai, P., Mook, H.A., Aeppli, G., Hayden, S.M. and Doğan, F. (2000). Resonance as a measure of pairing correlations in the high-T_c superconductor YBa₂Cu₃O_{6.6}. *Nature* 406(6799): 965.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G. (2017a). Heterologous Expression, Purification and Characterization of a Peroxidase Isolated from *Lepidium draba*. *The protein journal* 36(6): 461-71.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G., Mohammad Reza Rahbar, M.R. (2017b). In silico locating the immune-reactive segments of *Lepidium draba* peroxidase and designing a less immune-reactive enzyme derivative. *Computational biology and chemistry* 70: 21-30.
- Gelamo, E.L., Silva, C.H.T.P., Imasato, H. and Tabak, M. (2002). Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic

- surfactants: spectroscopy and modeling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1594: 84-99.
- Hamid, M. (2009) Potential applications of peroxidases. *Food chemistry* 15; 115(4):1177-86.
- Huang, S., Qiu, H., Liu, Y., Huang, C., Sheng, J., Su, W. and Xiao, Q. (2015) Molecular interaction investigation between three CdTe: Zn²⁺ quantum dots and human serum albumin: a comparative study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136: 955-962.
- Iranfar, H., Rajabi, O., Salari, R., and Chamani, J. (2012). Probing the Interaction of Human Serum Albumin with Ciprofloxacin in the Presence of Silver Nanoparticles of Three Sizes: Multispectroscopic and ζ Potential Investigation, the journal of physical chemistry, *J. Phys. Chem. B*, 116, 1951-1964
- Kandagal, P.B., Shaikh, S.M.T., Manjunatha, D.H., Seetharamappa, J. and Nagaralli, B.S. (2007). Spectroscopic studies on the binding of bioactive phenothiazine compounds to human serum albumin. *J Photochem Photobiol A: Chem* 189: 121-7.
- Kim, S., Lee, J., Jang, S., Lee, H., Sung, D. and Chang, J.H. (2016). High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal* 105: 406-411.
- Krainer, F.W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A. and Spadiut O. (2014). Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 95: 104-112.
- Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 368.
- Lee, W.M., An, Y.J., Yoon, H. and Kweon, H.S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 27(9): 1915-1921.
- Mahanthappa, M., Savanur, M.A., Puthusseri, B. and Yellappa, S. (2018). Spectroscopic and electrochemical studies on the molecular interaction between copper sulphide nanoparticles and bovine serum albumin. *J Mater Sci* 53(1): 202-214.

- Monica, R.C. and Cremonini R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2): 161-165.
- Park, W.J., Choi, K.J., Kim, M.H., Koo, B.H., Lee, J.L. and Baik, J.M. (2013). Self-assembled and highly selective sensors based on air-bridge-structured nanowire junction arrays. *ACS Appl Mater Interfaces* 5(15): 6802-6807.
- Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W. and Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 28: 4600-4607.
- Rabbani, G., Khan, M.J., Ahmad, A., Yusof Maskat, M. and Khan, R.H. (2014). Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of β -galactosidase. *Colloids Surf B Biointerfaces* 123: 96-105.
- Riahi-Madvar, A. Ghaseminesab, A. Barzegary-Dehaj, F., Zamani, Z. and Rezaee F. (2021). Investigation of the Fe₂O₃ nanoparticles interaction with human serum albumin using fluorescence and circular dichroism (CD) techniques. *Molecular and Cellular Researches*. In Press (in Persian).
- Riahi-Madvar, A. and Ghaseminesab, A. (2018). Study of the CuO nanoparticles interaction with human serum albumin using fluorescence technique. *Molecular and Cellular Researches* 30(4): 339-348. (in Persian).
- Roco MC. (1999). Nanoparticles and nanotechnology. *JNR* 1: 1-6.
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Roberto Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* 42(15): 6290-6307.
- Ross, P.D. and Subramania, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20(11): 3096-102.
- Roy, S. and Das, T.K. (2014). Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin. *J Nanosci Nanotechnol* 14(7): 4899-4905.
- Sanei, H., Asoodeh, A., Hamedakbari-Tusi, S. and Chamani, J. (2011). Multi-spectroscopic Investigations of Aspirin and Colchicine Interactions with Human Hemoglobin: Binary and Ternary Systems. *J Solution Chem* 40: 1905–1931.

- Saptarshi, S.R., Duschl, A. and Lopata, A.L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol* 11(1): 26.
- Sen, T., Mandal, S., Haldar, S., Chattopadhyay, K. and Patra, A. (2011). Interaction of gold nanoparticle with human serum albumin (HSA) protein using surface energy transfer. *The Journal of Physical Chemistry C* 115(49): 24037-24044.
- Volkova, K.D., Kovalska, V.B., Tatarets, A.L., Patsenker, L.D., Kryvorotenko, D.V. and Yarmoluk, S.M. (2007). Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes. *Dyes Pigments* 72: 285–92.
- Wang, B.X., Li, C.H. and Peng, X.F. (2005). Adsorption of nanoparticles on bubble surface in nano-particle suspension. *China Particuology* 3: 208-212.
- Welinder, K.G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11. 1.7). *FEBS letters* 72(1):19-23.
- Xie, M., Long, M., Liu, Y., Qin, C. and Wang Y. (2006). Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 1184–91.
- Yang, Q., Liang, J. and Han, H. (2009). Probing the interaction of magnetic iron oxide nanoparticles with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. *J Phys Chem B* 113(30): 10454-10458.
- Zhou, D., Jin, S., Li, L., Wang, Y. and Weng, N. (2011). Quantifying the adsorption and uptake of CuO nanoparticles by wheat root based on chemical extractions. *Journal of environmental sciences*. 23(11): 1852-1857.

بررسی خاستگاه سلول های PGC جوجه و فاکتورهای موثر در خودنوزایی به منظور تکثیر طولانی مدت آن ها در شرایط *In Vitro*

معصومه زارع^۱، سیدضیال دین میرحسینی^{۲*}، سیده نفیسه حسینی^۳، شاهرخ قوتی^۴

چکیده

مقدمه: سلول های زایای بدوی (primordial germ cell (PGC)) با تولید سلول های جنسی، وظیفه انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد را بر عهده دارند. سلول های PGC به گناد در حال تکوین می روند و طی این مهاجرت دچار بازبرنامه ریزی گسترده ای می شوند. پس از قرارگیری در گناد، مسیر تکوینی آن ها به سمت تولید پیش سازهای سلول جنسی پیش گرفته می شود. **مواد و روش ها:** یکی از چالش های اصلی این سلول ها، عدم تکثیر و خودنوزایی آن ها در محیط کشت است. یک روش برای القای پرتوانی سلول های PGC، دستکاری مسیرهای پیام رسانی درون سلولی از جمله $TGF-\beta$ و Wnt/β -catenin است که استفاده از فاکتورهای رشد و ریزمولکول ها یکی از روش های رسیدن به این هدف است. همچنین همزمان با فعال سازی مسیرهای پیام رسانی موثر در خودنوزایی، بهبود شرایط کشت می تواند راهکاری موثر برای دستیابی به رده سلولی PGC جوجه باشد. نتایج بنابرین ایجاد شرایط کشت تعریف شده و فعال سازی مسیرهای پیام رسانی موثر در پرتوانی می تواند منجر به القای پرتوانی در سلول های PGC جوجه گردد.

واژه های کلیدی: پرتوانی، خودنوزایی، سلول های زایای بدوی، کشت

طولانی مدت، مسیر پیام رسانی

۱. گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. نویسنده مسئول: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. پست الکترونیکی: szmirhoseini@gmail.com

۳. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران.

مقدمه

علم زیست‌فناوری از سامانه‌های زنده گوناگون به منظور مطالعه سازوکار ژن‌های عملکردی و بیماری‌های انسانی و حیوانی، تولید پروتئین‌ها و داروهای نو ترکیب و غیره استفاده می‌کند. اخیراً پرندگان به دلیل وجود میزان بالای پروتئین در تخم، شباهت زیاد الگوی گلیکوزیله شدن پروتئین‌های موجود در تخم مرغ به پروتئین‌های انسانی و پایداری پروتئین خارجی در بدن میزبان و مهم‌تر از همه، فاصله نسل کوتاه و هزینه پایین، در مقایسه با گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و پستانداران تراریخت، به عنوان یک راکتور زیستی مناسب در زیست‌فناوری مورد توجه قرار گرفته‌اند (Thomson *et al.*, 1998; Farzaneh *et al.*, 2017). تاکنون تولید پروتئین‌های نو ترکیب مختلفی مانند انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها (از جمله آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی) (Zhu *et al.*, 2005; Kamihira *et al.*, 2005; Lillico *et al.*, 2007)، آنزیم‌ها (باکتری β بتالاکتاماز) (Harvey *et al.*, 2002)، اینترفرون α -2B (Rapp *et al.*, 2004)، در تخم مرغ گزارش شده است. در سال ۲۰۱۵ محققین توانستند لیزوزیم انسانی (Cao *et al.*, 2015) را در تخم مرغ به خوبی تولید کنند که تأییدیه سازمان غذا و دارو (Food and Drug Administration (FDA)) را برای تولید پروتئین‌های دارویی به خود اختصاص داد (Sheridan, 2016). با این وجود، لازمه دسترسی به این مزایای ذکر شده، رسیدن به دستورالعمل مناسب برای تولید پرندگان تراریخت است. رایج‌ترین شیوه‌ها برای ایجاد حیوانات تراریخت استفاده از تزریق پیش هسته نر به سلول تخمک و تکنیک Somatic SCNT (cell nuclear transfer) یا تزریق هسته سلول سوماتیک به سیتوپلاسم تخمک بدون هسته است (Nassiry *et al.*, 2011). ولی در پرندگان به سبب خصوصیت تکوینی منحصربه‌فردی از جمله ضرورت ذبح پرندگان به منظور دستیابی به

تخم، عدم تعداد مناسب و کافی تخم به ازای ذبح هر پرنده، انجام این تکنیک‌ها امکان‌پذیر نیست، به‌گونه‌ای که جداسازی سلول‌های بنیادی (سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells (ESCs)، سلول‌های زایای بدوی (Primordial Germ Cells (PGC)) و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (Spermatogonial stem cells (SSCs)) و تولید رده‌های سلولی از آن‌ها، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Park *et al.*, 2013). سلول‌های PGC با تولید سلول‌های جنسی تخمک و اسپرم از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی برای دستیابی به اهداف موردنظر است. این سلول‌ها مراحل تکوینی خاصی را برای کسب قابلیت‌های منحصربه‌فرد خود در تضمین بقای نسل و انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد طی می‌کنند. از دیگر ویژگی‌های منحصربه‌فردشان می‌توان به توانایی تکثیر و تمایز، قابلیت دست‌کاری ژنتیکی و مهم‌تر از همه، راندمان بالای تولید کایمر نسبت به سایر سلول‌های بنیادی پرندگان اشاره داشت (Nakamura *et al.*, 2013). سلول‌های PGC برای اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط Chiquoine در پستاندارن شناسایی شدند و سپس جداسازی و کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC پرندگان برای اولین بار توسط Van de Lavoir و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شد که این محقق نشان داد که کشت PGC در شرایط آزمایشگاهی سبب افزایش راندمان انتقال سلول‌های زاینده و تولید پرندگان کایمر می‌شود (Van de Lavoir *et al.*, 2006). اما مهم‌ترین مشکل در دستیابی به رده تکثیرپذیر سلول‌های PGC جوجه، عدم توانایی تکثیر طولانی‌مدت و مشکل کنترل خودنوزایی و تمایز سلول‌ها در سیستم‌های کشت آزمایشگاهی است (Bednarczyk *et al.*, 2014). لذا برای حل این مشکلات و دستیابی به مزایای اقتصادی PGC جوجه، توجه زیادی در سال‌های اخیر به تولید رده سلولی PGC جوجه با روش‌های مختلف

معطوف شده است. یکی از این روش‌ها، توجه به مسیرهای پیام‌رسانی موثر در تکثیر؛ خودنوزایی و تمایز سلول‌های PGC جوجه است که مطالعات Lee و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند که فعال‌سازی مسیر Wnt/ β -catenin سبب افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شود و همچنین در سال ۲۰۱۵، Whyte و همکاران، فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی BMP/Smad1/5/8 و TGF- β /Smad2/3 به عنوان مسیرهای اصلی در بیان ژن‌های مؤثر در خودنوزایی این سلول‌ها را معرفی کردند (Whyte *et al.*, 2015). بنابراین بهبود شرایط کشت و فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی موثر در خودنوزایی می‌تواند راهکاری مؤثر برای دستیابی به رده سلولی PGC جوجه باشد. از این رو، در این بررسی ابتدا به خاستگاه و مهاجرت منحصر به فرد سلول‌های PGC جوجه پرداخته می‌شود و سپس در ادامه به نتایج تحقیقاتی که انواع محیط‌های کشت و فاکتورهای موثر در خودنوزایی این سلول‌ها در جهت حفظ پرتوانی و تکثیر طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه در شرایط کشت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده‌اند، پرداخته می‌شود.

خاستگاه سلول‌های PGC جوجه

سلول‌های سوماتیک (somatic cell)، برای زنده‌مانی و عملکرد فیزیولوژیک بدنی موردنیاز هستند و سلول‌های PGC با تولید سلول‌های جنسی منجر به انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد می‌شوند. به عبارتی دیگر سلول‌های PGC سلول‌های پیش‌ساز گامت‌های جنسی بوده و سلول‌های تک توانی هستند که قبل از گاسترولاسیون Fate Determination می‌شوند. این سلول‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط Chiquoine در پستانداران شناسایی شدند. Chiquoine موفق به شناسایی جمعیتی از سلول‌های بنیادی

PGC در روز 7/25 E تکوین در قاعده آلانتوئیس اندودرم کیسه زرده جنین موش، توسط رنگ آمیزی الکالین فسفاتاز گردید که از هیپوبلاست منشا می گیرند (Chiquoine, 1954). از آن زمان به بعد تحقیقات زیادی درباره خاستگاه و مراحل تکوینی این سلول در گونه های دیگر از جمله آمینون داران آغاز گردید. به گونه ای که در سال ۱۹۹۷، اولین گزارش درباره سلول های PGC پرندگان حاکی از حضور سلول های PGC در انتهای گاسترولاسیون بود (Ginsburg, 1997). در ابتدای تحقیقات روی خاستگاه سلول های PGC در جنین آمینون داران به دلیل عدم وجود نشانگرهای مولکولی قابل اعتماد در این گونه، تصور بر این بود که مشابه با گونه های دیگر، سلول های PGC از هیپوبلاست منشأ می گیرند. این تصور تا سال ۱۹۸۱ پابرجا بود تا اینکه تحقیقات Eyal-Giladi و همکاران (۱۹۸۱) به طور تجربی نشان داد که سلول های PGC جوجه از اپی بلاست منشا می گیرند. به عبارت دیگر سلول های PGC در ناحیه اپی بلاست (Epiblast) مشاهده می شوند و در مرحله X (اعداد رومی که به عنوان سیستم مرحله بندی تکوین جنین پرندگان توسط Eyal-Giladi و Kochav مورد استفاده قرار گرفت)، در بخش شکمی ناحیه پلوسیدا (Pellucida) قرار می گیرند (Eyal-Giladi & Kochav, 1976). این سلول های با اندازه بزرگ، هسته کروی بزرگ خارج از مرکز و ذرات لیپیدی واقع در سیتوپلاسم حاوی مقدار زیادی گلیکوژن، روند تخصصی شدن برای تولید گامت های جنسی را طی می کنند و سپس مهاجرت خود را به درون جنین آغاز می کنند (Song et al., 2014).

سازوکار تخصصی شدن سلول‌های PGC

سلول‌های PGC در اکثر موجودات در اوایل جنین‌زایی از سلول‌های سوماتیک و رخدادهای تمایزی جدا می‌شوند. به‌طور کلی دو نوع سازوکار اصلی Preformation و Epigenesi را می‌توان در مورد تخصصی شدن سلول‌های PGC در جانوران مدل مورد شناسایی قرار داد. در پستانداران و بسیاری دیگر از گونه‌ها در شاخه جانوران، تخصصی شدن سلول‌های PGC با سازوکار القایی یا Epigenesi، طی جنین‌زایی و مستقل از اطلاعات مادری، صورت می‌گیرد. در حشرات، پرندگان، کرم‌ها، ماهی و قورباغه، پلاسم زاینده (Germ plasm) ساخته‌شده توسط مادر، طی فرایند تخمک‌زایی، در سلول تخمک قرار می‌گیرد. این سیتوپلاسم تخصصی‌شده، حاوی ذرات RNA پروتئینی با چگالی نسبتاً بالاست که ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های زاینده را موجب می‌شود. از این‌رو، هسته‌ی سلول جنینی که این پلاسم زاینده را به ارث می‌برد، به سمت تکوین سلول‌های PGC پیش می‌رود (Richardson & Lehmann, 2010). در ابتدا محققان می‌پنداشتند که مشابه با سلول‌های PGC موشی، سلول‌های PGC آمینون‌داران از طریق یک فرآیند اپی‌ژنتیکی تدریجی در مراحل بلاستودرم مشخص می‌شوند (Karagenç *et al.*, 1996)؛ اما جداسازی هومولوگ ژن VASA دروزوفیلا در گورخر ماهی اولین سرنخ‌ها در مورد سازوکار اصلی تخصصی شدن سلول‌های زایا در ماهیان (آمینون‌داران) را ارائه داد (Yoon *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 1997).

از سوی دیگر بیان هومولوگ ژن VASA دروزوفیلا در جوجه توسط تحقیقات Tsunekawa و همکاران در سال ۲۰۰۰، نشان داد که سلول‌های PGC جوجه توسط عوامل ارثی مادری در سیتوپلاسم تخمک (پلاسمای سلول زایا) تعیین می‌شوند (Tsunekawa *et al.*, 2000). ژن VASA یک پروتئین

متصل به RNA خاص سلول زایا است که در سیتوپلاسم تخمک و اووسیت قرار می‌گیرد و حضور این پروتئین در سیتوپلاسم سلول زایا حاکی از سازوکار Preformation در تخصصی شدن سلول‌های PGC جوجه است (Tsunekawa *et al.*, 2000). بدین‌صورت که عملکرد احتمالی پروتئین VASA اتصال به mRNA هدف درگیر در تعیین سلول زایا، مانند Oskar و Nanos و کنترل شروع ترجمه است (Hay *et al.*, 1990; Lasko & Ashburner, 1990). از این‌رو، قاعده‌ی اصلی روند تخصصی شدن سلول‌های PGC در آمیون‌داران با سازوکار Preformation و مهار فعالیت آنزیم RNA پلیمراز مشابه با گونه دروزوفیلا است (Eddy, 1975; Illmensee & Mahowald, 1974; Olsen *et al.*, 1997; Venkatarama *et al.*, 2010). با این‌وجود سازوکار دقیق تخصصی شدن سلول‌های PGC در پرندگان به‌طور کامل مشخص نشده است و نیاز به تحقیقات زیادی درباره عملکرد پلاسمای زایا و ژن VASA دارد.

مهاجرت منحصر به فرد PGC جوجه

با توجه به نقش ژن VASA در تخصصی شدن سلول‌های PGC جوجه (Tsunekawa *et al.*, 2000)، بعد از لقاح اسپرم و اووسیت در اویداکت، اولین تسهیم از نوع تسهیم ناقص صفحه‌ای که ۵-۶ ساعت پس از تخمک‌گذاری رخ می‌دهد، منجر به شکل‌گیری یک ساختار شبیه به ژرم‌پلاسم حاوی پروتئین VASA در اووسیت بارور شده می‌شود. در مدت‌زمان کوتاهی بعد از تسهیم ابتدایی، تسهیم دوم رخ می‌دهد و منجر به تغییر شکل ساختار VASA مثبت به شکل "V" در قسمت پایه شکاف تسهیم می‌شود، که در بخش شکمی تسهیم در مرحله ۱۵ بلاستومر قرار می‌گیرد. در ادامه در مرحله III XX تکوین جنین جوجه (۸-۹ ساعت پس از ovulation) ساختار مثبت VASA در

مرکز یک بلاستومر اختصاصی یا در سلول‌هایی که با تسهیم افقی در مرکز بلاستودیسک تشکیل شده‌اند، مشاهده می‌شوند. پس‌از آن، در مرحله IV (تقریباً ۱۴ ساعت پس از ovulation)، ۶-۸ سلول با ساختارهای کروی شکل حاوی پروتئین VASA در بخش شکمی سیتوپلاسم در بین ۳۰۰ سلول بلاستودرم مشاهده می‌شوند که این سلول‌ها در مرحله X (زمانی که مرغ تخم می‌گذارد) در مرکز بلاستودرم ساکن می‌شوند؛ که احتمالاً سلول‌های پیش‌ساز PGC هستند. در همین مرحله سلول‌های عمقی مرکز بلاستودرم ناحیه‌ای به نام منطقه‌ی شفاف (Area pellucida) تولید می‌کنند و حلقه‌ی محیطی سلول‌های بلاستودرم منطقه‌ی مات (Area opaca) را ایجاد می‌کنند. بنابراین هنگامی که مرغ تخم می‌گذارد، بلاستودرم حاوی حدود ۲۰-۶۰ هزار سلول است، که در بین آنها تعداد ۳۰-۱۳۰ سلول PGC با VASA مثبت وجود دارد که در مرکز ناحیه شفاف بلاستودرم پراکنده شده‌اند. در این زمان، سلول‌های منطقه‌ی شفاف منجر به تولید لایه‌های سلولی اپی‌بلاست و هیپوبلاست می‌شوند (Ginsburg, 1994). از سوی دیگر، تکوین گاسترولاسیون پرنده‌گان از طریق شکل‌گیری خط اولیه (Primitive streak) در مرحله HH2 (۶-۷ ساعت پس از انکوباسیون) صورت می‌گیرد که بر اثر تجمع سلول بین اپی‌بلاست و هیپوبلاست تشکیل می‌شود. در مرحله HH3 (۱۲ ساعت پس از انکوباسیون)، سلول‌های PGC با VASA مثبت با یک الگوی نعل اسبی در ناحیه قدامی خط اولیه توزیع می‌شوند و عمدتاً در سطح خلفی هیپوبلاست قرار می‌گیرند و در مرحله HH3 از اپی‌بلاست به سمت هیپوبلاست مهاجرت می‌کنند. در مرحله HH4 (۱۸-۱۹ ساعت انکوباسیون)، تراکم بالایی از سلول PGC در وزیکول آمینوکاریدی احتمالی منطقه هلال جرمینال (Germinal crescent) رخ می‌دهد و در نهایت در زمانی که تکوین خط اولیه کامل می‌شود (مرحله

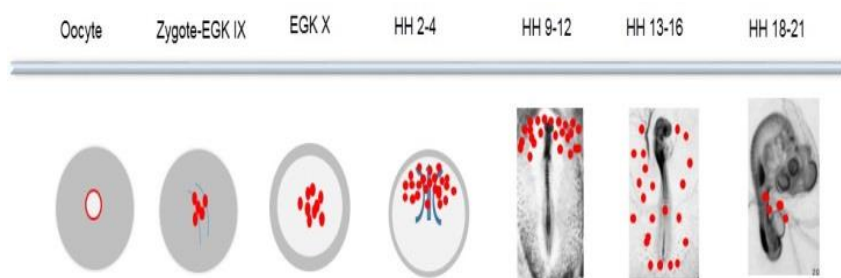
Hamburger and Hamilton (HH4-5)، هلال جرمینال حاوی سلول‌های PGC می‌شود (Nakamura *et al.*, 2007; Swift, 1914). زمانی که جنین در مرحله HH 7-9 (۲۳-۳۳ ساعت پس از انکوباسیون) تشکیل قرار می‌گیرد، بخش عمده‌ای از سلول‌های PGC در وزیکول proamniotic و آمنیوکاردیاک (amniocardiac) توزیع می‌شوند. سپس در مرحله HH10 (۳۳-۳۸ ساعت از انکوباسیون)، سلول‌های PGC شروع به تجمع در بخش قدامی سر جنین می‌کنند. متعاقباً، در طول شکل‌گیری رگ‌های وتیلین (vitelline) قدامی در مرحله HH11 (۴۰-۴۵ ساعت پس از انکوباسیون)، سلول‌های PGC شروع به انتقال از ناحیه خارج جنینی به سیستم عروقی داخل جنینی می‌کنند (Nakamura *et al.*, 2007; Swift, 1914).

اغلب سلول‌های PGC در مجاورت رگ‌های قدامی وتیلین در اوایل مرحله HH11 تجمع می‌یابند و در اواخر مرحله HH11، PGC در سینوسوئیدها همراه با کاهش تعداد آنها در مجاورت رگ‌های وتیلین قدامی مشاهده می‌شوند. به همین دلیل در پرندها برخلاف دیگر گونه‌ها، سلول‌های PGC از سیستم عروقی به‌عنوان وسیله نقلیه برای انتقال خود به ستیغ تناسلی استفاده می‌کنند، از این رو این سلول‌های PGC را سلول‌های PGC در گردش (circulating PGCs (cPGC)) می‌نامند. سپس سلول‌های PGC در بین مرحله HH13-HH15 از قلب می‌گذرند و از آئورت برای انتقال به سمت ستیغ تناسلی استفاده می‌کنند. در این مراحل، آئورت شکمی برای اولین بار از طریق اولین قوس آئورت، به آئورت خلفی تبدیل می‌شود (Bernardo *et al.*, 2012).

غلظت سلول‌های cPGC در مرحله HH14 در جریان خون به اوج خود می‌رسد (۵۰-۵۳ ساعت پس از انکوباسیون) در مرحله HH15 (۵۴ ساعت پس

از انکوباسیون)، سلول‌های cPGC شروع به تجمع در رگ‌های ویتلین در مزودرم صفحه جانبی می‌کنند. پس از آن، سلول‌های PGC با گسترش لاملیپودیا (lamellipodia) به اپیتلیوم کوئلیومی مشتق از مزودرم منتقل می‌شوند. اپیتلیوم کوئلیک سپس ضخیم شده و به ستیغ تناسلی تبدیل می‌شود (Yoshinaga *et al.*, 1992; Didier *et al.*, 1990; Swartz, 1982). به عبارت دیگر در مرحله HH15 (در بین HH12 تا HH16) سلول‌های PGC شروع به ترک سیستم عروق خونی به سمت ستیغ تناسلی می‌کنند و در مرحله HH17 اکثر آن‌ها در ستیغ تناسلی مستقر شده‌اند (Meyer, 1964; Nakamura *et al.*, 1987; Swift, 1914; Ukeshima *et al.*, 2007).

در نهایت در مرحله HH20 (۷۲ ساعت پس از انکوباسیون)، سلول‌های PGC در ستیغ تناسلی حضور دارند (Swift 1914; Nieuwkoop & Sutasurya 1979; Nakamura *et al.*, 2007) درحالی‌که حدود ۱۰ درصد سلول‌های PGC به صورت نابجا در مکانی خارج از غدد تناسلی از جمله سر جنین، مزونفروس و غشای روده موضعی می‌شوند، با فرایند آپوپتوز حذف می‌شوند. پس از ورود آن‌ها به غدد جنسی، این سلول‌های تا زمانی که وارد تقسیم میوز می‌شوند، همچنان به تکثیر ادامه می‌دهد و در نهایت این سلول‌ها به سلول‌های زایای اووگونی در مرحله HH 20-25 تبدیل می‌شوند و سپس شروع به تمایز به گامت‌های نر و ماده می‌کنند (Chojbacka-Puchta *et al.*, 2012). به گونه‌ای که این سلول‌ها در جنس نر در روز ۱۳ جنینی به اسپرماتوگونی و در جنس ماده در روز ۸ به اووگونی تبدیل می‌شوند (Intarapat *et al.*, 2013). (شکل ۱).



شکل ۱- تکوین و مهاجرت سلول های PGC جوجه.

Figure 1. Migration and development of In Chicken PGC.

PGC: primordial germ cells; HH: Hamburger and Hamilton; EGK: Eyal-Giladi and Kochav.

پس از رسیدن سلول های PGC به مقصد، سازوکارهای ویژه ای مهاجرت آنها را متوقف کرده و در نتیجه این سلول ها در گناد ساکن می شوند. سلول های PGC پس از قرارگیری در گناد، با سلول های بدنی ارتباط برقرار می کنند و ویژگی های حرکتی خود را از دست می دهند. در مورد جوجه اطلاعاتی در خصوص نحوه این توقف در دسترس نیست، اما در گورخر ماهی، نواحی که میزان بالای (SDF1) (stromal cell-derived factor-1) را بیان می کنند، با مشخص کردن ناحیه گنادی، اعلام می دارند که سلول های PGC دست از مهاجرت بردارند و در آنجا مستقر شوند (Richardson & Lehmann, 2010) سازوکار شروع و پایان مهاجرت سلول های PGC در جوجه به صورت یک پرسش بی پاسخ باقیمانده است و هنوز تحقیقات زیادی برای یافتن جواب تمامی سؤالات ضرورت دارد. اما این موضوع که سلول های PGC با انجام تقسیم میوز و تولید سلول های جنسی هاپلوئیدی منجر به انتقال صحیح ماده ژنتیکی به نسل بعد می شود، واضح و روشن است. با این وجود، شناسایی مسیرهای پیام رسانی و ژن های دخیل در روند تخصصی شدن، مهاجرت و حفظ خودنوازی سلول های PGC تا زمانی که در غدد جنسی ساکن می شوند،

لازمه درک صحیح شکل‌گیری و آشنایی با توانایی‌های بیشتر آن‌ها در جهت تولید رده تکثیرپذیر در شرایط کشت آزمایشگاهی است.

مسیرهای پیام‌رسانی موثر در خودنوزایی و تمایز سلول‌های PGC جوجه

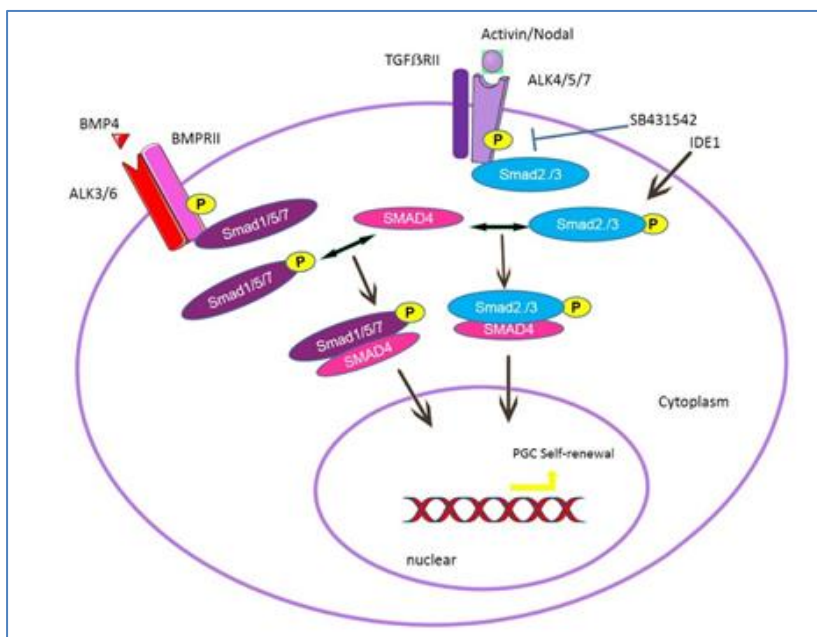
دانش فعلی در مورد مسیرهای پیام‌رسانی و ژن‌های دخیل در روند تخصصی شدن و حفظ خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه بسیار اندک است؛ چرا که محدودیت دسترسی به این سلول‌ها، مطالعه آن‌ها را با مشکل رو به رو کرده است. از این رو داشتن منبع نامحدودی از سلول‌های PGC در آزمایشگاه می‌تواند در این راستا بسیار کمک‌کننده باشد. در صورت در دسترس بودن چنین منبعی، علاوه بر آن که اطلاعات زیادی در مورد تشکیل این سلول‌ها و تخصصی شدن آن‌ها به دست می‌آید، می‌توان از توانایی این سلول‌ها در جهت تولید واکسن و پروتئین‌های نو ترکیب و حفظ گونه‌های در حال انقراض استفاده بهینه را کرد. از این رو در دهه گذشته، بسیاری از محققان بر این هدف متمرکز شده‌اند که به رده تکثیرپذیر سلول‌های PGC در محیط آزمایشگاه دست پیدا کنند. با این وجود، بیش‌تر اطلاعاتی که در مورد مسیرهای پیام‌رسان و ژن‌های دخیل در روند تخصصی شدن و حفظ خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه وجود دارد، مربوط به مطالعات انجام شده روی سلول‌های PGC که موفق به کشت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی نشده‌اند، است.

از مهمترین مسیرهای پیام‌رسان و ژن‌های دخیل در خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه می‌توان به مسیرهای Wnt، Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)، transforming growth factor beta ($TGF-\beta$) اشاره کرد (Ruscetti et al., 2005). مسیر پیام‌رسانی $TGF-\beta$ توسط مولکول‌های

Smad تسهیل شده و پیام به هسته سلول منتقل می‌شود و سپس منجر به تغییراتی در تنظیم رونویسی در سطح DNA می‌گردد (شکل ۲). ابر خانواده TGF- β دارای لیگاندهای مختلفی مانند BMP، TGF- β ، Nodal و Activin است که هر کدام آن‌ها نقش مهمی در خودنوزایی PGC جوجه ایفا می‌کنند (Hassani *et al.*, 2012). این ابر خانواده با اتصال لیگاند Nodal و Activin به گیرنده خود باعث فسفریلاسیون Smad 2/3 می‌شود که این پروتئین‌ها با Smad4 تشکیل کمپلکس داده و با انتقال آن‌ها به هسته، بیان ژن‌های لازم برای خودنوزایی را تنظیم می‌کنند (Ogawa *et al.*, 2007). ضرورت مسیر پیام‌رسانی TGF β در تکثیر سلول‌های PGC موشی در محیط کشت به اثبات رسیده است (Godin & Wylie, 1991)، اما نقش این مسیر در سلول‌های PGC جوجه واضح نیست و مطالعات اندکی در این زمینه وجود دارد. در یکی از این مطالعات گزارش شده است که مسیرهای پیام‌رسانی TGF- β /Activin/Nodal در سلول‌های PGC جوجه در شرایط *in vivo* و *in vitro* فعال است و منجر به خودنوزایی PGC در ترکیب با FGF2 و انسولین می‌شود (Whyte *et al.*, 2015). همچنین فعال‌سازی این مسیر پیام‌رسان در سلول‌های PGC بلدرچین با استفاده از لیگاند A Activin منجر به فسفریلاسیون SMAD2 /3 گردید که در نهایت تکثیر سلول‌های PGC مشتق از غدد جنسی بلدرچین را در پی داشت. بنابراین این یافته‌ها حاکی از آن است که مسیر پیام‌رسانی Smad2 /3 یک مسیر مهم در تکثیر سلول‌های PGC جوجه است (Yakhkeshi *et al.*, 2017).

لیگاند دیگری که منجر به فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی TGF- β می‌شود، لیگاند BMP4 است که منجر به فعال‌سازی مسیر BMP/Smad1/5/8 می‌شود. به عبارت دیگر لیگاند BMP4 منجر به فسفریلاسیون Smad1/5/8 می‌شود، که

به نوبه خود همراه با Smad4 وارد هسته و در نهایت سبب مهار ژن‌های تمایزی در سلول‌های بنیادی می‌شود (شکل ۲) (Ogawa *et al.*, 2007). مشارکت مسیر پیام‌رسانی BMP/Smad1/5/8 در تکثیر سلول‌های PGC جوجه گزارش شده است (Whyte *et al.*, 2015)، علاوه بر این در مهاجرت PGC نیز مشارکت دارد (Upton *et al.*, 2009; Daly *et al.*, 2008).

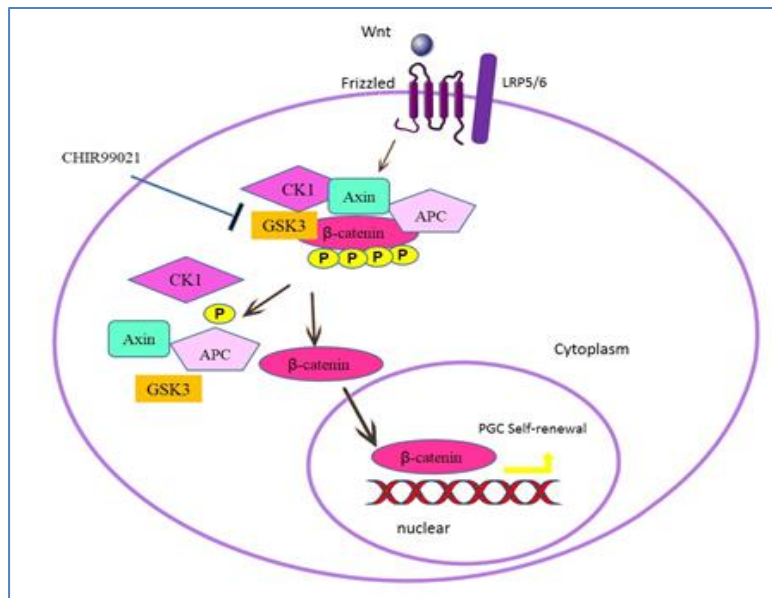


شکل ۲ - فعال سازی مسیر پیام رسانی TGF- β / BMP و TGF- β /Activin/Nodal در سلول های PGC جوجه

Figure 2. TGF- β / BMP And TGF- β /Activin/Nodal Signaling Pathway in Chicken PGC.

TGF- β : transforming growth factor beta; BMP-4: Bone morphogenetic protein 4; PGC: primordial germ cells; IDE1: inducer of definitive endoderm 1; ALK: Anaplastic lymphoma kinase receptors;

مسیر پیام‌رسان Wnt/ β -catenin مسیر دیگری است که اعتقاد بر این است که نقش مهم‌تری در حفظ پرتوانی و خودنوزایی سلول‌های بنیادی دارد (شکل ۳). اما درباره تأثیر و نقش مسیر Wnt/ β -catenin در سلول‌های PGC جوجه اطلاعات اندکی در دسترس است. یکی از این مطالعات در سال ۲۰۱۶، توسط Lee و همکارانش انجام گرفت که نشان دادند که مسیر Wnt/ β -catenin سبب افزایش تکثیر در سلول‌های PGC جوجه می‌شود و این پروتئین از طریق انتقال β -catenin به هسته، سبب بیان ژن‌های مؤثر در خودنوزایی می‌شود. در این مطالعه برای اثبات و تأیید نقش خودنوزایی مسیر Wnt/ β -catenin، سلول‌های PGC با فعال‌کننده و مهارکننده مسیر Wnt یعنی Bio و JW74، در حضور و عدم حضور (bFGF) Basic fibroblast growth factor کشت داده شدند، نتایج نشان داد که Wnt و Bio به‌طور جداگانه سبب افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شوند (Lee et al., 2016). از دلایل حضور bFGF در محیط کشت به همراه فعال‌کننده‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt / β -catenin می‌توان این گونه تفسیر کرد که β -catenin یک ژن هدف از مسیر پیام‌رسانی FGF از طریق آبشارهای RAS / ERK یا PI3K / AKT است (Israsena et al., 2004). در صورت عدم وجود bFGF، β -catenin در غشاء با E-cadherin انباشته می‌شود، ولی در حضور bFGF به هسته منتقل می‌شود تا ژن‌های پایین‌دست را فعال کند (Ding et al., 2010; Valenta et al., 2011). بنابراین حضور bFGF منجر به اثر هم افزایی در تکثیر سلول‌های می‌شود.



شکل ۳ - مسیر پیام‌رسانی Wnt/β-catenin در سلول‌های PGC جوجه

Figure 3. Wnt/β-catenin signaling pathway in chicken PGC
PGC: primordial germ cells; GSK-3β; glycogen synthase kinase-3β; APC: adenomatous polyposis coli, LRP 5/6: receptor-related protein 5/6.

در نهایت آخرین مسیر پیام‌رسانی شناخته شده در پرتوانی سلول‌های PGC جوجه، مسیر پیام‌رسانی هج‌هاگ (Hedgehog (HH) است که بیان بالای ژن C2EIP به عنوان فعال‌کننده این مسیر پیام‌رسان در سلول‌های PGC گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2015). در واقع ژن C2EIP منجر به بیان یک پروتئین سیتوپلاسمی که با گیرنده‌های (PTCH) Patched (PTCH1) و (PTCH2) موجود در غشای داخل سلولی در تعامل است، می‌شود. سپس این پروتئین منجر به یوبی‌کوئیتین و دفسفریلاسیون PTCH2 می‌شود، که به‌نوبه خود فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی هج‌هاگ را به دنبال دارد. با وجود بیان بالای ژن C2EIP در سلول‌های PGC، حذف C2EIP به‌واسطه (clustered

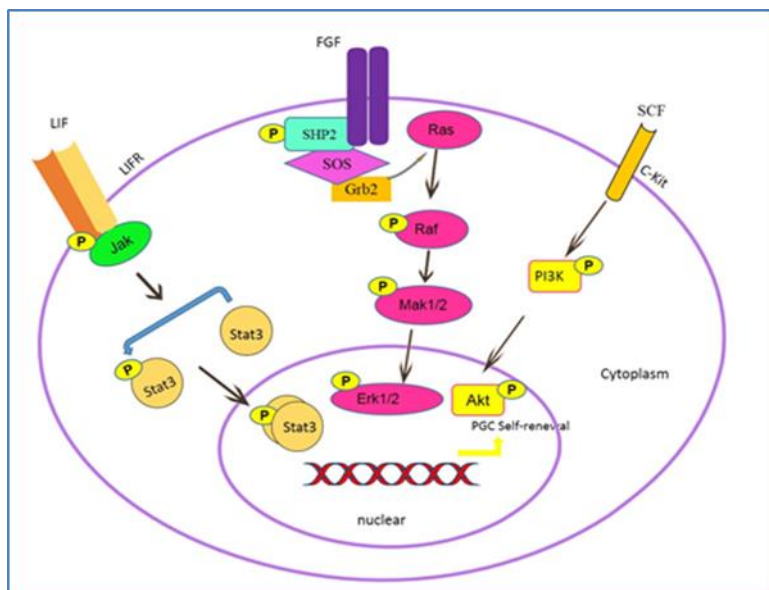
CRISPR /Cas9 (regularly interspaced short palindromic repeats) در جنین جوجه منجر به کاهش بازده تولید سلول‌های PGC شده است (Zhang et al., 2015). همچنین در سال ۲۰۱۶، Chen و همکارانش نشان دادند که برای حفظ طولانی‌مدت PGC، حضور مولکول پیام‌رسان SHH Sonic (SHH) در محیط کشت ضروری است و گزارش کردند وقتی از آنتاگونیست SHH یعنی سیکلوپامین استفاده می‌کنند، میزان تکثیر در PGC به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و زمانی که از آگونیست این مولکول یعنی کلسترول استفاده می‌کنند، تکثیر PGC افزایش می‌یابد (Chen et al., 2016). بنابراین مسیر پیام‌رسانی هج‌هاگ اهمیت زیادی در حفظ پرتوانی سلول‌های PGC جوجه دارد و تحقیقات بیشتری در این زمینه ضروری است.

از این‌رو به نظر می‌رسد شناخت دقیق مسیرهای پیام‌رسانی و نقش آن‌ها در سرنوشت سلولی می‌تواند راهگشای تولید سلول‌های پرتوان از منابع مختلف سلولی باشد. علاوه بر این، مطالعه فاکتورهای رشد موجود در محیط کشت نقش موثری در حفظ خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه دارد که باید به این موضوع نیز پرداخته شود.

فاکتورهای رشد موثر در تولید سلول‌های PGC جوجه

تولید سلول‌های PGC نیازمند استفاده از فاکتورهای رشد (Stem Cell factor) SCF (fibroblast growth factor) FGF و (leukemia inhibitory factor) LIF است که برخلاف هم‌پوشانی عملکردی، عموماً از وجود همه‌ی آن‌ها برای فرایند خودنوزایی استفاده می‌شود. فاکتورهای رشد SCF و LIF به‌منظور بقا، تکثیر و مهار آپوپتوز سلول‌های PGC به کار گرفته می‌شوند (Miyahara et al., 2016). نحوه فعالیت فاکتور رشد SCF بدین گونه است که

به گیرنده غشایی C-kit روی سلول‌های PGC متصل می‌شود و مسیر درون‌سلولی MAPK (Mitogen activated protein kinase) را به راه می‌اندازد که نقش مهمی در بقا و تکثیر سلول‌ها ایفا می‌کند (شکل ۴). همچنین اثرات SCF مشتق از جوجه به شکل محلول مشابه آنچه از رده سلولی BRL به محیط کشت ترشح می‌شود، منجر به میزان تکثیر بیشتری در سلول‌های PGC موجود در محیط کشت نسبت به فرم SCF متصل به غشا می‌گردد (Miyahara *et al.*, 2016)



شکل ۴ - مسیرهای سیگنالینگ GFs و FGF در سلول‌های PGC جوجه

Figure 4. FGF and GFs signaling pathway in chicken PGC
 TGF- β : transforming growth factor beta; PGC: primordial germ cells; ALK: Anaplastic lymphoma kinase receptors; FGF: fibroblast growth factor; LIF: leukemia inhibitory factor; SCF: Stem Cell Factor; MAPK: Mitogen activated protein kinase; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; ERK1/2: extracellular signal-regulated protein kinase; MAK: Mitogen-activated protein kinase; PI3K: Phosphoinositide 3-kinases; JAK: Janus kinase.

سیتوکین‌ها از دیگر فاکتورهای رشد موثر در محیط کشت سلول‌های PGC هستند که LIF انسانی و موشی (Hirai et al., 2011) و LIF جوجه، به ترتیب سیتوکین‌های پستانداران و پرندگان هستند که قادر به حفظ حالت غیرتمایزی در سلول‌های بنیادی جوجه هستند (Nakano et al., 2011). در واقع LIF فاکتور رشد دیگری است که از طریق اتصال به یک گیرنده غشایی به نام Gp130، اثر خود را اعمال می‌کند. پس‌ازاین اتصال، تیروزین کیناز JAK فعال می‌شود و موجب فسفریلاسیون فاکتور رونویسی STAT3 می‌گردد که در نتیجه موجب فعال‌سازی و ورود آن به هسته می‌شود (شکل ۳). بنابراین LIF با فعال‌سازی مسیر JAK/STAT می‌تواند منجر به کشت طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی جوجه گردد (Hirai et al., 2011; Hassani et al., 2014).

برخلاف اهمیت بسزای فاکتورهای رشد LIF و SCF، شواهد نشان می‌دهد که این دو عامل نمی‌توانند به‌تنهایی باعث حفظ خودنوزایی در سلول‌های PGC شوند، وجود فاکتور رشد bFGF نیز در محیط کشت ضروری است. فاکتور رشد bFGF، مهم‌ترین فاکتور رشد موثر در سلول‌های PGC جوجه است که دارای خصوصیات گسترده‌ای برای بقاء میتوژنیک و سلولی است (Delaune et al., 2005; Feldman et al., 1995; Feldman et al., 1998). به گونه‌ای که به‌عنوان یک میتوژن در کشت سلول PGC پستانداران شناخته شده است (Takeuchi et al., 2015). عملکرد فاکتور رشد bFGF بدین گونه است که پس از اتصال به گیرنده خود (FGFR) که جزو گیرنده‌های تیروزین کینازی است، منجر به جفت شدن و اتوفسفریلاسیون گیرنده می‌شود. گیرنده فسفریله شده با فراخوانی پروتئین‌های سیتوپلاسمی منجر به فعال‌سازی پروتئین کینازهای Erk1/2 می‌شود و در نهایت برای اعمال اثر خود وارد هسته می‌شوند (شکل ۳). از سوی دیگر منجر به فعال‌سازی

مسیر پیام‌رسانی MEK / ERK می‌شود که در پرتوانی سلول‌های PGC جوجه مشارکت دارد (Whyte *et al.*, 2015). با این وجود، علاوه بر فاکتورهای رشد SCF، FGF و LIF باید به بررسی دیگر فاکتورهای رشد در محیط کشت PGC و ارزیابی نقش آن‌ها در سرنوشت سلولی پرداخته شود.

محیط‌های کشت برای حفظ خودنوزایی سلول‌های PGC در شرایط آزمایشگاه

تولید و تکثیر طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی پرتوان جوجه تحت شرایط کشت متعارف با چالش‌های متعددی روبه‌رو است و عواملی همانند استفاده از بسترهای سلولی و یا ترشحات آن‌ها، لزوم استفاده از فاکتورهای رشد و سرم از یک طرف و وجود نژادهای مختلف تخم‌گذار و گوشتی جوجه از طرفی دیگر هر یک به نحوی سبب پیچیده‌تر شدن شرایط کشت شده است. با این وجود، شرکت Valenva تنها شرکتی در دنیا است که موفق به جداسازی و تکثیر لاین سلولی EB66 از اردک در جهت تولید واکسن و آنتی‌بادی مونوکلونال شده است (Brown *et al.*, 2010; Guehenneux *et al.*, 2016). این شرکت برای خودنوزایی سلول‌های بنیادی پرتوان جوجه از محیط کشت Ebx-GRO-I EX-CELL به‌عنوان یک محیط کشت تعریف شده، استفاده می‌کند. این محیط امکان تولید فرآورده نوترکیب در سلول‌های EB66 بدون دخالت فاکتورهای ناشناخته را فراهم آورده است. اما عدم محیط کشت تعریف‌شده در کنترل خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه منجر به عدم دستیابی به رده تکثیرپذیر سلول‌های PGC شده است. با این وجود، محققان از سراسر دنیا از محیط کشت‌های گوناگونی با ترکیبات مختلف استفاده کرده‌اند و نتایج رضایت‌بخشی را گزارش کرده‌اند.

به گونه‌ای که اولین مطالعه در سال ۱۹۹۳، توسط تاجیما و همکاران (۱۹۹۳) انجام گرفت که تعداد ۱۰۰ سلول cPGCs را از جنین ۵ روزه

جداسازی کردند و با تزریق آن به جنین گیرنده و موفق به تولید مرغ کایمر شدند (Tajima et al., 1993). جداسازی تعداد کمی سلول PGC منجر به کاوش برای یافتن تکنیک‌های جداسازی با تعداد انبوه سلول PGC در محیط آزمایشگاه گردید. به گونه‌ای که در سال ۱۹۹۵، چانگ و همکاران (۱۹۹۵)، سلول‌های PGC جوجه را به مدت ۴ روز با استفاده از سلول‌های استروما مشتق از ستیغ تناسلی جنین‌های ۵ روزه به‌عنوان سلول‌های تغذیه‌کننده و محیط کشت ۱۹۹ کشت دادند، اما موفق به کشت طولانی مدت سلول‌های PGC نشدند (Chang et al., 1997).

سپس کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC برای اولین بار توسط Van de Lavoie و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شد که سلول‌های PGCs علاوه بر زنده‌مانی برای مدت طولانی در محیط کشت، ویژگی‌های مناسب یک سلول زاینده را همچنان حفظ کرده بودند (Van de Lavoie et al., 2006). بدین صورت که Van de Lavoie و همکاران (۲۰۰۶)، از سلول‌های جداشده از جریان خون استفاده کرده بودند و آن‌ها را روی سلول‌های تغذیه‌کننده BRL (Buffalo rat liver cells) و STO (Mouse embryonic fibroblast cell line) با محیط کشت KO-DMEM غنی‌شده با سلول‌های BLR که فاکتورهای رشد SCF، LIF و IGF-1 (insulin-like growth factor 1) را در محیط کشت ترشح می‌کنند، کشت داده بودند. همچنین از ۷/۵ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum)، ۲/۵ درصد سرم جوجه SCF (chicken serum) و FGF2 نو ترکیب انسانی نیز در محیط کشت PGC استفاده کرده بودند، که موفق به کشت طولانی مدت سلول‌های PGC به مدت ۱۰۰ روز شدند (Van de Lavoie et al., 2006). از سوی دیگر، Etches و همکاران در سال ۲۰۰۶، PGCs جداشده از جریان خون را بر روی سلول‌های تغذیه‌کننده STO و BRL به همراه

فاکتورهای رشد SCF و bFGF کشت دادند و نتایج مشابهی با مطالعه Van de Lavoie و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند (Etches, 2006). با این وجود محققان برای افزایش مدت زمان زنده‌مانی سلول‌ها در محیط کشت از فاکتورهای رشد و بسترهای سلولی مختلفی استفاده کردند که به گونه‌ای که Park و همکاران (۲۰۱۳)، از فیبروبلاست جنینی موشی (MEF Mouse embryonic fibroblast) به عنوان بستر سلولی برای کشت سلول‌های PGC جوجه استفاده کردند و موفق به کشت طولانی مدت PGC جدا شده از خون جنین و تکثیر سلول‌ها گردید (Park et al., 2013). همچنین استفاده از فیبروبلاست جنینی جوجه (Chicken embryo fibroblasts (CEF) به عنوان بستر سلولی مورد توجه قرار گرفت و سلول‌های PGC روی بستر سلولی CEF توانایی تشکیل کلنی و تکثیر را نشان دادند (Naito et al., 2015). انواع مختلف بسترهای سلولی علاوه بر مزایای همانند ترشح فاکتورهای رشد ضروری به محیط کشت، دارای معایبی همانند کندن سلول‌های فیبروبلاست جنینی جوجه از بستر سلولی و مخلوط شدن با سلول‌های PGC هستند که منجر به ایجاد مشکلاتی در ارزیابی و شناسایی سلول‌ها از همدیگر می‌شود. بنابراین کشت سلول‌های PGC بر روی بسترهای بدون سلول‌های تغذیه‌کننده (Feeder-free) اولین بار توسط Choi و همکاران (۲۰۱۰)، مطرح شد و گزارش کردند که استفاده از محیط کشت مناسب که همه فاکتورهای موثر را داشته باشد، ضروری است (Choi et al., 2010).

سپس در سال ۲۰۱۵، Whyte و همکاران با ایجاد اصلاحاتی در محیط کشت (Avian KO-DMEM)، موفق به تکثیر کلونال سلول‌ها با راندمان بالا بدون استفاده از بسترهای سلولی گردیدند و گزارش کردند که محیط کشت برای سلول‌های PGC باید دارای فشار اسمزی برابر با فشار

اسمزی خون جوجه (حداکثر ۲۵۰ mosm/kg) باشد و همچنین برای کاهش ارتباطات سلولی با همدیگر حاوی کلسیم پایینی (۰/۱۵ mM) باشد (Whyte *et al.*, 2015). بدین گونه محیط Avian KO-DMEM به عنوان محیط مناسب برای کشت سلول های PGC جوجه بوسیله گروه Whyte معرفی گردیده است.

اما از آنجایی که بسترهای سلولی منجر به ترشح فاکتورهای رشد ضروری برای رشد و تکثیر سلول های PGC می شوند، محققان به دنبال راهکاری برای استفاده از مزایای آنها بودند که استفاده از پلیت های کد شده با غشای PET را ارائه دادند که این پلیت ارتباطات سلول های PGC با سلول های تغذیه رسان را مسدود می کنند، اما سلول های PGC از ترشحات سلول های تغذیه رسان برای خودنوازی استفاده می کنند (Xie *et al.*, 2019). در مطالعه ای استفاده از محیط کشت Avian KO-DMEM به همراه هم کشتی PGC با سلول های تغذیه رسان MEF همراه با پلیت های کد شده با غشای PET، نشان داد که این سیستم کشت، قابلیت تکثیر بالای PGC (یک میلیون سلول) در مدت کوتاهی (۲ هفته) را دارد (Xie *et al.*, 2019).

سپس Ezaki و همکاران در سال ۲۰۲۰، در محیط کشت استفاده شده توسط (Whyte *et al.*, 2015) اصلاحاتی ایجاد کردند و بدین گونه که PGC در گردش خون را جداسازی و در محیط کشت حاوی KO-DMEM، هپارین به همراه فاکتورهای رشد، hFGF2 و human/mouse/rat activin A کشت دادند. همچنین از مهارکننده Blebbistatin به منظور القای تکثیر و بقای سلول PGC برای تولید پرندگان تراریخت استفاده کرد و نتایج مثبتی به دست آورد (Ezaki *et al.*, 2020). با این وجود هنوز مطالعات بیشتری جهت رسیدن به محیط کشت تعریف شده در کنترل خودنوازی PGC جوجه لازم است و امید

می‌رود که در آینده با تحقیقات بیشتر به رده تکثیرپذیر سلول‌های PGC جوجه دستیابی پیدا کنیم.

نتیجه گیری

حفظ شبکه‌های متعادل انتقال سیگنال‌های مختلف نقش مهمی در تداوم خودنوزایی و تولید لاین سلولی در کشت سلول‌های بنیادی دارد. مسیرهای علامت دهی $TGF-\beta/ BMP$ و $TGF-\beta/Activin/Nodal$ به عنوان مهمترین مسیرهای مرتبط با خودنوزایی و کشت طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه محسوب می‌شوند. جالب توجه است، مسیرهای علامت دهی که از خودنوزایی و تکثیر سلولی های PGC حمایت می‌کنند در گونه‌های مختلف عملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهند. به گونه‌ای که مسیر علامت دهی TGF در PGC موشی منجر به مهار خودنوزایی می‌شود اما در جوجه به عنوان مسیرهای سیگنال دهی برجسته مرتبط با حفظ پرتوانی و کشت طولانی مدت در نظر گرفته می‌شوند. به نظر می‌رسد که TGF تنها مسیر علامت دهی است که نقش مهمی در حفظ خودنوزایی سلول های PGC جوجه دارد. اما نگاهی دقیق‌تر نشان می‌دهد که ارتباط همه مسیرهای علامت دهی با همدیگر منجر به تولید لاین سلولی می‌شود. در مجموع، شواهد *in vitro* و *in vivo* نشان می‌دهد که PGC جوجه با توجه به تکوین منحصر به فرد آن از نظر رفتار عملکردی و ماشین‌های انتقال سیگنال با PGC پستانداران کاملاً متفاوت هستند. اگرچه مطالعات متعددی اخیراً تولید سلول‌های PGC را نشان داده‌اند، اما بازنمایی همه ویژگی‌های پرتوانی در کشت طولانی مدت پایدار هنوز به دست نیامده است. به نظر می‌رسد پرتوانی یک پدیده منحصر به فرد باشد، و تولید لاین های PGC نیازمند تلاش‌های بیشتری برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی و گفتگوی متقابل بین

مسیرهای علامت دهی مختلف، است. به دست آوردن شواهد صریح از چگونگی تثبیت پرتوانی در کشت برای بهره برداری از سلول های بنیادی PGC برای اهداف مورد نظر ضروری است.

فهرست منابع

- Bednarczyk, M., Kozłowska, I., Łakota, P., Szczerba, A., Stadnicka, K. and Kuwana, T. (2018). Generation of transgenic chickens by the non-viral, cell-based method: effectiveness of some elements of this strategy. *Journal of applied genetics*, 59:81-89.
- Bednarczyk, M. (2014). Avian primordial germ cells and their application. *Slovak Journal of Animal Science*, 47: 185-187.
- Brown, S.W. and Mehtali, M. (2010). The avian EB66® cell line, application to vaccines, and therapeutic protein production. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 64:419-425.
- Cao, D., Wu, H., Li, Q., Sun, Y., Liu, T., Fei, J., Zhao, Y., Wu, S., Hu, X. and Li, N. (2015). Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PloS one*, 10:e0118626.
- Chang, I.K., Jeong, D.K., Hong, Y.H., Park, T.S., MOON, Y.K., Ohno, T. and Han, J.Y. (1997). Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell biology international*, 21:495-499.
- Chen, D., Chen, M., Lu, Z., Yang, M., Xie, L., Zhang, W., Xu, H., Lu, K. and Lu, Y. (2016). Cholesterol induces proliferation of chicken primordial germ cells. *Animal reproduction science*, 171:36-40.
- Chiquoine A. D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical Record*, 118:135-146.
- Choi, J.W. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PloS one*, 5:e12968.
- Chojnacka-Puchta, L., Kasperczyk, K., Plucienniczak, G., Sawicka, D. and Bednarczyk, M. (2012). Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Polish journal of veterinary sciences*.
- Daly, A.C., Randall, R.A. and Hill, C.S. (2008). Transforming growth factor β -induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology*, 28:6889-6902.
- Daly, R. and Hearn, M.T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and

- production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18:119-138.
- Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*, 132:299-310.
- Ding, J., Xu, H., Faiola, F., Ma'ayan, A. and Wang, J. (2012). Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. *Cell research*, 22:155-167.
- Eddy, E.M. (1976). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *International review of cytology*, 43:229-280.
- Etches, R.J.(2006). The hard cell (s) of avian transgenesis. *Transgenic research*, 15: 521-526.
- Eyal-Giladi, H. and Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. *Developmental biology*, 49:321-337.
- Farzaneh, M., Hassani, S.N., Mozdziak, P. and Baharvand, H. (2017). Avian embryos and related cell lines: A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production. *Biotechnology journal*, 12:1600598.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M. and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267:246-249.
- Ginsburg, M.A.L.K.A., Snow, M.H. and McLAREN, A.N.N.E. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110:521-528.
- Godin, I.S.A.B.E.L.L.E. and Wylie, C.C. (1991). TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*, 113:1451-1457.
- Guehenneux, F., Moreau, K., Esnault, M. and Mehtali, M., Valneva S.E. (2016). Generation of duck cell lines. U.S. Patent 9,260,694.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88:49-92.
- Han, G., Wang, H. and Hao, J. (2013). Molecular mechanisms of embryonic stem cell pluripotency. *Pluripotent stem cells. Intech Open*:283-299.
- Han, J.Y. (2009). Germ cells and transgenesis in chickens. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 32: 61-80.

- Han, J.Y. and Park, Y.H. (2018). Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. *Journal of animal science and biotechnology*, 9:1-11.
- Han, J.Y., Lee, H.C. and Park, T.S. (2015). Germline-competent stem cell in avian species and its application. *Asian journal of andrology*, 17:421.
- Han, J.Y., Lee, H.G., Park, Y.H., Hwang, Y.S., Kim, S.K., Rengaraj, D., Cho, B.W. and Lim, J.M. (2018). Acquisition of pluripotency in the chick embryo occurs during intrauterine embryonic development via a unique transcriptional network. *Journal of animal science and biotechnology*, 9:31.
- Harvey, A.J., Speksnijder, G., Baugh, L.R., Morris, J.A. and Ivarie, R. (2002). Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature biotechnology*, 20:396-399.
- Hassani, S.N., Totonchi, M., Farrokhi, A., Taei, A., Larijani, M.R., Gourabi, H. and Baharvand, H. (2012). Simultaneous suppression of TGF- β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. *Stem cell reviews and reports*, 8:472-481.
- Hassani, S.N., Totonchi, M., Gourabi, H., Schöler, H.R. and Baharvand, H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem cells and development*, 23:193-208.
- Hays, F.A. (1940). Inheritance of broodiness in Rhode Island Reds. *Massachusetts Agr Exp Sta Bull*, 377:1-11.
- Hirai, H., Karian, P. and Kikyo, N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochemical Journal*, 438:11-23.
- Illmensee, K. and Mahowald, A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71:1016-1020.
- Intarapat, S. and Stern, C.D. (2013). Chick stem cells: current progress and future prospects. *Stem cell research*, 11: 1378-1392.
- Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L. and Kessler, J. A. (2004). The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol*, 268: 220-231.

- Kamihira, M., Oguchi, S., Tachibana, A., Kitagawa, Y. and Iijima, S. (1998). Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Development, growth & differentiation*, 40:449-455.
- Kamihira, M., Ono, K.I., Esaka, K., Nishijima, K.I., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K. and Iijima, S. (2005). High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of virology*, 79:10864-10874.
- Karagenc, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M. and Petitte, J.N. (1996). Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Developmental genetics*, 19:290-301.
- Koo, B.C., Kwon, M.S., Lee, H., Kim, M., Kim, D., Roh, J.Y., Park, Y.Y., Cui, X.S., Kim, N.H., Byun, S.J. and Kim, T. (2010). Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic research*, 19:437-447.
- Lasko, P.F. and Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*, 335: 611-617.
- Lee, H.C., Kim, S.K., Park, T.S., Rengaraj, D., Park, K.J., Lee, H.J., Park, S.B., Kim, S.W., Choi, S.B. and Han, J.Y. (2013). Compensatory proliferation of endogenous chicken primordial germ cells after elimination by busulfan treatment. *Stem cell research & therapy*, 4:1-9.
- Lee, H.C., Lim, S. and Han, J.Y. (2016). Wnt/ β -catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells in vitro. *Scientific reports*, 6:1-8.
- Lee, H.J., Lee, H.C. and Han, J.Y. (2015). Germline modification and engineering in avian species. *Molecules and cells*, 38:743.
- Lee, S.H., Gupta, M.K., Han, D.W., Han, S.Y., Uhm, S.J., Kim, T. and Lee, H.T. (2007). Development of transgenic chickens expressing human parathormone under the control of a ubiquitous promoter by using a retrovirus vector system. *Poultry science*, 86:2221-2227.
- Lee, S.H., Gupta, M.K., Ho, Y.T., Kim, T. and Lee, H.T. (2013). Transgenic chickens expressing human urokinase-type plasminogen activator. *Poultry science*, 92:2396-2403.

- Li, B.C., Chen, G.H., Qin, J., Wu, X.S., Wu, S.L. and Cai, Z.T. (2005). Suitable stages for isolation and culture PGCs from chicken embryos. *Int J Poult Sci*, 4:885-890.
- Li, J.J. and Lu, L.Z. (2010). Recent progress on technologies and applications of transgenic poultry. *African Journal of Biotechnology*, 9:3481-3488.
- Li, R., Tang, X., Xu, S., Chen, Q., Chen, B., Liu, S., Li, B., Li, W., Yao, Y., Wu, W. and Liu, H. (2018). SC1 sustains the self-renewal capacity and pluripotency of chicken blastodermal cells by inhibiting the phosphorylation of ERK1 and promoting the phosphorylation of Akt. *Reproduction in Domestic Animals*, 53:1052-1059.
- Li, X.Y., Qu, L.J., Hou, Z.C., Yao, J.F., Xu, G.Y. and Yang, N. (2007). Genomic structure and diversity of the chicken Mx gene. *Poultry science*, 86:786-789.
- Lillico, S.G., Sherman, A., McGrew, M.J., Robertson, C.D., Smith, J., Haslam, C., Barnard, P., Radcliffe, P.A., Mitrophanous, K.A., Elliot, E.A. and Sang, H.M. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:1771-1776.
- Liu, T., Wu, H., Cao, D., Li, Q., Zhang, Y., Li, N. and Hu, X. (2015). Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens. *PloS one*, 10:e0127922.
- Macdonald, J., Glover, J.D., Taylor, L., Sang, H.M. and McGrew, M.J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PloS one*, 5:e15518.
- Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, H.M. and McGrew, M.J. (2012). Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:E1466-E1472.
- McGrew, M.J., Sherman, A., Ellard, F.M., Lillico, S.G., Gilhooley, H.J., Kingsman, A.J., Mitrophanous, K.A. and Sang, H. (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO reports*, 5: 728-733.
- Meyer, D.B. (1964). The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev Biol*, 10:154-190.

- Miyahara, D., Oishi, I., Makino, R., Kurumisawa, N., Nakaya, R., Ono, T., Kagami, H. and Tagami, T. (2015). Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. *Journal of Reproduction and Development*, 62:143–149.
- Nassiry M.R., Ghovvati S., Mohammadabadi M.R., Ariannezhad H., Doosti M, 2011. The generating methods of transgenic chickens and its potential application in biotechnology. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2: 97-124.
- Naito, M., Harumi, T. and Kuwana, T. (2015). Expression of GFP Gene in Gonads of Chicken Embryos by Transfecting Primordial Germ Cells in vitro or in vivo using the PiggyBac Transposon Vector System. *The Journal of Poultry Science*, 52:227-231.
- Naito, M., Harumi, T. and Kuwana, T. (2015). Long-term culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and production of germline chimaeric chickens. *Animal reproduction science*, 153: 50-61.
- Naito, M., Nirasawa, K. and Oishi, T. (1990). Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of Experimental Zoology*, 254:322-326.
- Nakamura, Y., Kagami, H. and Tagami, T. (2013). Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development, growth & differentiation*, 55:20-40.
- Nakamura, Y., Tasai, M., Takeda, K., Nirasawa, K. and Tagami, T. (2013). Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese quail. *Journal of Reproduction and Development*.
- Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. (2010). Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biology of reproduction*, 83:130-137.
- Nakano, M., Arisawa, K., Yokoyama, S., Nishimoto, M., Yamashita, Y., Sakashita, M., Ezaki, R., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H. (2010). Characteristics of novel chicken embryonic stem cells established using chicken leukemia inhibitory factor. *The journal of poultry science*: 1011110082-1011110082.
- Nieuwkoop, P.D. (1979). The migration of the primordial germ cells. *Primordial germ cells in the chordates*: 113-127.

- Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimamoto, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H. and Miyazono, K. (2007). Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 120:55-65.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D. and Tagami, T. (2018). Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific reports*, 8: 1-12.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H. and Tagami, T. (2016). Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 6:1-10.
- Olsen, L.C., Aasland, R. and Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of development*, 66:95-105.
- Park, T.S. and Han, J.Y. (2000). Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56: 475-482.
- Park, T.S. and Han, J.Y. (2012). piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 9337-9341.
- Park, T.S., Jeong, D.K., Kim, J.N., Song, G.H., Hong, Y.H., Lim, J.M. and Han, J.Y. (2003). Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biology of reproduction*, 68:1657-1662.
- Park, T.S., Lee, H.G., Moon, J.K., Lee, H.J., Yoon, J.W., Yun, B.N.R., Kang, S.C., Kim, J., Kim, H., Han, J.Y. and Han, B.K. (2015). Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *The FASEB Journal*, 29:2386-2396.
- Park, T.S., Lee, H.J., Kim, K.H., Kim, J.S. and Han, J.Y. (2014). Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:12716-12721.
- Park, T.S., Lee, H.J., Kim, K.H., Kim, J.S. and Han, J.Y. (2014). Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:12716-12721.

- Rapp, J.C., Harvey, A.J., Speksnijder, G.L., Hu, W. and Ivarie, R. (2003). Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic research*, 12: 569-575.
- Richardson, B.E. and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11:37-49.
- Ruscetti F. W., Akel S. and Bartelmez S. H. (2005). Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*, 24: 5751–576310.
- Sheridan, C. (2016). FDA approves' farmaceutical'drug from transgenic chickens. *Nature Biotechnology*, 34:117–119.
- Shin, S.S. (2008). Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. *The FASEB Journal*, 22: 2435-2444.
- Song, Y., Duraisamy, S., Ali, J., Kizhakkayil, J., Jacob, V.D., Mohammed, M.A., Eltigani, M.A., Amisetty, S., Shukla, M.K., Etches, R.J. and de Lavoie, M.C.V. (2014). Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. *Biology of reproduction*, 90:15.
- Swift C.H. (1914). Origin and early history of the primordialgerm-cells in the chick. *Am J Anat*,15:483–516.
- Tae Sub, P. and Han, J.Y. (2013). Conservation of migration and differentiation circuits in primordial germ cells between avian species. *The Journal of reproduction and development*, 59: 252.
- Takeuchi, N., Hayashi, Y., Murakami, M., Alvarez, F.J., Horibe, H., Iohara, K., Nakata, K., Nakamura, H. and Nakashima, M. (2015). Similar in vitro effects and pulp regeneration in ectopic tooth transplantation by basic fibroblast growth factor and granulocyte-colony stimulating factor. *Oral diseases*, 21:113-122.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. (2000), "Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells". *Development*, 127: 2741–2750.
- Ukeshima A. (1996) Germ cell death in the degenerating right ovary of the chick embryo. *Zool Sci*,13:559–63.
- Upton, P.D., Davies, R.J., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cell. *J. Biol. Chem*, 284: 15794–15804.

- Van de Lavoie, M.C., Collarini, E.J., Leighton, P.A., Fesler, J., Lu, D.R., Harriman, W.D., Thiyagasundaram, T.S. and Etches, R.J. (2012). Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS One*, 7: p.e35664.
- Van de Lavoie, M.C., Mather-Love, C., Leighton, P., Diamond, J.H., Heyer, B.S., Roberts, R., Zhu, L., Winters-Digiaccio, P., Kerchner, A., Gessaro, T. and Swanberg, S. (2006). High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. *Mechanisms of development*, 123:31-41.
- Venkatarama, T., Lai, F., Luo, X., Zhou, Y., Newman, K. and King, M.L. (2010). Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. *Development*, 137: 651-660.
- Whyte, J., Glover, J.D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P. and McGrew, M.J. (2015). FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem cell reports*, 5:1171-1182.
- Xie, L., Lu, Z., Chen, D., Yang, M., Liao, Y., Mao, W., Mo, L., Sun, J., Yang, W., Xu, H. and Lu, Y. (2019). Derivation of chicken primordial germ cells using an indirect co-culture system. *Theriogenology*, 123: 83-89.
- Yakhkeshi, S., Rahimi, S., Sharafi, M., Hassani, S.N., Taleahmad, S., Shahverdi, A. and Baharvand, H. (2018). In Vitro Improvement of Quail Primordial Germ Cell Expansion through Activation of TGF-beta Signaling Pathway. *J Cell Biochem*, 119:4309-4319.
- Yamamoto, Y., Usui, F., Nakamura, Y., Ito, Y., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., Ono, T. and Kagami, H. (2007). A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biology of reproduction*, 77: 115-119.
- Yin, J., Li, G., Ren, X. and Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*, 127: 335-347.
- Yoon, C., Kawakami, K. and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 124:3157-3165.

- Zhang, L., Luo, S. and Zhang, B. (2016). Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. in mAbs, Taylor & Francis, 2: 205-215.
- Zhu, L., Van de Lavoie, M.C., Albanese, J., Beenhouwer, D.O., Cardarelli, P.M. and Cuisson, S. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. Nature biotechnology, 23:1159–1169.
- Zuo, Q., Jin, K., Zhang, Y., Song, J. and Li, B. (2017). Dynamic Expression and Regulatory Mechanism of TGF- β Signaling in Chicken Embryonic Stem Cells Differentiating into Spermatogonial Stem Cells. Bioscience Reports, 37.

بررسی نقش تیمارهای هورمونی در تغییرات فیزیولوژیکی انگور یاقوتی سیستان

نوشین کلکلی^۱، عباسعلی امام جمعه^{۱*}، یعثوب شیری^۲، محمود سلوکی^۱

چکیده^۴

مقدمه: انگور یاقوتی زودرس ترین انگور در ایران، طعم خوب و مقاومت گرمایی و خشکی بالا دارد و نیز تراکم خوشه بالایی دارد.

مواد و روش ها: تغییرات فیزیولوژیکی و میزان انباشت برخی مواد فیزیولوژیک، تحت سه هورمون جیبرلیک اسید، ایندول ۳-استیک اسید، و آبسزیک اسید به ترتیب با غلظت های ۴۰mg/L، ۲۰mg/L، و ۵۰mM/L بررسی شد.

نتایج و بحث: آبسزیک اسید بیشترین تاثیر را در افزایش میزان کلروفیل کل و کارنوئید داشت. میانگین میزان کلروفیل کل در مرحله پیش از گلدهی (۲۵/۵۱)، گلدهی (۱۸/۷۶) و بعد از گلدهی (۲۶/۱۶) میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. تحت تاثیر هر سه تیمار هورمونی سطح پروتئین تا ۷۰ درصد کاهش یافت. تیمار جیبرلین در مرحله سوم نمو خوشه سبب افزایش ۲۶ درصدی سطح کربوهیدرات شد. آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تاثیر ایندول استیک اسید افزایش سطح پیدا کرده اما سایر تیمارهای هورمونی سبب کاهش میزان این آنزیم در انگور یاقوتی شده است. بیشترین کاهش آنزیم گایاکول پراکسیداز مربوط به تیمار جیبرلین با کاهش تقریباً ۸۰ درصدی نسبت به نمونه شاهد در مرحله اول و دوم نمو خوشه مشاهده شد. همچنین در مرحله سوم نمو خوشه کاهش ۵۵ درصدی میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز بدست آمد. آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر تیمار آبسزیک اسید افزایش یافت. هر سه هورمون سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در مراحل رشدی شد. ایندول استیک اسید در مراحل رشدی سبب افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز شد. جیبرلین غیر از اندک افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مرحله گلدهی، فعالیت سه آنزیم دیگر را در تمام مراحل رشدی به شدت کاهش داد.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدانت، انگور، فیتوهورمون، فیزیولوژی گیاهی، کلروفیل.

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. نویسنده مسئول: دانشیار گروه بیوانفورماتیک، عضو هیات علمی دانشگاه زابل، پست الکترونیکی:

aliimamjomeh@uoz.ac.ir

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

۴. مقاله مستخرج از پایان نامه خانم نوشین کلکلی، راهنمایی دکتر عباسعلی امام جمعه، دکتر یعثوب شیری و مشاوره دکتر محمود سلوکی می باشد.

مقدمه

انگور یاقوتی سیستان یکی از منحصر بفردترین ارقام انگور در سطح جهان با ویژگی بارز زودرس بودن و تحمل شرایط آب و هوایی گرم و خشک منطقه سیستان و خوشه‌های متراکم است. انگور یاقوتی، از محدود محصولات باغی است که امکان کشت و پرورش در سیستان را دارد. آب و هوای گرم و خشک منطقه سیستان در کنار طوفان‌های گرمایی ۱۲۰ روزه سیستان امکان کشت و پرورش کمتر گیاه باغی را در منطقه میسر می‌سازد. یکی دیگر از ویژگی‌های ارزشمند انگور یاقوتی که ارزش تجاری آن را چند برابر می‌کند زودرس بودن است. انگور یاقوتی یکی از زودرس ترین ارقام انگور در جهان است که محصول آن در اواسط ماه می یا اواخر اردیبهشت می‌رسد (Shiri et al. 2018). این در حالیست که سایر ارقام انگور در این زمان نهایتاً در مرحله شکل‌گیری خوشه‌ها قرار دارند. آخرین ویژگی برجسته انگور یاقوتی طول دوره کوتاه رشدی انگور است. به‌طوری که از اوایل اسفند تا اواسط خرداد نهایتاً در طول سه ماه و نیم، فصل رشدی انگور یاقوتی سپری می‌گردد. مطالعات گسترده‌ای در خصوص فرایندهای رشد و نمو انگور یاقوتی صورت گرفته است. شیری و همکاران ژنوم انگور یاقوتی را توالی‌یابی کرده و مطالعات گسترده‌ای را در قالب چندین پروژه علمی اجرا کرده و در دست اجرا دارند. مطالعات آنها نشان داده دلیل مقاومت بالای انگور یاقوتی به تنش گرمایی بیان بالای ژن‌های خانواده HSP است (Shiri et al., 2018). ژن‌های HSP نقش کلیدی در بازسازی ساختار پروتئین‌های گیاهی دارند که تحت تاثیر حرارت بالا تخریب می‌شوند در مطالعه دیگری شیری و کلکلی نشان دادند بیان ژن HSP70 در مرحله پایان گلدهی و شکل‌گیری حبه‌های انگور به شدت افزایش می‌یابد (Shiri & Kalkali, 2021). نیاز آبی انگور یاقوتی نیز نسبت به سایر

ارقام انگور کمتر است؛ اما مطالعات نشان داده در سیستم آبیاری قطره‌ای عملکرد آن نسب به روش‌های آبیاری سنتی افزایش ۲۸/۵ درصدی نشان می‌دهد (Sardar Shahraki et al., 2019). شیری و همکاران نشان دادند تغییرات بیانی ژن AG عامل اصلی متراکم بودن خوشه انگور یاقوتی است (Shiri et al., 2019). همچنین مطالعات نشان داده مرحله گلدهی مهمترین دوره رشدی در انگور یاقوتی در زمینه کنترل تراکم خوشه، مقاومت گرمایی و زودرسی محصول است (Kühn et al., 2016). انگور یاقوتی به دلیل ویژگی‌های متمایزش موضوع مطالعات متعدد و متنوع محققین بوده است. در مطالعه‌ای نتایج نشان داده شد که ژن ABAH یک عامل رونویسی دخیل در زود رسیدن انگور یاقوتی سیستان است و ژن CHS نقش موثر در فرآیند رسیدگی و تغییر رنگ حبه‌ها ایفا می‌نماید (Jahantigh et al., 2020). هورمون‌های گیاهی بسیاری از جنبه‌های رشدی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. محلول‌پاشی تنظیم‌کننده‌های رشد با تاثیری که بر همتاهای درونی خود در گیاه، سیستم آنتی اکسیدانی و روابط منبع و مخزن می‌گذارند، به عنوان یک راه حل برای کاهش آثار تنش‌های محیطی در سطوح مولکولی، سلولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و محصول‌دهی تلقی می‌شوند. به خصوص هورمون‌های گیاهی با دخالت در مسیرهای ترارسانی علامت، عملکرد آبی از خود به جای می‌گذارند (Kaya et al., 2009). مطالعات نشان داده محلول‌پاشی هورمون جیبرلین سبب کاهش تراکم خوشه در انگور یاقوتی می‌گردد (Grimplet et al., 2017). مطالعه دیگری نشان داده کاربرد اسید جیبرلیک و عملیات حلقه برداری سبب افزایش نسبت قند به اسید می‌شود (Ghasem beigi et al., 2015). همچنین محلول‌پاشی هورمون آبسزیک اسید میزان مقاومت گیاه در مقابل تنش گرمایی را افزایش می‌دهد. با وجود

مطالعات صورت گرفته تاکنون بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو انگور یاقوتی ناشناخته است. در این تحقیق با هدف بررسی تغییرات فیزیولوژیکی انگور یاقوتی در سه مرحله رشدی قبل از گلدهی، گلدهی و بعد از گلدهی میزان انباشت برخی مواد فیزیولوژیک و فعالیت آنزیمی تحت تاثیر سه تیمار هورمونی ایندول استیک اسید، جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در تاکستان‌های انگور یاقوتی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل صورت گرفته است. تاکستان انگور یاقوتی در موقعیت جغرافیایی ۶۱ درجه و ۴۱ دقیقه طول شرقی و عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی و در ارتفاع ۴۸۱ متر از سطح آب‌های آزاد قرار دارد. منطقه گرم و خشک بوده و میزان بارندگی سالانه کمتر از ۱۰۰ میلی لیتر در سال بوده و میانگین دما در فصل بهار بالای ۳۵ درجه است. با توجه به طوفان‌های گرم و خشک در منطقه بوته‌های انگور در داخل گودال‌هایی با عمق یک متر و با فاصله یک و نیم متر از یکدیگر پس از ریختن خاک مناسب کشاورزی در گودال کشت شده‌اند. آبیاری بصورت قطره‌ای بوده و تغذیه تاکستان بصورت برنامه ریزی شده در طول سال با استفاده از کودهای NPK و کود دامی پوسیده صورت می‌گیرد. کود NPK از سه عنصر پر مغذی پتاسیم، کلسیم و نیتروژن تشکیل شده و زمان مصرف آن همزمان با بیدار شدن درختان انگور در اسفند ماه است. کود دامی نیز در آبان ماه با سرد شدن هوا به خاک اطراف تاک‌ها اضافه می‌گردد. جهت اجرای این تحقیق، ابتدا قسمتی از تاکستان را مشخص و حصارکشی کرده و درختچه‌های سالم به منظور محلول‌پاشی

هورمونی نشان گذاری شدند. محلول پاشی سه هورمون جیبرلیک اسید (شرکت مرک آلمان کد ۸۱۴۶۹۶)، ایندول ۳-استیک اسید (شرکت مرک آلمان کد ۱۰۰۳۵۴)، و آبسزیک اسید (شرکت سیگما کد A1049) به ترتیب با غلظت‌های (Shiri et al. 2019) ۲۰ mg/L، ۴۰ (mg/L) Vos et al. (Aliyu, Adeigbe, and Awopetu 2011) و ۵۰ mM/L (2019) تقریباً یک هفته قبل از شکوفایی گل‌ها صورت گرفت. همزمان درختچه‌هایی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و جهت یکنواخت سازی کلیه شرایط رشدی برای نمونه‌های تیمار و شاهد محلول پاشی با آب مقطر صورت گرفت. ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، اولین مرحله نمونه‌گیری از خوشه‌ها صورت گرفت و نمونه‌های پس از برچسب زنی، به آزمایشگاه و فریزر ۸۶- درجه سلسیوس منتقل شد. ده روز بعد درحالی که تقریباً ۷۰ درصد از گل‌ها شکوفا شده و کاسبرگ‌ها افتاده بودند، دومین مرحله نمونه‌گیری صورت گرفت. نهایتاً سومین مرحله نمونه‌گیری ۲۱ روز پس از محلول پاشی، در حالی که حبه‌های انگور برروی خوشه‌ها تشکیل شده بودند صورت گرفت. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و تیمار هورمونی بعنوان فاکتور اول و مرحله رشدی خوشه بهنوع فاکتور دوم در نظر گرفته شد. و نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS v.9 در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد آنالیز شد. همچنین از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی از روش Lichtenthaler استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و محلول حاصل از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد. سپس حجم نهایی نمونه صاف شده با اضافه کردن استون ۸۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس در دستگاه سانتیفریوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار دهید. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتیفریوژ را به بالن شیشه‌ای منتقل شد. نهایتاً مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، و ۶۴۶ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ برای کارتنوئیدها توسط اسپکتروفتومتر قرائت و بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Chl A (mg ml}^{-1}\text{)} = 12.25A_{663} - 2.79A_{646}$$

$$\text{Chl B (mg ml}^{-1}\text{)} = 21.50A_{646} - 5.10A_{663}$$

$$\text{Tchl (mg ml}^{-1}\text{)} = \text{Chl A} + \text{Chl B}$$

$$\text{C}_{x+c} = (1000A_{470} - 1.8C_a - 85.02C_b) / 198$$

اندازه‌گیری میزان پروتئین

برای استخراج عصاره پروتئینی ۰/۱ گرم از ماده خشک گیاهی وزن شد و ۴ سی سی از بافر تریس اسید کلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتیفریوژ شدند و فاز بالایی جدا شد که حاوی پروتئین کل است. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد به ۰/۱ سی سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی سی محلول

برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شده و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت شد (He, 2011).

اندازه گیری میزان کربوهیدرات

مقدار ۰/۱ گرم بافت سبز گیاه را به همراه ۱۰ سی سی آب مقطر در لوله‌های آزمایش در بسته قرار داده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام بن ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شده پس از سرد شدن ۱ سی سی از نمونه‌ها را برداشته و به آن مقدار ۱ سی سی فنل ۵ درصد و ۴ سی سی اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۸ نانومتر قرائت شد (Hall, 2007).

اندازه گیری پرولین

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد به ۰/۵ گرم از نمونه گیاه اضافه و در هاون چینی خوب سائیده و هموژنیزه شد، سپس مخلوط حاصل در درون لوله آزمایش ریخته شده و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده برداشته شد و در یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس به هر لوله ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه شد. لوله‌های آزمایش در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد، پس از یک ساعت لوله‌ها جهت خاتمه واکنش در داخل حمام یخ گذاشته شد. پس از سرد شدن لوله ها، به آنها ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده شد و ۳۰ ثانیه بهم زده شد و پس از تشکیل دو فاز مجزا قسمت رنگی برداشته شد و توسط اسپکتروفتومتر میزان جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates et al., 1973).

اندازه گیری فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق روش دیزی و همکاران محاسبه گردید. مخلوط واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی-مولار (PH-7) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی-مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی لیتر آغاز گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت $\Delta OD_{240} \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}$, Pr بیان شد (Dazy et al., 2008). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق با روش دیزی و همکاران محاسبه گردید. مخلوط واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی-مولار و پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی-مولار و گایاکول ۲۰ میلی-مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی-لیتر آغاز گردید. افزایش جذب به وسیله تشکیل تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت $\Delta OD_{470} \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}$, Pr بیان گردید (Dazy et al., 2008). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق روش ناکانو و آسادا محاسبه گردید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با بررسی میزان پراکسیداسیون آسکوربات با افزایش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی-مولار اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی-مولار، پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی-مولار و EDTA ۰/۱ میلی-مولار بود. با اضافه کردن پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیمی شروع شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت $\Delta OD_{290} \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}$, Pr بیان گردید (Nakano & Asada, 1981). اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی-فل اکسیداز از طریق روش ریموند و همکاران محاسبه گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی-مولار و پیروگالل ۰/۵ میلی-مولار بود. واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرومولار عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی-لیتر و

در ۴۰ درجه آغاز گردید. تغییرات جذب پلی فنل اکسیداز در فاصله زمانی ۴ دقیقه در طول موج ۴۳۰ نانومتر ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم به صورت $\Delta OD_{430} \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}, \text{Pr}$ بیان گردید (Raymond et al., 1993).

نتایج و بحث

شکل (۱) خوشه های انگور یاقوتی را تحت تاثیر سه تیمار در مقایسه با نمونه شاهد نشان می دهد. بطور کلی تراکم خوشه های تیمار هورمونی در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت که دلیل آن ریزش بخشی از گل ها تحت تاثیر تیمارهای هورمونی به دلیل برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی گیاه در مرحله گلدهی است. درخصوص تیمار جیبرلین علاوه بر کاهش تعداد حبه های موجود در خوشه تیمار، افزایش طولی خوشه به دلیل رشد محور اصلی خوشه مشاهده شد. جدول (۱) و جدول (۲) نتایج تجزیه آماری را نشان می دهد. در کلیه شاخص های اندازه گیری شده مقادیر بدست آمده در سطح ۰/۰۱ درصد معنادار می باشند. این امر بیانگر این نکته است که تیمارهای هورمونی در مراحل مختلف رشدی خوشه در انگور یاقوتی، تغییرات فیزیولوژیکی زیادی را ایجاد می کنند. برای سهولت تجزیه و تحلیل نتایج از بررسی اثرات ساده صرف نظر و فقط نمودارهای تجزیه و تحلیل اثرات متقابل مورد بررسی قرار شدند.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی (مرتبط با کلروفیل و کربوهیدرات) انگور یاقوتی

تحت تاثیر تیمارهای هورمونی

Table 1. Analysis of variance for physiological traits of Yaghooti grape (related to chlorophyll and carbohydrates) under hormonal treatments

Mean of Squares					df	SOV
Carotenoid	Total Chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Carbohydrates		
25.3863**	75.2518**	0.7106**	84.5188**	84627.60**	3	Hormones
11.1281**	341.4568**	86.6297**	98.7460**	4709.87**	2	Developmental stage
8.0538**	19.920**	6.9250**	13.8802**	32151.64**	6	Interaction
0.0001	0.0044	0.0008	0.0023	0.0194	22	Error
0.1846	0.1558	0.4207	0.1339	0.0333	-	CV

** The significance level at 0.01

** معناداری پارامتر در سطح ۰/۰۱

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی (مرتبط با آنزیم و پروتئین) انگور یاقوتی تحت تاثیر

تیمارهای هورمونی

Table 2. Analysis of variance for physiological traits (related to enzymes and proteins) of Yaghooti grapes under hormonal treatments

Mean of Squares						df	SOV
Proline	Protein	Catalase	Polyphenol oxidase	Guaiacol peroxidase	Ascorbate peroxidase		
240.107**	104590.96**	1.0018**	0.0232**	64.0933**	3.9825**	3	Hormones
86.434**	76626.72**	1.1919**	0.0075**	20.7432**	7.1235**	2	Developmental stage
258.394**	26432.59**	4.7824**	0.0019**	5.5151**	13.3867**	6	Interaction
0.0036	0.5140	2.7777	0.0002	0.0014	0.0002	22	Error
1.7574	0.2150	8.5170	0.2608	0.5768	0.5009		CV

** The significance level at 0.01

** معناداری پارامتر در سطح ۰/۰۱

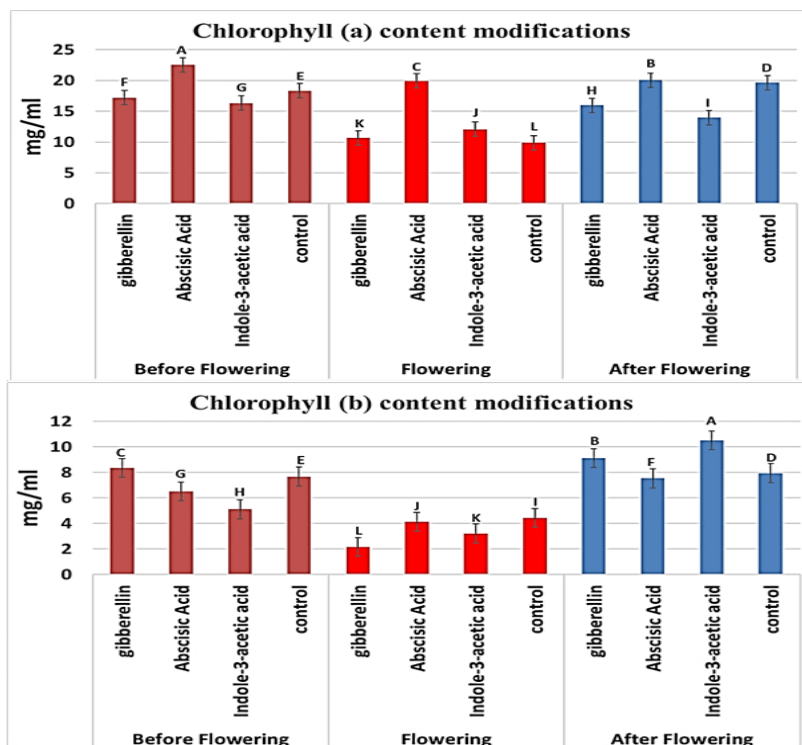


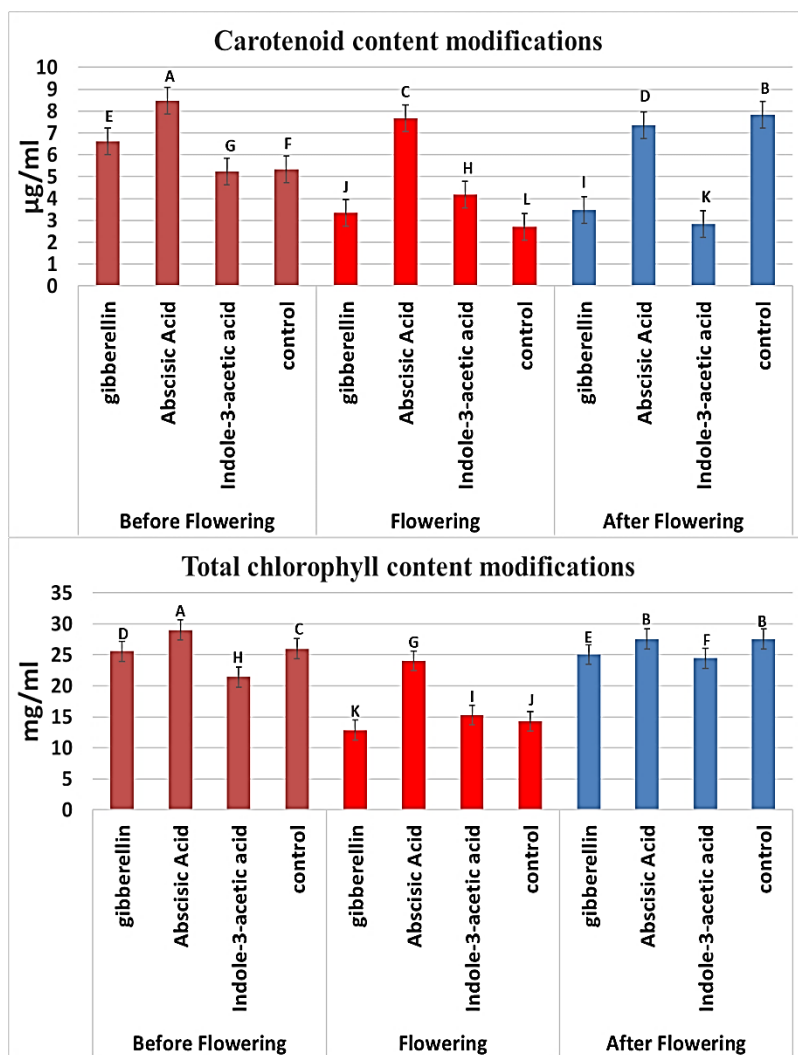
شکل ۱- خوشه بالغ انگور یاقوتی تحت تاثیر سه هورمون جیبرلین (GA3)، ایندول ۳- استیک اسید (IAA)، و آبسیزیک اسید (ABA). مقایسه سه نمونه تیمار هورمونی با نمونه شاهد (W) نشان دهنده اختلاف مورفولوژیکی در ویژگیهای ظاهری خوشه ها است. بطور کلی تراکم خوشه های تیمار هورمونی در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت که دلیل آن ریزش بخشی از گل ها تحت تاثیر تیمار های هورمونی به دلیل برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی گیاه در مرحله گلدهی است. درخصوص تیمار جیبرلین علاوه بر کاهش تعداد حبه های موجود در خوشه تیمار، افزایش طولی خوشه به دلیل رشد محور اصلی خوشه مشاهده شد (اندازه کوچک حبه های انگور تحت تیمار GA3 در تصویر بخاطر کوچک کردن اندازه تصویر جهت قرار گرفتن در کادر هم اندازه با سایر تصاویر است).

Figure 1. Mature cluster of Yaghooti grape under the influence of three hormones including gibberellin (GA3), indole-3-acetic acid (IAA), and abscisic acid (ABA). The comparison of the three hormonal treatment samples with the control sample (W) shows the morphological difference in the appearance characteristics of the clusters. In general, we saw a decrease in the density of the clusters of hormone treatment compared to the control sample, which is due to the fall of part of the flowers under the influence of hormone treatments due to the disruption of the physiological balance of the plant in the flowering stage. Regarding the gibberellin treatment, in addition to reducing the number of pods in the treatment cluster compared to the control sample, we saw an increase in the length of the cluster due to the growth of the main axis of the cluster (the small size of grape pods under GA3 treatment in the image due to reducing the size of the image to fit in The box is the same size as the other images).

تغییرات رنگدانه‌های فتوسنتزی

شکل (۲) تغییرات میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید در سه مرحله قبل از گلدهی، گلدهی و بعد از گلدهی را تحت تاثیر تیمارهای هورمونی نشان می‌دهند. بطور کلی مرحله گلدهی در مقایسه با مرحله قبل از گلدهی و مرحله بعد از گلدهی دارای کمترین سطح میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی بود. میانگین میزان کلروفیل کل به ترتیب در مراحل پیش از گلدهی، گلدهی و بعد از گلدهی برابر بود با (۲۵/۵۱)، (۱۸/۷۶) و (۲۶/۱۶) مول در میلی‌لیتر. مقایسه سه نمودار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل نشان می‌دهد که در مرحله بعد از گلدهی کاهش سطح کلروفیل a با افزایش سطح کلروفیل b و برعکس جبران شده است بطوریکه میزان کلروفیل کل در مرحله بعد از گلدهی در هر سه نمونه تیمار و نمونه شاهد متعادل به نظر می‌رسد.



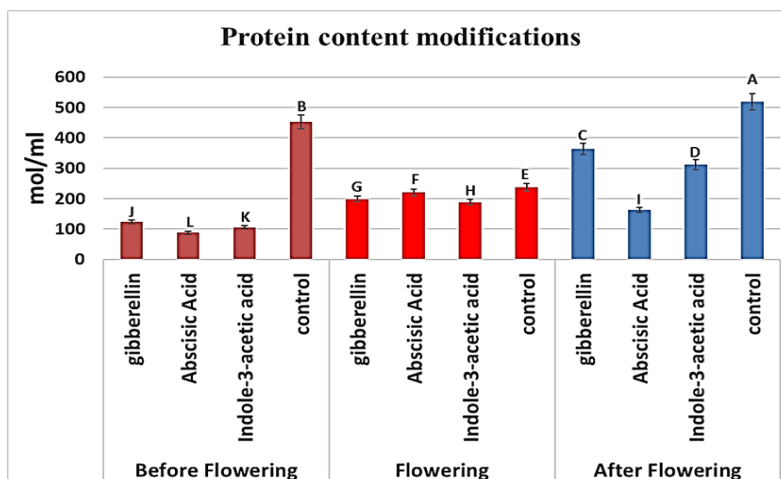


شکل ۲. تغییرات میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید تحت تاثیر تیمار هورمونی در سه مرحله رشدی انگور یاقوتی سیستان. حروف بالای هر ستون ترتیب بالاترین سطوح معناداری را نشان می‌دهد.

Figure 2. The graph of changes in the amount of chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid under the influence of hormone treatment in three growth stages of Sistan Yaghooti grape. The upper letters of each column indicate the order of the highest significance levels.

تغییرات میزان پروتئین

شکل (۳) تغییرات سطح پروتئین بافت گیاهی انگور تحت تاثیر تیمارهای هورمونی را نشان می‌دهد. مقایسه نمونه شاهد با نمونه‌های تیمار هورمونی نشان می‌دهد تحت تاثیر هر سه تیمار هورمونی سطح پروتئین بیش از ۷۰ درصد کاهش می‌یابد. هر چند در مرحله گلدهی با افزایش سطح پروتئین در نمونه‌های تیمار تعادل نسبی بین نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار حاصل می‌شود. این درحالیست که مقایسه سه مرحله رشدی مورد مطالعه بیانگر کاهش ۳۵ درصدی سطح پروتئین در مرحله گلدهی است. در مقایسه بین نمونه‌های تیمار هورمونی به نظر می‌رسد هورمون جیبرلین کمترین نقش منفی را در کاهش سطح پروتئین بافت گیاهی انگور یاقوتی داشته باشد.

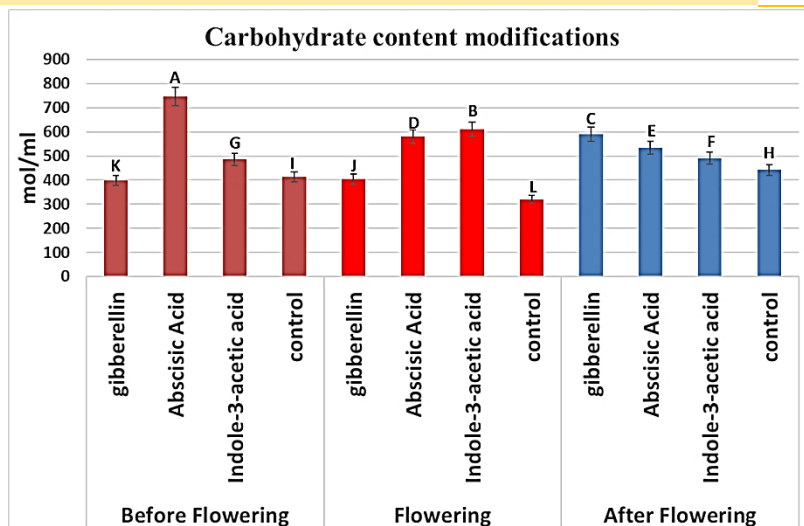


شکل ۳- تغییرات میزان پروتئین تحت تاثیر تیمار هورمونی در سه مرحله رشدی انگور یاقوتی سیستان. حروف بالای هر ستون ترتیب بالاترین سطوح معناداری را نشان می‌دهد.

Figure 3. The graph of changes in the amount of protein under the influence of hormone treatment in the three growth stages of Sistan Yaghooti grapes. The upper letters of each column indicate the order of the highest significance levels.

تغییرات میزان کربوهیدرات

شکل (۴) نمودار تغییرات میزان کربوهیدرات‌ها را نشان می‌دهد. میزان کربوهیدرات‌ها همانند میزان پروتئین و رنگدانه‌های فتوسنتزی در مرحله گلدهی نسبت به دو مرحله دیگر دچار کاهش سطح شده است. هر چند تیمارهای هورمونی این نسبت معمول را دگرگون کرده‌اند. مقایسه سطح کربوهیدرات تحت تاثیر سه تیمار هورمونی بیانگر سه نوع تغییر متفاوت است. همانطور که مشاهده می‌شود تیمار جیبرلین در مرحله سوم نمو خوشه سبب افزایش ۲۶ درصدی سطح کربوهیدرات شده، در مقابل تیمار آبسزیک اسید سبب افزایش سطح کربوهیدرات در مرحله قبل از گلدهی بیش از ۸۰ درصد نمونه شاهد شد، اما به مرور در مرحله گلدهی و بعد از گلدهی از میزان کربوهیدرات کاسته شده است. نمودار مربوط به تیمار ایندول استیک اسید از الگوی زنگوله‌ای پیروی کرده به طوری که در مرحله گلدهی میزان کربوهیدرات بدست آمده ۵۰ درصد بیشتر از نمونه شاهد بود و در مرحله قبل از گلدهی ۱۰ درصد بیشتر از شاهد و بعد از گلدهی ۷ درصد بیشتر از نمونه شاهد است. بطور کلی هر سه تیمار هورمونی در هر سه مرحله رشدی نقش مثبتی در افزایش سطح کربوهیدرات نشان دادند.

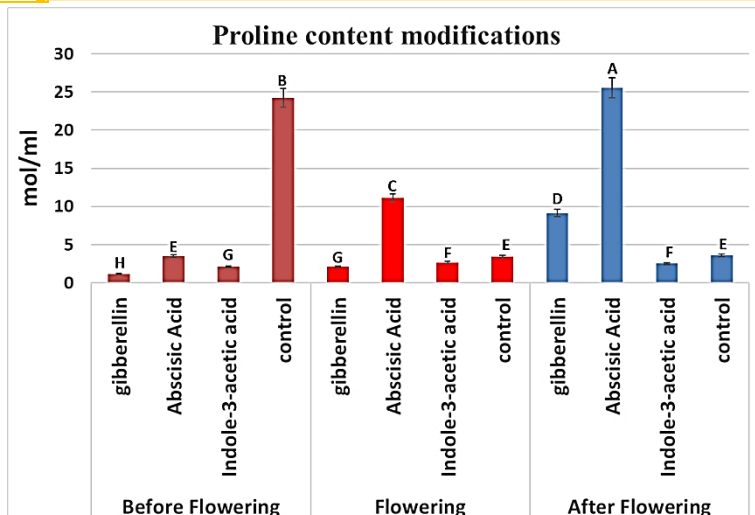


شکل ۴- تغییرات میزان کربوهیدرات تحت تاثیر تیمار هورمونی در سه مرحله رشدی انگور یاقوتی سیستان. حروف بالای هر ستون ترتیب بالاترین سطوح معنی داری را نشان می‌دهد.

Figure 4. Diagram of changes in the amount of carbohydrates under the influence of hormone treatment in the three growth stages of Sistan Yaghooti grapes. The letters at the top of each order column It shows the highest levels of significance.

تغییرات میزان پرولین

شکل (۵) تغییرات میزان پرولین را نشان می‌دهد. بطور کلی محلول‌پاشی هورمون‌های جیبرلین و ایندول استیک اسید تاثیر قابل توجهی در افزایش میزان پرولین در هر سه مرحله رشدی انگور نداشتند. میزان پرولین در نمونه شاهد در مرحله قبل از گلدهی در بالاترین سطح ممکن است، اما در مرحله گلدهی و بعد از گلدهی به شدت از میزان انباشت پرولین کاسته می‌شود در مقابل آبسزیک اسید به مرور سبب افزایش سطح پرولین تا ۵ برابر نمونه شاهد در سلول‌ها می‌گردد.



شکل ۵- تغییرات میزان پرولین تحت تاثیر تیمار هورمونی در سه مرحله رشدی انگور یاقوتی

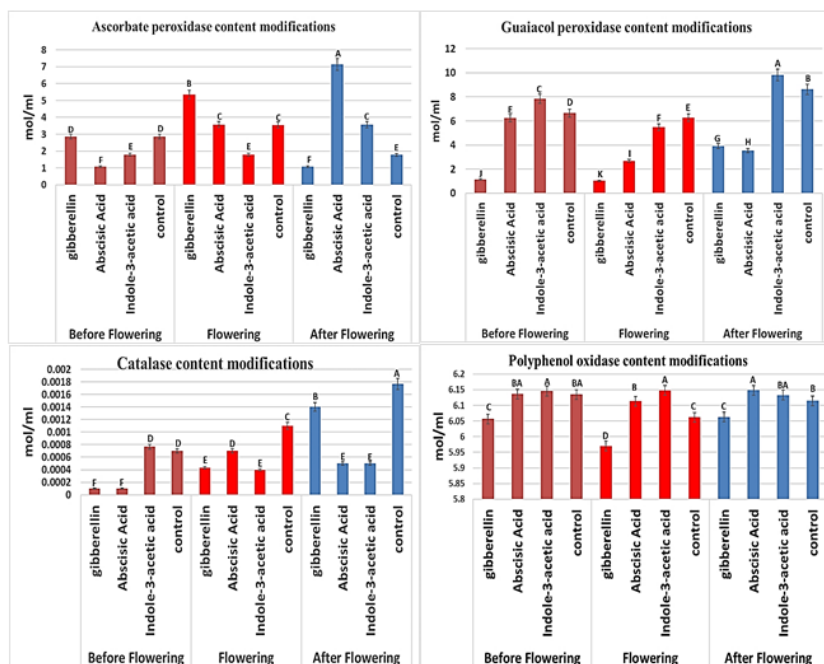
سیستان. حروف بالای هر ستون ترتیب بالاترین سطوح معناداری را نشان می‌دهد.

Figure 5. Diagram of changes in proline amount under the influence of hormone treatment in three growth stages of Sistan Yaghooti grape. The upper letters of each column indicate the order of the highest significance levels.

تغییرات میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

شکل (۶) نمودار تغییرات میزان چهار آنزیم آنتی‌اکسیدانت را نشان می‌دهد. آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تاثیر ایندول استیک اسید در مرحله اول و سوم نمو گل دچار افزایش تقریباً ۵ درصدی پیدا کرده است، اما سایر تیمارهای هورمونی سبب کاهش میزان این آنزیم در انگور یاقوتی شده است. بیشترین کاهش مربوط به تیمار جیبرلین با نزدیک به ۸۰ درصد نمونه شاهد در مرحله اول و دوم نمو خوشه و ۵۵ درصدی در مرحله سوم بود. میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر تیمار آبسزیک اسید با روند صعودی همراه است بطوری که در مرحله بعد از گلدهی افزایش سطح چهارصد درصدی را نسبت به نمونه شاهد نشان می‌دهد. هر سه تیمار هورمونی تقریباً سبب کاهش

سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه مرحله رشدی شده‌اند. در حالی که به نظر می‌رسد تغییر قابل توجهی در سطح فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نشان نمی‌دهند. هرچند هورمون ایندول استیک اسید در هر سه مرحله رشدی سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز می‌شود. با مقایسه چهار نمودار مربوط به تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانت هورمون جیبرلین غیر از اندک افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مرحله گلدهی، فعالیت سه آنزیم دیگر را در تمام مراحل رشدی به شدت کاهش می‌دهد.



شکل ۶- تغییرات میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت تاثیر تیمار هورمونی در سه مرحله رشدی انگور یاقوتی سیستان. حروف بالای هر ستون ترتیب بالاترین سطوح معنی داری را نشان می‌دهد.

Figure 6. Chart of changes in antioxidant enzymes under the influence of hormone treatment in three growth stages of Sistan Yaghooti grape. The upper letters of each column indicate the order of the highest significance levels

توجه به این نکته ضروریست که در شرایط اقلیمی سیستان از زمان ظهور اولین جوانه‌های برگی در انگور یاقوتی رفته رفته بر شدت گرمای محیط افزوده می‌شود. بطوری که در اواسط فروردین همزمان با گلدهی انگور یاقوتی، میانگین دما در طول روز به ۳۴ درجه سانتی‌گراد و در ماه اردیبهشت به ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد. این بدان معناست که انگور یاقوتی به شرایط تنش گرمایی منطقه خود را سازگار کرده است. علت دوره کوتاه رشدی انگور یاقوتی هم ریشه در همین سازگاری دارد. چرا که کوتاه بودن طول دوره رشد این مزیت را دارد که انگور یاقوتی می‌تواند خوشه‌های خود را از گرمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خرداد حفظ کند. چرا که کمتر گیاهی در این دمای سوزان در کنار طوفان‌های ۱۲۰ روزه گرم و خشک سیستان که از اوایل خرداد ماه آغاز می‌شود، توان محافظت از کارایی سیستم فتوسنتز و تولید محصول را دارد.

نقش هورمون آبسزیک اسید در محافظت از سیستم فتوسنتزی گیاهان در برابر تنش نوری اکسیداتیو (photo-oxidative stress) به خوبی نشان داده شده است (Barickman et al. 2014). هیزل و همکاران نشان دادند تیمار هورمون آبسزیک اسید در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، توتون (*Nicotiana tabacum*)، چغندر قند (*Beta vulgaris*) و ذرت (*Zea mays*) در کنار تنش کم آبیاری سبب افزایش میزان کلروفیل و کارتنوئید می‌شود (Haisel et al. 2006). کاروتنوئید در چند سطح باعث حفاظت سیستم فتوسنتزی در برابر فوتون‌های اضافی نور و تنش اکسیداتیو می‌شود که از جمله آنها می‌توان به واکنش کاروتنوئید با کلروفیل برانگیخته به‌منظور ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن اشاره کرد؛ درحقیقت، کاروتنوئیدها در برابر تنش اکسیداتیو القا می‌شوند و به‌عنوان سیستم حفاظتی

از بین می‌روند (Choudhury & Behera, 2001). مطالعات شیری و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد تحت تاثیر تیمار جیبرلین بیان ژن‌های درگیر در فرایند فتوسنتز انگور یاقوتی کاهش می‌یابد (Shiri et al., 2019). یک تفاوت عمده دیگر بین اثر تیمار آبسزیک اسید و جیبرلین این است که هورمون جیبرلین سبب کاهش میزان کلروفیل a و افزایش کلروفیل b می‌شود اما در مقابل آبسزیک اسید سبب افزایش میزان کلروفیل a و کاهش کلروفیل b می‌گردد. تفاوت اصلی بین کلروفیل a و b در نقش آنها در فتوسنتز است؛ کلروفیل a رنگدانه اصلی درگیر در فتوسنتز است در حالی که کلروفیل b مکانیسم جانبی است و انرژی را برای انتقال به کلروفیل a جمع‌آوری می‌کند. با این وجود در مجموع کلروفیل a و b نقش آبسزیک اسید افزایشی و نقش جیبرلین کاهشی است.

میزان پروتئین محلول تحت تاثیر هر سه تیمار هورمونی به شدت کاهش پیدا کرد. در حالی که میزان کربوهیدرات محلول در هر سه تیمار هورمونی نسبت به نمونه شاهد افزایش معناداری نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد فارغ از نوع هورمون، محلول‌پاشی خارجی هورمون در انگور یاقوتی سبب کاهش محتوای پروتئین محلول و افزایش میزان کربوهیدرات را در پی دارد. برخی شواهد وجود دارد که کاهش سنتز پروتئین و افزایش پروتئولیز را دلایلی برای کاهش پروتئین در طول تنش می‌دانند (Merewitz et al., 2011). در اینجا نیز کاهش سنتز پروتئین و افزایش پروتئولیز عوامل کاهش دهنده پروتئین در شرایط تیمار هورمونی هستند. به نظر می‌رسد گیاه با افزایش سطح کربوهیدرات محلول پتانسیل اسمزی سلول‌ها را در شرایط تنش گرمایی حفظ می‌کند. در شرایط تنش، گیاه برای حفظ تعادل اسمزی و توانایی جذب بیشتر

آب از محیط ریشه، ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها که در ساختار سلول‌ها شرکت دارند و باعث رشد گیاه می‌شوند، را در خود افزایش می‌دهد تا تنظیم اسمزی بهتر صورت گیرد (Abdalla, 2007).

تولید و تجمع پرولین از سازگاری‌های مهم فیزیولوژیک در گیاه تحت تنش اکسیداتیو است. افزایش پرولین تحت تنش می‌تواند به علت تحریک ساخت پرولین از گلوتامیک اسید باشد. پرولین می‌تواند به عنوان منبع ذخیره کربن و نیتروژن برای بافت‌های در حال ترمیم، یک ترکیب موثر در تنظیم و تعدیل فشار اسمزی، یک بافر برای تثبیت PH، یک پاک کننده گونه اکسیژن واکنش‌گر در سلول و نیز به عنوان یک مولکول محافظ عمل کند و نقش مهمی را در سلول‌های گیاهی در پاسخ‌های سازگار کننده و محافظتی در مقابل تنش‌ها ایفا کند (Trovato et al., 2008). بطور کلی تنش در گیاه موجب افزایش پرولین می‌گردد. افزایش چند برابری سطح پرولین در تیمار اسید آسبیزیک در مطالعه‌ی حاضر در تطابق با افزایش تولید پرولین در گیاه در مواجهه با تنش خشکی است.

آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که مانع از عملکرد رادیکال‌های آزاد می‌شوند و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این مواد می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال آزاد، آنها را به شکل پایدار خود تبدیل کنند و مانع از اثرهای مخرب آنها شوند (Varjovi et al., 2015). یکی از آنزیم‌های دفاعی آنزیم کاتالاز است. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود (Sharma & Ahmad 2014). مقایسه نمودار حاصل از میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد تحت تیمارهای هورمونی فعالیت آنزیم کاتالاز کم شده است. هرچند هورمون ایندول استیک اسید، آسبیزیک

اسید و جیبرلین به ترتیب در مرحله اول، دوم و سوم نمو گل در انگور یاقوتی کمترین فاصله را با نمونه شاهد داشتند. تیمار هورمونی ایندول استیک اسید و آبسیزیک اسید بیشترین نقش مثبت را در افزایش سطح فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نشان دادند. پلی فنول اکسیداز، یک متالوپروتئین حاوی مس است که اکسیداسیون ترکیبات فنولیک به کینون‌ها را کاتالیز می‌کند و باعث ایجاد رنگدانه‌های قهوه‌ای در بافت‌های زخمی می‌شود. این مکانیسم آنزیمی همچنین باعث از بین رفتن محصولات بویژه میوه‌های گرمسیری پس از برداشت می‌شود (Queiroz et al., 2008). به نظر می‌رسد آنزیم آسکوربات پراکسیداز اصلی ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانت در انگور یاقوتی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی انجام شده باشد. همانطور که در نمودار مربوط به تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات در شکل ۶ مشاهده می‌شود در مرحله بعد از گلدهی، همزمان با اوج تنش گرمایی در منطقه سیستان تحت تاثیر تیمار آبسیزیک اسید و ایندول استیک اسید، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به شدت افزایش یافته است. آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش چشمگیری در تعدیل میزان ROS تولید شده طی تنش در سلول دارد (Maruta et al., 2016). این آنزیم از آسکوربات به عنوان احیاء کننده استفاده می‌کند. هورمون ایندول استیک اسید به طور معناداری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را افزایش می‌دهد. گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مثل گایاکول برای سمیت زدایی و تجزیه آب اکسیژنه استفاده می‌کند و در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل دیده می‌شود. ترکیبات فنلی مثل گایاکول به عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند (Lu et al., 2008).

نتیجه گیری

مقاومت منحصر به فرد انگور یاقوتی به شرایط گرم و خشک سیستان بوسیله سازگاری آن در طول هزاران سال شکل گرفته است. تنظیم کننده های رشد با تاثیری که بر سیستم آنتی اکسیدانی و روابط منبع و مخزن می گذارند، به عنوان یک راه حل برای کاهش آثار تنش های محیطی در سطوح مولکولی، سلولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و محصول دهی تلقی می شوند. مقایسه چهار فاکتور رنگدانه های فتوسنتزی، میزان پروتئین، پرولین و کربوهیدرات نشان می دهد تحت تیمار هورمونی بویژه هورمون آبسزیک اسید مقاومت گیاه به تنش گرمایی افزایش پیدا می کند. هرچند تیمار جبرلین و ایندول استیک اسید به ترتیب تاثیر کمتری نسبت به آبسزیک اسید در القای مقاومت گرمایی دارند. تیمارهای هورمونی ایندول استیک اسید و آبسزیک اسید بیشترین نقش مثبت را در افزایش سطح فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نشان دادند. به نظر می رسد آنزیم آسکوربات پراکسیداز اصلی ترین آنزیم آنتی اکسیدانت در انگور یاقوتی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی انجام شده باشد. در حالیکه هر سه تیمار هورمونی تقریباً سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه مرحله رشدی مورد مطالعه شدند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه زابل براساس قرارداد پژوهانه به شماره IR-UOZ-GR-2874 انجام شد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد.

فهرست منابع

- Abdalla, M. (2007). The Influence of Water Stress on Growth, Relative Water Content, Photosynthetic Pigments, Some Metabolic and Hormonal Contents of two *Triticum aestivum* cultivars. *Journal of Applied Sciences Research*. 3(12):2062-2074.
- Aliyu O.M. Oluwayemisi O.A. and Joshua A.A. (2011). Foliar application of the exogenous plant hormones at pre-blooming stage improves flowering and fruiting in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 1(14): 43-50.
- Barickman T. Casey A. Kopsell D. and Sams C. (2014). Absciscic Acid Increases Carotenoid and Chlorophyll Concentrations in Leaves and Fruit of Two Tomato Genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 139(2): 61-66.
- Bates L.S. Waldren R.P. and Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39(2): 05-07.
- Choudhury N.K. and Behera R.K. (2001). Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents. *Photosynthetica*. 39(4): 81-88.
- Dazy M. Jung V. Féraud J.F. and Masfaraud J.F. (2008). Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74: 57-63.
- Ghasem beigi O. Erfani M.J. and Khademi O. (2015). Effect of gibberellic acid spraying and girdling on the improvement of the quantity and quality characteristics of 'Yaghooti' seedless grape'. *Journal of Crops Improvement*. 17(4): 57-69. (In Persian.)
- Grimplet J. Javier T. Natalia L. and Javier I. (2017). Differences in Flower Transcriptome between Grapevine Clones Are Related to Their Cluster Compactness, Fruitfulness, and Berry Size'. *Frontiers in plant science*. 8: 632.
- Haisel D. Pospíšilová J. Synková H. Schnablova R. and Batkova P. (2006). Effects of abscisic acid or benzyladenine on pigment contents, chlorophyll fluorescence, and chloroplast ultrastructure

- during water stress and after rehydration. *Photosynthetica*. 44(6): 06-14.
- Hall M.B. (2007). Methodological challenges in carbohydrate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(3): 59-67.
- He F. (2011). Bradford Protein Assay. *Bio-protocol*. 1: e45.
- Jahantigh H. Emamjomeh A. Solouki M. and Heidari F. (2020). Studying of Gene Expression Chalcone Synthase and ABA-8' Hydroxylase Related to Early ripening In Yaghooti Grape of Sistan. *Modern Genetics Journal*. 15(1): 61-70. (in Persian)
- Kaya C. Tuna A. and Yokas I. (2009). The Role of Plant Hormones in Plants Under Salinity Stress. *Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency*. 45-50
- Kuhn N. Alejandra S. Carlos A. Aníbal A. Carmen E. Satyanarayana G. Laurent D. and Patricio A.J. (2016). Regulation of polar auxin transport in grapevine fruitlets (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin homeostasis during fruit abscission. *BMC Plant Biology*. 16(3): 24-34.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* (Academic Press)
- Lu P. Sang W.G. and Ma K.P. (2008). Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China. *Journal of Integration Plant Biology*. 50: 393-401.
- Maruta T. Yoshihiro S. Shigeru S. and Takahiro I. (2016). Diversity and Evolution of Ascorbate Peroxidase Functions in Chloroplasts: More Than Just a Classical Antioxidant Enzyme. *Plant and Cell Physiology*. 57(13): 77-86.
- Merewitz E.B. Gianfagna T. and Huang B. (2011). Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. *Journal of experimental botany*. 62: 5311-33.
- Nakano Y. and Asada K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22(8): 67-80.

- Queiroz C. Maria L.M.L. Eliane F. and Vera L.V.M. (2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24(3): 61-75.
- Raymond J. Rakariyatham N. and Azanza J.L. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*. 34(9): 27-31.
- Sardar Shahraki A. Amirzadeh S. and Rafati M. (2019). The Effect of Application of Drip Irrigation System on Production Rate of Yoghouti Grapes and Its Effective Factors in Zabol County of Iran. *Agricultural Economics and Development*. 27: 187-208. (In Persian)
- Sharma I. and Ahmad P. (2014). Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press. 131-148.
- Shiri Y. Solouki M. Ebrahimie E. Emamjomeh A. and Zahiri J. (2019). Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics*. 112(1): 820-830.
- Shiri Y. and Kalkali N. (2021). Evaluation of HSP-70 heat-tolerance gene in Yaghooti grape of Sistan under hormonal treatment by Indole acetic acid, Gibberellic acid and Absciscic acid. *Agricultural Biotechnology Journal*. 13: 25-42. (In Persian.)
- Shiri Y. Solouki M. Ebrahimie E. Emamjomeh A. and Zahiri J. (2018). Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. *Plant Science*. 207: 198-208.
- Trovato M. Mattioli R. and Costantino P. (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *RENDICONTI LINCEI*. 19: 325-46.
- Varjovi M. Valizadeh M. and Bandehagh A. (2015). Primary Antioxidant Enzymes and Their Important Role in Oxidative Stress in Plants and Mammalian. *Biological Forum*. 7: 180-86.
- Vos I.A. Verhage A. Lewis G.W. Vlaardingerbroek I. Schuurink C.R. Pieterse M.J.C. and Saskia C.M. Van W. (2019). Absciscic acid is essential for rewiring of jasmonic acid-dependent defenses during herbivory. *bioRxiv*: 747345.

بررسی اسیدهای فنلی و برخی خواص زیستی گیاه *Nepeta macrosiphon*

سعید ملائی^{۱*}، حدیثه عباسی هولاسو^۱، بهور اصغری^۲، مصطفی عبادی^۳ حسین هاشم پور^۱

چکیده

مقدمه: اسیدهای فنلی متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خواص زیستی فراوانی داشته و در اندام‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند که نقش مهمی در سلامت موجودات دارند.

روش کار: در این کار تحقیقاتی، عصاره‌گیری از اندام‌های مختلف گیاه *Nepeta macrosiphon* با کمک حلال اتانول ۸۰ درصد انجام گرفت و در ادامه به فرکشن‌های اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول تقسیم گردیدند. بهارو، محتوای کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، عصاره تام به همراه فرکشن‌ها با روش‌های فولین سیکالتو، رنگ سنجی آلومینیم کلرید، DPPH و اسپکتروسکوپی ارزیابی شد و در نهایت ترکیبات آنها توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج: عصاره اتانولی گل به ترتیب با مقدار ۷۰/۵ میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم نمونه و ۲۹/۲ میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید کل را داشت. همچنین این عصاره با مقدار IC₅₀ معادل ۳۱۵/۲ میکروگرم بر میلی لیتر بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. علاوه بر این، عصاره گل توانایی بیشتری در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز داشت. نتایج آنالیز اسیدهای فنلی نشان داد که در بین اندام‌های مورد مطالعه، گل بیشترین میزان اسیدهای فنلی را داشت و اسید رزمارینیک و اسید پاراکوماریک به ترتیب با مقدار ۶۷۲/۷ و ۱۴۴/۳ میکروگرم بر گرم نمونه عمده ترین اسیدهای فنلی آزاد موجود در گل بودند و اسید کافئیک نیز عمده ترین ترکیب موجود در عصاره اسیدهای فنلی استری محلول گل بود. همچنین عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد حاصل از گل، دارای بیشترین خلصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در مقایسه با عصاره حاوی اسیدهای فنلی استری محلول و دیگر اندام‌ها بود.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل، گل گیاه پونه سا دارای بیشترین ترکیبات فنلی از جمله اسید رزمارینیک، اسید پاراکوماریک و اسید کافئیک است و با توجه به پتنتسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز می‌تواند در صنعت داروسازی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *Nepeta macrosiphon*، آنتی‌اکسیدان، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز،

اسیدهای فنل.

۱. نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی. پست الکترونیکی: s.mollaei@azaruniv.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۱۳۱۴۵۲۰۳۵.
۲. قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی علوم باغبانی.
۳. تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

مقدمه

پونه‌سا (*Nepeta* L.) یکی از بزرگ‌ترین سرده‌های تیره نعنائیان (Lamiaceae) بوده با بالغ بر ۲۵۰ گونه‌ی مختلف یک‌ساله و چندساله در جهان است. اغلب گونه‌های پونه‌سا در مناطق معتدله اروپا، آسیا و شمال آفریقا انتشار دارند. بطور کلی، بیشترین گونه سرده پونه‌سا، در کشورهای ایران، پاکستان و هند (بیشتر غرب هیمالیا) یافت می‌شود. در ایران، بالغ بر ۶۷ گونه علفی یک‌ساله و چندساله از این سرده گزارش شده است و از این میان بیش از ۶۰٪ گونه‌ها انحصاری هستند. گونه‌های مختلف پونه‌سا دارای فرم‌های رویشی کامفیت، همی کریپتوفیت و تروفیت هستند و دارای برگ‌های ساده، در حاشیه دارای دندانه‌های هلالی و گل‌آذین‌گرزن متراکم یا فاصله‌دار می‌باشند (Mozaffarian, 1996; Jamzad et al., 2000).

برخی از گونه‌های پونه‌سا در ایران به عنوان گیاهان دارویی، کاربردهای گسترده‌ای دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به *N. ispanhanica* Bioss. *N. ponogosperma* Jamzad *N. bracteata* Benth. *binaloudensis* Jmzad. *N. pungens* (Bunge) Benth. و et Assadi. اشاره کرد. این گیاهان حاوی محتوای بالایی از متابولیت‌های ثانویه به ویژه ترکیبات فنلی هستند که خواص بیولوژیکی و دارویی مختلفی را از خود نشان داده‌اند. از جمله خواص گزارش شده پونه‌سها در طب سنتی، می‌توان به اثرات ادرارآور، ضدسرفه، ضداسپاسم، ضدآسم، تب‌بر و ضد درد آن‌ها اشاره کرد. همچنین گیاهان سرده پونه‌سا بطور عمده به دلیل اثرات بالقوه ضدتوموری، ضدالتهابی و ضد میکروبی مورد توجه محققین می‌باشند (Mozaffarian, 1996; Jamzad et al., 2000; Süntar et al., 2018).

اسیدهای فنلی زیر گروهی از دسته ترکیبات فنلی هستند که در گیاهان به صورت آزاد یا مشتق شده با سایر ترکیبات طبیعی از جمله فلاونوئیدها، الکل‌ها، هیدروکسی اسیدهای چرب، استرول‌ها و گلوکوزیدها یافت می‌شوند (Klick & Herrmann, 1998; Lam *et al.*, 2001). اگرچه تاکنون اطلاعات زیادی در مورد نقش اسیدهای فنلی در گیاهان موجود نیست، ولی دارای عملکردهای مختلفی مانند جذب مواد مغذی، سنتز پروتئین، فعالیت آنزیمی و فتوسنتز هستند (Shahidi & Nacsk, 1995). این ترکیبات موادی با یک حلقه فنلی و حداقل یک گروه عاملی کربوکسیلیک اسید هستند و می‌توان آنها را بسته به واحدهای کربنی زنجیره جانبی متصل به حلقه فنلی، به ترکیبات دارای ساختارهای C_6-C_1 ، C_6-C_2 ، C_6-C_3 و C_6-C_1 تقسیم‌بندی کرد که مهم‌ترین آن‌ها C_6-C_3 (مشتق شده از سینامیک اسید) و C_6-C_1 (مشتق شده از اسید بنزوئیک) می‌باشند (Goleniowski *et al.*, 2013). بسیاری از اسیدهای فنلی مانند مشتقات سینامیک و بنزوئیک اسید در تمام گیاهان و گیاهانی که به عنوان غذا استفاده می‌شوند (مانند میوه‌ها، سبزیجات و غلات) وجود دارند. با این حال، فقط یک بخش جزئی از اسیدهای فنلی، به فرم اسید آزاد دیده می‌شوند. با توجه به نکات ذکر شده و اهمیتی که اسیدهای فنلی دارا می‌باشند این ترکیبات موضوع بسیاری از مطالعات شیمیایی، بیولوژیکی، کشاورزی و پزشکی بوده‌اند (Verpoorte *et al.*, 2002; Shahidi & Nacz, 2004). نتایج این تحقیقات مشخص کرده‌اند که ترکیبات فنلی در مدیریت بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی دارای پتانسیل بالایی هستند (Shetty *et al.*, 2004).

برخی از تحقیقات اخیر نشان داده اند که ترکیبات پلی فنلی قادر به تنظیم گلوکز خون پس از غذا و مهار عدم تحمل گلوکز با تقویت پاسخ به

انسولین و کاهش ترشح پلی پپتید انسولینوتروپیک وابسته به گلوکز و پلی پپتید-۱ شبه گلوکاگون هستند (Johnston *et al.*, 2005; Dao *et al.*, 2011). پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی قادر به مهار آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز هستند. این دو آنزیم نقش کلیدی در هیدرولیز نشاسته در سیستم گوارش دارند و به این ترتیب کاستن شدت فعالیت آن‌ها می‌تواند کمک شایانی به کنترل سطح قند خون، به ویژه در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نماید (Mccue *et al.*, 2004). استفاده از مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز موجود در گیاهان دارویی، میوه‌ها و سبزیجات می‌تواند یک استراتژی خوب برای کنترل قند خون پس از صرف غذا، ارائه دهد که تا حد امکان عوارض جانبی موجود در اکثر داروهای موجود، مانند اتساع شکم، نفخ و احتمالاً اسهال و غیره را نداشته باشد (Gao *et al.*, 2006; Kotowaroo *et al.*, 2007).

گونه *N. macrosiphon* Boiss. با نام فارسی پونه‌سای سی سختی یا لوله بلند یکی از گیاهان انحصاری فلات ایران است که بطور عمده در دامنه‌های سنگلاخی، صخره‌ای و حاشیه مزارع مناطق ایرانی تورانی و خزری یافت می‌شود. در طب سنتی این گیاه بعنوان مقوی معده، ضد آسم، ضدنفخ و قاعده آور مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jamzad, 2012) و تابحال مطالعه جامعی بر روی متابولیت‌ها و خواص زیستی این گیاه انجام نگرفته است. لذا، در این مطالعه برای اولین بار اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول موجود در اندام‌های گل، برگ، ساقه و ریشه گیاه *N. macrosiphon* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، خواص زیستی (آنتی اکسیدانی و مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز) عصاره‌ها و فرکشن‌های هر اندام نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و خشک کردن گیاه

گیاه *N. macrosiphon* از استان آذربایجان شرقی، منطقه زنوز در فصل گلدهی جمع‌آوری گردید و در هرباریوم دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (با شماره هرباریوم ASMU980808) نگهداری شد. در ادامه، بعد از جداکردن اندام‌های مختلف گیاه، این نمونه‌ها در یک مکان تاریک و دور از نور خورشید خشک گردید.

مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده برای فرآیند عصاره‌گیری و انجام تست‌های بیولوژیکی از شرکت مرک خریداری شدند. همچنین در آنالیزهای HPLC، استاندارد اسیدهای فنلی (بنام‌های اسید گالیک، اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک، اسید وانیلیک، اسید کافئیک، اسید رزمارینیک، اسید پارا-کوماریک، اسید فرولیک، اسید سینامیک، اسید متا-کوماریک و اسید سالیسیک) و تمام حلال‌های مورد استفاده، HPLC grade بودند.

چربی‌زدایی

۴ گرم از اندام‌های مختلف گیاه (گل، برگ، ساقه و ریشه) به صورت جداگانه با ۴۰ میلی‌لیتر حلال n-هگزان مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه داخل حمام اولتراسونیک قرار گرفت و سپس، توسط کاغذ صافی صاف گردید. این فرآیند ۳ بار تکرار شد تا اکثر ترکیبات چربی دوست حذف گردند.

عصاره‌گیری

عصاره تام اتانولی

تفاله‌ی به دست آمده از فرآیند چربی‌زدایی با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۸۰ درصد مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و با استفاده از کاغذ صافی واتمن، صاف گردید. عصاره‌های به دست آمده با کمک دستگاه تبخیرکننده دوارخشک شدند.

جزبندی عصاره تام اتانولی

۳۰ میلی‌لیتر متانول به عصاره تام اتانولی به دست آمده اضافه گردید و با کمک HCl (۰/۱ مولار)، pH آن در ۲ تنظیم گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به دست آمده جدا گردید. با استفاده از قیف جدا کننده، این محلول ۳ مرتبه توسط حلال n-هگزان مورد استخراج قرار گرفت تا فاز آبی آن جدا گردد. سپس به نسبت حجمی ۱:۱ به فاز آبی حلال-های دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات (به اندازه‌ی حجم فاز آبی موجود) اضافه گردید که این فرآیند نیز در ۳ مرتبه تکرار شد. در نهایت، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شدند و فاز آلی حاصل که حاوی اسیدهای فنلی آزاد است، خشک گردید و برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به فاز آبی باقی مانده ۸۰ میلی‌لیتر NaOH، ۲ مولار اضافه گردید و محلول به مدت ۴ ساعت باقی ماند. در ادامه با تنظیم pH آن در مقدار ۳ الی ۴، با کمک HCl (۰/۱ مولار، محلول داخل سانتریفیوژ قرار گرفت. با استفاده از حلال n-هگزان، محلول ۳ مرتبه توسط قیف جدا کننده استخراج گردید. سپس با اضافه کردن حلال‌های دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات به نسبت ۱:۱ روی فاز آبی جدا شده، ۳ مرتبه استخراج انجام گرفت. عصاره به دست آمده که حاوی

اسیدهای فنلی استری حل شده است، خشک گردید و برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Krygier et al., 1982).

آنالیز کمی و کیفی اسیدهای فنلی

برای جداسازی و شناسایی اسیدهای فنلی عصاره‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (ساخت شرکت Knauer، برلین، آلمان) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره (با غلظت ۱۰۰۰ ppm) به دستگاه HPLC تزریق شد تا اسیدهای فنلی شناسایی گردد. ستون مورد استفاده از نوع فاز معکوس Welch Ultisil XB-C18 بوده که حاوی خلل و فرج ۵ میکرومتر با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌لیتر بود. برای جداسازی اسیدهای فنلی از شویش گرادیانی متانول (حلال A) و آب اسیدی (آب HPLC) ۰/۱ درصد حجمی-حجمی استیک اسید (حلال B) با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید. جداسازی در دمای اتاق و طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت و کل زمان آنالیز برای هر عصاره ۵۵ دقیقه بود (Hazrati et al., 2020).

اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی عصاره

محتوای کل ترکیبات فنل نمونه‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتو مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها (با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱۰۰ میکرولیتر محلول فولین سیوکالتو (۱۰٪) مخلوط گردید و به هم زده شد و به مدت ۶ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند. سپس ۸۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به هر کدام اضافه گردید و به مدت ۹۰ دقیقه هم زده شد. در آخر، مقدار جذب نمونه‌ها به همراه محلول شاهد در طول موج ۷۴۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده بر

حسب میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه و ارائه گردید (Hazrati et al., 2020).

اندازه گیری محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره

برای اندازه گیری محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی، از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد. محلول عصاره ها با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی - لیتر توسط حلال متانول آماده گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از این عصاره ها با ۱۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ($AlCl_3$) مخلوط شد. در ادامه به محلول تهیه شده، ۶۰ میکرولیتر متانول، ۱۰ میکرولیتر سدیم استات ۰/۵ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و در آخر جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده بر حسب میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره محاسبه و ارائه گردید (Hazrati et al., 2020).

خاصیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت (Hazrati et al., 2020). ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره با ۱۸۰ میکرولیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار مخلوط شد و با محلول شاهد (۲۰ میکرولیتر متانول و ۱۸۰ میکرولیتر محلول DPPH) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب مخلوط ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج UV، خوانده شدند. درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

تست آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

۲۰ میکرولیتر از آنزیم آلفا-گلوکوزیداز (۰/۵ unit/ml) با ۱۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۹) و ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده در غلظت‌های مختلف (pH برابر با ۷/۰)، مخلوط گردیدند. این مخلوط‌های آماده شده داخل انکوباتور در تاریکی، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه همزده شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranose اضافه گردید و مخلوط واکنش دوباره داخل انکوباتور، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد. سپس ۸۰ میکرولیتر محلول ۰/۲ مولار کربنات سدیم اضافه گردید و به همراه شاهد (روش ذکر شده بدون عصاره)، میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Moradi-Afrapoli et al., 2012). برای محاسبه درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز از رابطه زیر استفاده می‌شود:

$$\text{Enzyme inhibitin (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

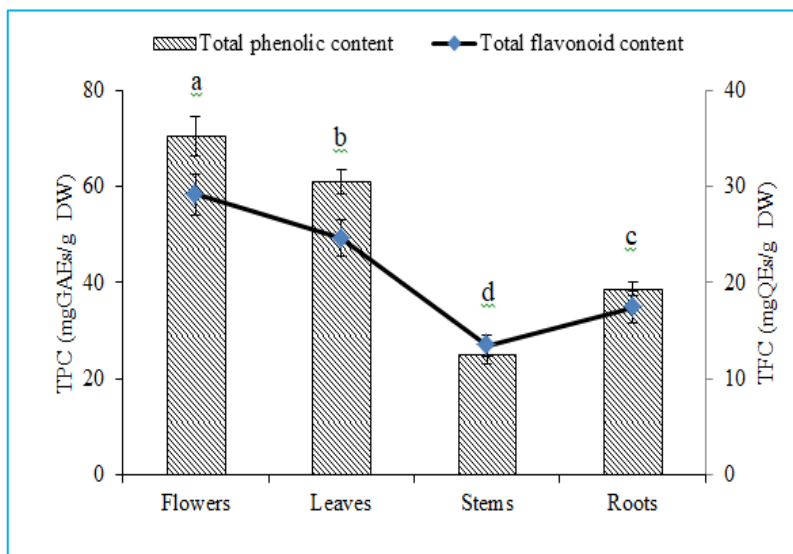
آنالیز آماری

جهت انجام آنالیز آماری، مقایسه میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون پس تجربی Tukey به کمک نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ انجام گردید.

نتایج

مطالعات فیتوشیمیایی

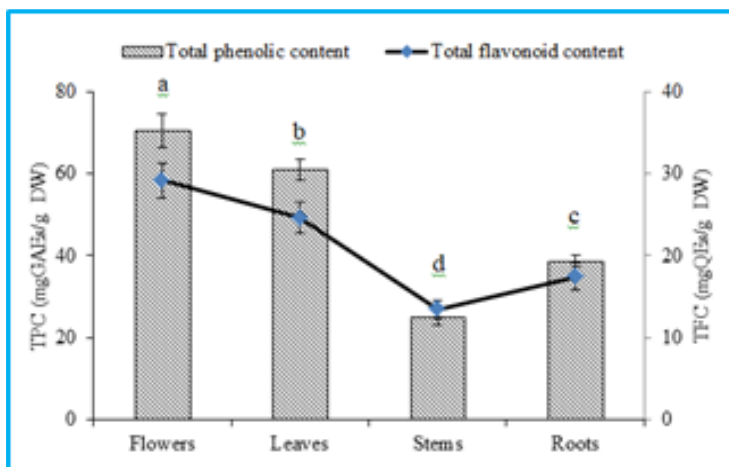
شکل ۱ میانگین بازده عصاره اتانولی اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، عصاره گل و برگ گیاه به ترتیب با مقادیر ۱۷/۶ و ۱۶/۲ درصد بیشترین بازده را داشتند و کمترین بازده نیز متعلق به عصاره ساقه (۶/۴ درصد) بود.



شکل ۱- میانگین بازده عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 1: Average yield of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

شکل ۲ میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* را نشان می‌دهد. برای محاسبه محتوای کل ترکیبات فنل و فلاونوئیدی به ترتیب از منحنی استاندارد اسید گالیک و کوئرستین استفاده گردید. همانطور که از نتایج قابل مشاهده هست بیشترین مقدار فنل مربوط به عصاره گل (۷۰/۵ میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم خشک عصاره) است و عصاره به دست آمده از ساقه نیز دارای کمترین میزان فنل بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فلاونوئیدی کل عصاره‌های اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف نیز نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به عصاره‌ی گل (۲۹/۲ میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره) است.

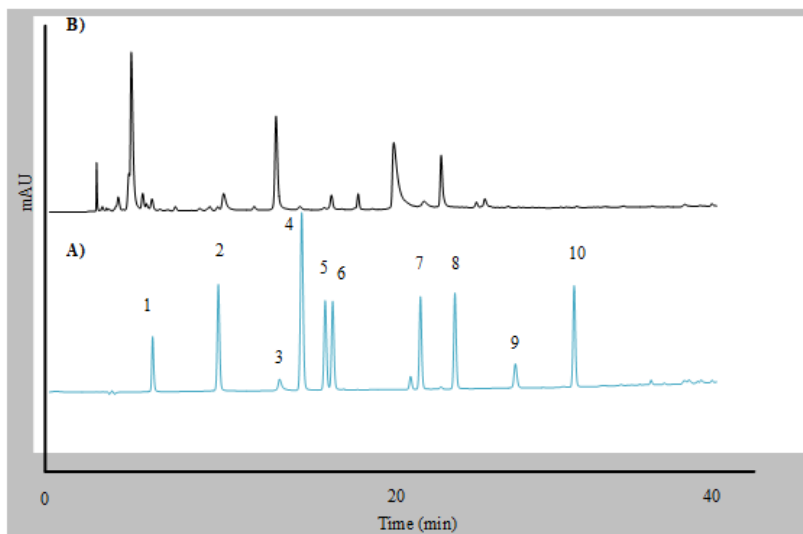


شکل ۲- میانگین میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 2: Total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

اسیدهای فنلی آزاد و استری

اسیدهای فنلی آزاد و استری موجود در عصاره‌های گل، برگ، ساقه و ریشه گیاه *Nepeta macrosiphon* استخراج گردیدند و با کمک دستگاه HPLC جداسازی شدند و به کمک استاندارد، مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۳). مقادیر کمی اسیدهای فنلی استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه به کمک سطح زیر پیک و معادله کالیبراسیون حاصل از استاندارد آنها محاسبه گردید و نتایج در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام (A) استاندارد اسیدهای فنلی و (B) اسیدهای فنلی آزاد عصاره گل. استاندارد اسیدهای فنلی به ترتیب ۱- اسید گالیک، ۲- اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک، ۳- اسید وانیلیک، ۴- اسید کافئیک، ۵- اسید رزمارینیک، ۶- اسید پارا-کوماریک، ۷- اسید فرولیک، ۸- اسید سینامیک، ۹- اسید متا-کوماریک و ۱۰- اسید سالیسیک می باشند.

Figure 3: Chromatograms of A) Phenolic acid standards, and B) Free phenolic acids obtained from leaf extract. The standard of phenolic acids are 1- gallic acid, 2- para-hydroxybenzoic acid, 3- vanillic acid, 4- caffeic acid, 5- rosmarinic acid, 6- para-coumaric acid, 7- ferulic acid, 8- cinnamic acid, 9- meta-coumaric acid and 10- salicyc acid, respectively.

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین مقدار اسیدهای فنلی آزاد (۱۵۱۵/۹) میکروگرم بر گرم نمونه) مربوط به گل بود. اسید رزمارینیک با مقدار ۶۷۲/۷ میکروگرم بر گرم نمونه عمده‌ترین اسید فنلی موجود در گل بود و به دنبال آن اسید پارا-کوماریک با مقدار ۶۱۴/۳ میکروگرم بر گرم نمونه در رتبه دوم قرار داشت. در برگ گیاه نیز اسید پارا-کوماریک و اسید رزمارینیک به ترتیب با مقادیر برابر با ۴۵۵/۶ و ۳۱۳/۵ میکروگرم بر گرم نمونه، اسیدهای فنلی عمده موجود در این اندام بودند. ریشه گیاه نیز دارای کمترین میزان اسیدهای فنلی مورد مطالعه بود بطوریکه شش اسید فنلی دارای مقدار زیر حد تشخیص (Trace) بوده و یا در این اندام وجود نداشتند.

جدول ۱- مقادیر کمی اسیدهای فنلی آزاد استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه *N.*

macrosiphon (میکروگرم بر گرم وزن خشک $\pm$ انحراف معیار)

Table 1: Quantities of free phenolic acids extracted from different organs of *N. macrosiphon* (microgram/gram of dry weight $\pm$ standard deviation)

ترکیبات	گل	برگ	ساقه	ریشه
اسید گالیک	۱۴۳±۰/۸	۵/۶±۰/۳	۵/۷±۰/۲	۶/۹±۰/۳
اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک	۲۹/۶±۲/۱	۳/۵±۰/۱	۱۱/۴±۰/۳	۱۴/۸±۰/۴
اسید وانیلیک	N.D	Trace	Trace	Trace
اسید کافئیک	N.D	۱۴۴/۲±۵/۴	۳۵/۷±۳/۰	۳۵/۵±۲/۲
اسید رزمارینیک	۶۷۲/۷±۱۲/۵	۳۱۳/۵±۷/۸	۲۷/۱±۱/۱	Trace
اسید پارا-کوماریک	۶۱۴/۳±۷/۰	۴۵۵/۶±۹/۹	۴۵/۹±۲/۰	Trace
اسید فرولیک	۶۶/۶±۳/۹	N.D	N.D	Trace
اسید سینامیک	Trace	Trace	N.D	N.D
اسید متا-کوماریک	۱۱۸/۴±۵/۰	۳۷/۸±۳/۸	۲۰/۴±۱/۴	N.D
اسید سالیسیلیک	Trace	۵۲/۲±۴/۱	۲۱/۶±۲/۳	N.D
مجموع	۱۵۱۵/۹±۳۱/۳	۵۴۵/۶±۳۱/۴	۱۶۷/۸±۱۰/۳	۵۷/۲±۲/۹

N.D: شناسایی نشده، Trace: کمترین حدممکن

با بررسی اسیدهای فنلی استری محلول موجود در اندام‌های مختلف (جدول ۲) مشخص شد که بیشترین مقدار این ترکیبات) نیز در گل این گیاه (۸۶۲/۴ میکروگرم بر گرم نمونه) وجود دارد. کمترین مقدار نیز با مقدار برابر با ۲۹/۴ میکروگرم بر گرم نمونه، مربوط به ساقه است که در این اندام فقط ترکیب اسید کافئیک مورد شناسایی قرار گرفت. در ریشه نیز تنها اسید وانیلیک وجود داشت. بر اساس نتایج، اسید گالیک و اسید رزمارینیک و اسید متا-کوماریک در هیچ یک از اندام‌های گیاه یافت نشدند. کافئیک اسید با مقدار برابر با ۶۹۸/۱ میکروگرم بر گرم نمونه که در گل موجود بود، بیشترین مقدار را در بین دیگر اسیدهای فنلی استری محلول تمام اندام‌ها داشت. همچنین، اسید کافئیک با مقدار ۳۱۱/۷ میکروگرم بر گرم خشک نمونه، ترکیب عمده موجود در برگ بود.

جدول ۲- مقادیر کمی اسیدهای فنلی استری محلول استخراج شده از اندام‌های

مختلف گیاه *N. macrosiphon* (میکروگرم بر گرم وزن خشک $\pm$ انحراف معیار)

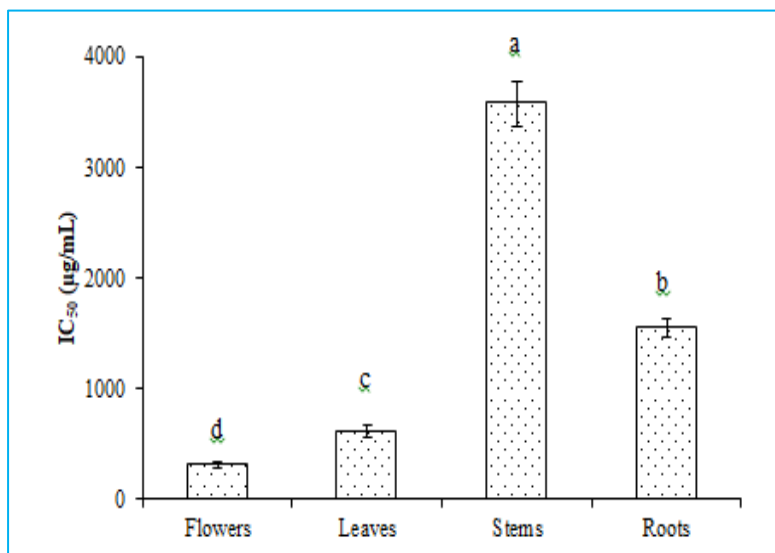
Table 2: Quantities of esterified phenolic acids extracted from different organs of *N. macrosiphon* (microgram/gram of dry weight $\pm$ standard deviation)

ترکیبات	گل	برگ	ساقه	ریشه
اسید گالیک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک	۵/۷ $\pm$ ۰/۵	۷/۹ $\pm$ ۰/۸	N.D	N.D
اسید وانیلیک	Trace	۶۳/۷ $\pm$ ۲/۰	N.D	۱۳۰/۱ $\pm$ ۴/۴
اسید کافئیک	۶۹۸/۱ $\pm$ ۷/۲	۳۱۱/۷ $\pm$ ۶/۱	۲۹/۴ $\pm$ ۲/۶	N.D
اسید رزمارینیک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید پارا-کوماریک	N.D	۱۷۱/۶ $\pm$ ۵/۷	N.D	N.D
اسید فرولیک	۱۵۸/۶ $\pm$ ۶/۰	۱۰۷/۰ $\pm$ ۵/۳	N.D	N.D
اسید سینامیک	N.D	Trace	N.D	N.D
اسید متا-کوماریک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید سالیسیلیک	N.D	۳۹/۰ $\pm$ ۱/۰	N.D	N.D
مجموع	۸۶۲/۴ $\pm$ ۱۳/۹	۶۶۱/۹ $\pm$ ۲۰/۹	۲۹/۴ $\pm$ ۲/۶	۱۳۰/۱ $\pm$ ۴/۴

N.D: شناسایی نشده، Trace: کمترین حد ممکن

بررسی فعالیت زیستی عصاره اتانولی خاصیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده با روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). نتایج نشان داد که بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی با IC_{50} برابر با $315/2$ میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره گل است و به دنبال آن، عصاره اتانولی برگ گیاه با IC_{50} برابر با $616/5$ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. عصاره‌های اتانولی ساقه و ریشه نیز قدرت بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از خود نشان ندادند.

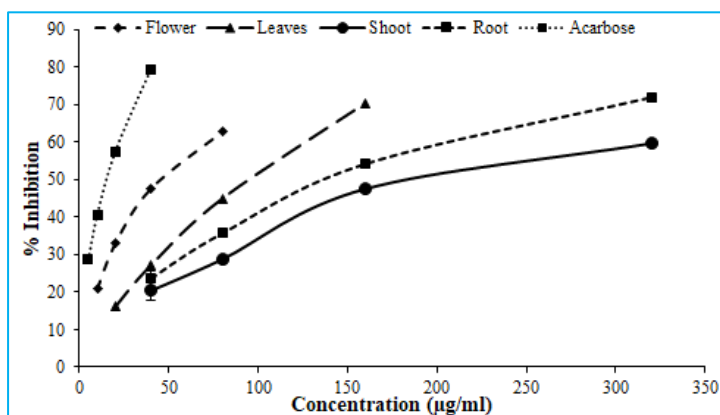


شکل ۴- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 4: Antioxidant activity of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

میزان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در اثر عصاره‌های اتانولی که از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* به دست آمده بود، مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی اندام‌های مختلف نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، عصاره گل در کم‌ترین غلظت نسبت به عصاره‌های دیگر، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را مهار نمود (۴۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر). این در حالی است که IC_{50} مربوط به آکاربوز به عنوان یک مهارکننده استاندارد آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ۲۹/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در بین عصاره‌های دیگر اندام‌های گیاهی، عصاره برگ در گستره‌ی غلظتی پائین‌تری (۱۶۰-۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توان مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را از خود نشان داد. IC_{50} مربوط به مهار این آنزیم توسط عصاره برگ، ۹۸/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود در حالیکه عصاره‌های ریشه و ساقه با IC_{50} معادل ۱۵۲/۹ و ۲۱۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای پائین‌ترین قدرت بازدارندگی بودند.



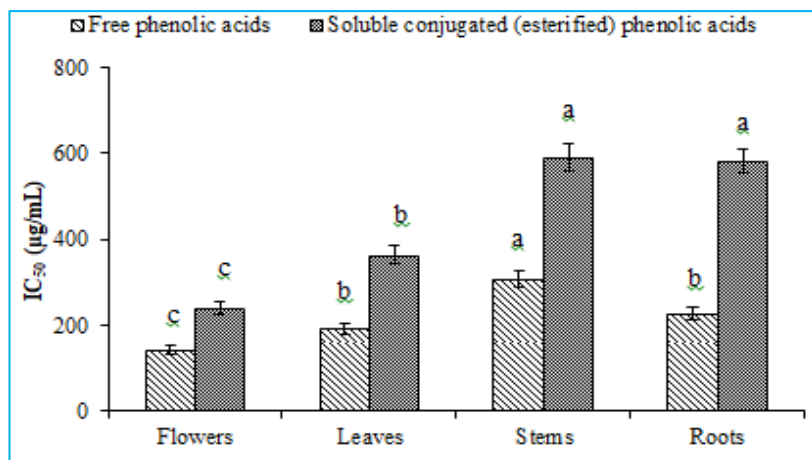
شکل ۵: مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز عصاره اتانولی حاصل از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 5: Inhibition of alpha-glucosidase enzyme of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions.

بررسی خواص زیستی فرکشن‌های عصاره‌ی اتانولی

خاصیت آنتی اکسیدانی

شکل ۶ میزان IC_{50} فرکشن‌های به دست آمده از عصاره‌ی اتانولی را در مقابله با رادیکال‌های آزاد DPPH نشان می‌دهد. همانطور که از نتایج قابل مشاهده است عصاره‌ی حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل با مقدار IC_{50} معادل ۱۸۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت و به دنبال آن عصاره‌ی حاوی اسیدهای فنلی آزاد برگ با IC_{50} برابر با ۱۹۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. همچنین عصاره ساقه و ریشه حاوی اسیدهای فنلی استری محلول به ترتیب با مقادیر IC_{50} برابر با ۵۹۲/۱ و ۵۸۴/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین فعالیت بودند. لازم به ذکر است که از بین عصاره‌های حاوی اسیدهای فنلی استری محلول، عصاره‌ی گل با IC_{50} معادل ۲۴۲/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت را داشت.



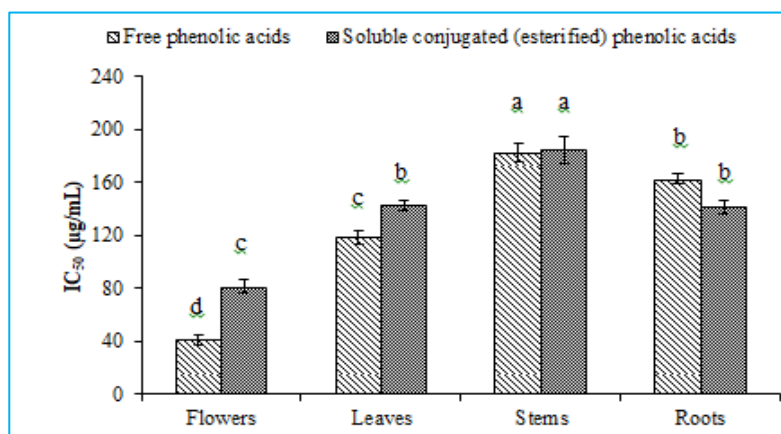
شکل ۶- خاصیت آنتی اکسیدانی جزه‌های عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های

مختلف گیاه *N. macrosiphon* هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 6: Antioxidant activity of the ethanol extract fraction obtained from different organs of *N. macrosiphon*. Each experiment was performed in three replicates.

مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

شکل ۷ مقادیر IC_{50} عصاره‌ی اندام‌های مختلف برای مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده، مقادیر آن برای عصاره گل، برگ، ساقه و ریشه حاوی اسیدهای فنلی آزاد به ترتیب برابر با ۴/۱۸، ۳/۴۱، ۹/۱۸۲ و ۴/۱۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و بر اساس این نتایج، توان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در بین نمونه‌های مورد مطالعه، با توالی گل < برگ < ریشه < ساقه کاهش نشان داد. همین ترتیب در مورد عصاره حاوی اسیدهای فنلی استری محلول نیز صادق بود و در بین این عصاره‌ها، گل بیشترین فعالیت مهار آنزیم را از خود نشان داد. در مقایسه‌ی بین قدرت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط فرکشن‌های حاوی ترکیبات فنل آزاد و اسیدهای فنلی استری محلول، می‌توان مشاهده کرد که فقط در فرکشن‌های به دست آمده از ریشه، نمونه حاوی اسیدهای فنلی استری قدرت بالاتری از نمونه حاوی ترکیبات فنل آزاد دارند. این در حالی است که در سایر اندام‌ها روند معکوسی حاکم بود.



شکل ۷- مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فرکشن‌های عصاره تام اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 7: Inhibition of alpha-glucosidase enzyme of the ethanol extract fraction obtained from different organs of *N. macrosiphon*. Each experiment was performed in three replicates.

بحث

اسیدهای فنلی متابولیت های گیاهی هستند که چندین عملکرد مهم دارند و در سلول های گیاهی به فرم های آزاد و استری محلول یافت می شوند. این ترکیبات در انواع مختلف میوه ها، سبزیجات و گیاهان دارویی یافت می شوند. در سال های اخیر، مطالعات وسیعی در مورد آن ها انجام شده و نشان داده اند که این پلی فنل های گیاهی خواص زیستی فراوانی در هر دو شرایط *in vivo* و *in vitro* دارند (Dos Santos et al., 2006; Sato et al., 2011; Wang et al., 2017). همچنین، این ترکیبات علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی و ضد دیابت، دارای خواص دیگری چون ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی هستند (Kumar & Goel, 2019). در این تحقیق محتوای و ترکیبات فنل عصاره های اتانولی اندام های مختلف گیاه *N. macrosiphon* بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین مقدار اسیدهای فنلی آزاد، مربوط به گل بود و رزمارینیک اسید و پارا-کوماریک اسید عمده ترین اسیدهای فنلی موجود در آن بودند. در برگ گیاه نیز اسید رزمارینیک، اسید پارا-کوماریک و اسید کافئیک اسیدهای فنلی عمده موجود در این اندام هستند. همچنین، اسید کافئیک ترکیب غالب اسیدهای فنل استری محلول در گل و برگ است. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی فرکشن های به دست آمده از اندام های مختلف نیز نشان داد که عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارد و به دنبال آن عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد برگ دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. علاوه بر این، از بین عصاره های حاوی اسیدهای فنلی استری محلول، عصاره ی گل بیشترین فعالیت را داشت. بر اساس مطالعات انجام گرفته، محتوای بالای رزمارینیک اسید در گیاهان نقش مهمی در فعالیت های بیولوژیکی و دارویی آن ها دارد (Berhow et al.,

اسیدهای فنلی و برخی خواص زیستی گیاه *Nepeta macrosiphon* (Lee et al., 2013; Lima et al., 2006; 2012). همچنین، خواص آنتی اکسیدانی گیاهان نپتا بطور عمده مربوط به حضور اسیدهای فنل، به ویژه اسیدهای رزمارینیک و کافئیک است (Lee et al., 2010). Nestorović و Živković و همکاران (۲۰۱۸) متابولیت‌های موجود در عصاره‌ی متانولی سه گونه پونه‌سا به نام‌های *N. rtanjensis*، *N. sibirica* و *N. nervosa* را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج، در تمام گونه‌های مورد بررسی، رزمارینیک اسید ترکیب فنل غالب بود، در حالی که سایر اسیدهای فنلی شناسایی شده (کلروژنیک، نئوکلروژنیک و کافئیک) از مقادیر کمتری برخوردار بودند. سنجش‌های ABTS، DPPH و FRAP نشان داد که عصاره‌های متانولی *N. nervosa*، *N. sibirica* و *N. rtanjensis* دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که پتانسیل آنتی-اکسیدانی قوی، می‌تواند به اسیدهای فنلی و در وهله اول به اسید رزمارینیک نسبت داده شود. در پژوهشی که توسط Aras و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، ترکیبات فنل عصاره‌ی متانولی گیاه *N. nuda* که به روش خیساندن تهیه شده بود، با استفاده از UHPLC-ESI-MS/MS شناسایی شدند. اسید کلروژنیک، اسید رزمارینیک و اسید کوئینیک به عنوان فراوان‌ترین ترکیبات در این گیاه یافت شدند. همچنین، مقادیر کمتری از کامفرول، اسید پارا-کوماریک، اسید کافئیک، آپیجنین و لوتئولین به طور کمی شناسایی شدند. در نتیجه، برگ‌های *N. nuda* دارای پتانسیل بالایی از محتوای فنلی است که بطور عمده به فعالیت‌های زیستی نسبت داده می‌شود. در مطالعه دیگری، Dienaitė و همکاران (۲۰۱۸)، متابولیت‌ها و خواص زیستی شش گونه نپتا را مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی این گیاهان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و ارتباط مستقیمی بین میزان فنل با خاصیت آنتی-

اکسیدانی آن‌ها برقرار است و کلروژنیک، فرولیک و رزمارینیک اسید به عنوان ترکیبات عمده آن‌ها هستند. Kraujalis و همکاران (۲۰۱۱) خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی حاصل از گونه‌های *N. bulgaricum*، *N. transcaucasica* و *N. cataria* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی متانولی گونه *N. cataria* دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و ارتباط مستقیمی بین محتوای فنل کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات موجود در آن نشان داد که رزمارینیک اسید به عنوان ترکیب عمده است و به دنبال آن کافئیک اسید دارای بیشترین مقدار است. در مطالعه‌ای که به بررسی متابولیت‌های دو گونه‌ی *N. heliotropifolia* و *N. congesta* پرداخته شده است، در بین اندام‌های مورد مطالعه، عصاره‌ی گل‌های آن‌ها غنی از ترکیبات فنل بود و فراوان‌ترین اسیدهای فنلی آن‌ها اسید رزمارینیک (به ترتیب با مقادیر ۸۹۰۹/۹ و ۴۳۱۷/۲ میکروگرم بر گرم) بود. همچنین، فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره‌های آن‌ها با استفاده از روش‌های ABTS، DPPH و UPRAC مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج، عصاره‌های گل هر دو گیاه که دارای محتوای فنل و فلاونوئیدی بیشتری در بین عصاره‌ها بودند، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند (Akdeniz et al., 2020). در تحقیقی که Siddiqui و همکاران (۲۰۱۷) انجام دادند دریافتند که به دلیل بالا بودن محتوای فنل کل گل *N. bracteata*، این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است. در پژوهشی دیگر بر روی گونه *N. rtanjensis*، گل و برگ دارای محتوای فنل، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود (Jasna et al., 2017). مطالعات انجام گرفته بر روی اسید پارا-کوماریک، اسید فنلی مشتق شده از سینامیک اسید، نشان داد که این ترکیب به عنوان دهنده هیدروژن یا

الکترون عمل کرده و در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار ۵۵/۶ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH شد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌مقایسه با BHT را داشت (Kiliç & Yeşiloğlu, 2013). طبق نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای فرکشن گل و برگ، مربوط به اسیدهای فنلی موجود در آن‌ها است و بالا بودن میزان رزمارینیک، پارا-کوماریک و کافئیک اسید موجود در آن‌ها می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها را توجیه نماید.

تا به حال مطالعه‌ای بر روی مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره‌ی گیاه *N. macrosiphon* انجام نگرفته است. مطالعه بر روی سایر گونه‌های نپتا از جمله *N. cadmea* و *N. nuda* subsp نشان داده است که عصاره‌های متانولی حاصل از اندام هوایی این دو گیاه فعالیت ضعیفی در مهار آنزیم آلفا-آمیلاز داشتند (Sarikurkcu et al., 2019). لذا، پتانسیل ضددیابتی اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول موجود در اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* از طریق مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم آمیلاز کربوهیدرات‌های پیچیده‌ی موجود در رژیم غذایی را به الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها تجزیه می‌کند که در نهایت توسط آلفا-گلوکوزیداز به مونوساکارید تبدیل می‌شوند (Ortiz-Andrade et al., 2007). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد توانایی بیشتری در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز دارند. این توان مشاهده شده در مهار فعالیت آلفا-گلوکوزیداز توسط اسیدهای فنلی موجود در عصاره‌های این گیاه با مطالعات قبلی روی ترکیبات پلی فنل مطابقت دارد (Matsui et al., 2010; Ranilla et al., 2007; Apostolidis و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که ترکیب زغال اخته با پونه کوهی که دارای محتوای اسید رزمارینیک

بالا تری بود، باعث افزایش فعالیت آن تی اکسیدانی و محتوای فنل کل در عصاره ها شد و نشان دهنده ارتباط بالقوه برای درمان دیابت نوع ۲ است. گزارش Oboh و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که اسید کافئیک و اسید کلروژنیک موجود در *Corchorus olitorius* مسئول پتانسیل ضد دیابتی آن است. اسید رزمارینیک که اسید فنلی متداول موجود در خانواده نعنائیان است در بهبود دیابت و چاقی با مهار آنزیم های گوارشی پتانسیل بالایی دارد. بر اساس گزارش های موجود عصاره ی بادرنجبویه که حاوی اسید رزمارینیک به عنوان یک جزء عمده است، فعالیت آلفا-گلوکوزیداز را مهار می کند و قدرت بازدارندگی آن نسبت به کاتکول و کوئرستین بیشتر است (Kwon et al., 2006). در مطالعه ای دیگر، فرکشن غنی از اسید رزمارینیک به دست آمده از *Orthosiphon stamineus* پنج برابر بیشتر از داروی ضد دیابت acarbose در مهار آلفا-گلوکوزیداز فعال بود و می تواند یک داروی بالقوه برای تنظیم و مدیریت دیابت نوع ۲ باشد (Ngo & Chua, 2018). مطالعات نشان داده اند که مهار این آنزیم توسط ترکیبات فنل تابعی از الگوی خاصی از گروه های هیدروکسی آن ها است که پیوندهای هیدروژنی را با اسیدهای آمینه خاص در مکان های فعال آنزیم ها تشکیل می دهد (De Sales et al., 2012). در نتیجه، طبق نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی انجام شده، می توان نتیجه گرفت که ترکیبات فنل موجود در فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل، مسئول ایجاد خاصیت بازدارندگی بالای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز است و بر اساس مطالعات پیشین رزمارینیک اسید موجود در این فرکشن اصلی ترین عامل ایجاد این خاصیت است.

بنابراین، بر اساس نتایج به دست آمده، گل گیاه *N. macrosiphon*

دارای بیشترین ترکیبات فنل از جمله اسید رزمارینیک و اسید پارا-کوماریک

است و با توجه به اینکه فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد این اندام از پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برخوردار است، لذا گل این گیاه می‌تواند 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.

فهرست منابع

- Akdeniz, M., Ertas, A., Yener, I., Firat, M., and Kolak, U. (2020). Phytochemical and biological investigations on two *Nepeta* species: *Nepeta heliotropifolia* and *N. congesta* subsp. *cryptantha*. *Journal of Food Biochemistry*, 44(2): e13124.
- Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Shetty, K., Apostolidis, E., and Kwon, Y.I. (2006). Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(3), 433–441.
- Aras, A., Bursal, E., and Dogru, M. (2016). UHPLC-ESI-MS/MS analyses for quantification of phenolic compounds of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(11): 9-13.
- Berhow, M.A., Affum, A.O., and Gyan, B.A. (2012). Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims grown in Ghana. *Journal of Medicinal Food*, 15(7): 611-620.
- Dao, T.M.A., Waget, A., Klopp, P., Serino, M., Vachoux, C., Pechere, L., and Séré, E. (2011). Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *PloS One*, 6(6): e20700.
- Dienaitė, L., Pukalskienė, M., Matias, A.A., Pereira, C.V., Pukalskas, A., and Venskutonis, P.R. (2018). Valorization of six *Nepeta* species by assessing the antioxidant potential, phytochemical composition and bioactivity of their extracts in cell cultures. *Journal of Functional Foods*, 45: 512-522.
- Dos Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., and De Souza, G.E.P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11): 2236-2240.
- Gao, H., Huang, Y.N., Xu, P.Y., and Kawabata, J. (2007). Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chemistry*, 105(2): 628-634.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. and Palazo'n, J. (2013). Phenolic Acids. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Hazrati, S., Mollaei, S., Rabbi Angourani, H., Hosseini, S. J., Sedaghat, M., and Nicola, S. (2020). How do essential oil composition and phenolic acid profile of *Heracleum persicum* fluctuate at different phenological stages?. *Food Science and Nutrition*, 8(11): 6192-6206.
- Jamzad, Z. (2012). *Flora of Iran*, vol. 76. *Lamiaceae*. Research Institute of Forests and Rangelands, 1066 pp. Tehran.
- Jamzad, Z., Harley, M.M., Ingrouille, M., Simmonds, M.S.J., and Jalili, A., (2000). Pollen exine and nutlet surface morphology of the annual species of *Nepeta* L.(*Lamiaceae*) in Iran. *Pollen and Spores: Morphology and Biology*, 385-397.
- Jasna, B.N., Milena, R., Ninoslav, D., Branka, V.G., Zora Dajic, S., Stoimir, K., and Zoran, S. (2017). < The> Balkan endemic plant *Nepta rtanjensis* [*Lamiaceae*]: phenolic composition, antioxidant activity and antigenotoxic effects on human lymphocytes treated with triiodothyronine *in vitro*. 929-938.
- Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., and Morgan, L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 579(7): 1653-1657.
- Kiliç, I., and Yeşiloğlu, Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115: 719-724.
- Klick, S., and Herrmann, K. (1988). Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants. *Phytochemistry*, 27(7): 2177-2180.
- Kotowaroo, M.I., Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A., and Subratty, A.H. (2006). Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of mauritius for possible α -amylase inhibitory effects *in vitro*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(3): 228-231.
- Kraujalis, P., Venskutonis, P.R., and Ragazinskiene, O. (2011, May). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from *Nepeta* plant species. In *Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology* (pp. 5-6).
- Krygier, K., Sosulski, F., and Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2): 330-334.

- Kumar, N., and Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24: e00370.
- Kwon, Y.I.I., Vatter, D.A., and Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1): 107.
- Lam, T. B. T., Kadoya, K., and Iiyama, K. (2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57(6), 987-992.
- Lee, J.H., Park, K.H., Lee, M.H., Kim, H.T., Seo, W.D., Kim, J.Y., and Ha, T.J. (2013). Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chemistry*, 136(2): 843-852.
- Lee, S.Y., Lee, C.Y., Eom, S.H., Kim, Y.K., Park, N.I., and Park, S.U. (2010). Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria* L. *Scientific Research and Essays*, 5(10): 1122-1126.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., and Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79(21): 2056-2068.
- Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., and Matsumoto, K. (2007). α -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1): 99-105.
- McCue, P.P., and Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(1): 101-106.
- Moradi-Afrapoli, F., Asghari, B., Saeidnia, S., Ajani, Y., Mirjani, M., Malmir, M., Yassa, N. (2012). In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1): 1-6.
- Mozaffarian, V. (1996). Dictionary of Iranian plant names (Latin, English, Persian). Farhang Moaser Publishers. Search in.
- Nestorović Živković, J., Živković, S., Šiler, B., Aničić, N., Dmitrović, S., Divac-Rankov, A., and Mišić, D. (2018). Differences in bioactivity of

- three endemic *Nepeta* species arising from main terpenoid and phenolic constituents. Archives of Biological Sciences, 70(1), 63-76.
- Ngo, Y.L., and Chua, L.S. (2018). Anti-diabetic activity of rosmarinic acid rich fractions from *Orthosiphon stamineus*. Current Enzyme Inhibition, 14(2), 97-103.
- Oboh, G., Ademiluyi, A.O., Akinyemi, A.J., Henle, T., Saliu, J.A., and Schwarzenbolz, U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. Journal of Functional Foods, 4(2): 450-458.
- Ortiz-Andrade, R.R., Garcia-Jimenez, S., Castillo-Espana, P., Ramirez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., and Estrada-Soto, S. (2007). α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. Journal of Ethnopharmacology, 109(1): 48-53.
- Ranilla, L.G., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., and Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresource Technology, 101(12): 4676-4689.
- Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., and Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 15(1): 141-183.
- Sarikurkcü, C., Eskici, M., Karanfil, A., and Tepe, B. (2019). Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic *Nepeta* species: *Nepeta nuda* subsp. *glandulifera* and *N. cadmea*. South African Journal of Botany, 120: 298-301.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., and Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics, 403(1-2): 136-138.
- Shahidi, F., and Nacsk, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and application. Technomic Publ, Lancaster
- Shahidi, F., Naczsk, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. CRC Press, Boca Raton, FL

- Shetty, K., and Wahlqvist, M. (2004). A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(1): 1–24.
- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., and Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4): 360-363.
- Süntar, I., Nabavi, S. M., Barreca, D., Fischer, N., and Efferth, T. (2018). Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent. *Phytotherapy Research*, 32(2): 185-198.
- Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1): 13-25.
- Wang, M., Jiang, N., Wang, Y., Jiang, D., and Feng, X. (2017). Characterization of phenolic compounds from early and late ripening sweet cherries and their antioxidant and antifungal activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(26): 5413-5420.

تنوع ریختی گونه سیاهماهی باله بلند (*Paracpoeta trutta*) در زیر حوضه‌های بخش ایرانی حوضه آبریز خلیج فارس

زهرا مهربانی^۱، سهیل ایگدری^{۲*}، هادی پورباقر^۳

چکیده

مقدمه: این مطالعه به منظور بررسی تنوع ریختی سیاهماهی باله بلند (*Paracpoeta trutta*) در هفت جمعیت از زیرحوضه‌های بخش ایرانی حوضه خلیج فارس شامل حوضه‌های رودخانه سیروان، زاب کوچک، کارون، گاماسیاب، زمکان، گدارخوش و زهره (تنگ شیو) با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد.

روش‌ها: برای این منظور تعداد ۱۶۱ قطعه ماهی با استفاده از تورگوشگیر و الکتروشوکر نمونه‌برداری شدند. به منظور استخراج داده‌های ریختی در روش هندسی، از سمت چپ جانبی ماهی‌ها عکس گرفته شد و لندهمارک برای آن‌ها تعریف شد. براساس نتایج تحلیل همبستگی کانونی دو جمعیت گدارخوش و زاب کوچک از سایر جمعیت‌ها جدا تفکیک شده‌اند.

نتایج و بحث: براساس نتایج فواصل ماهالانوبیس بین جمعیت‌های مورد مطالعه، بیشترین و کمترین مقدار فاصله ماهالانوبیس به ترتیب بین جمعیت‌های تنگ شیو و گدارخوش و جمعیت سیروان و زمکان بود. آنالیز خوشه‌ای نیز جمعیت‌های گاماسیاب، کارون، سیروان، زمکان و تنگ شیو را در یک شاخه و جمعیت‌های گدارخوش و زاب کوچک را نیز در یک شاخه دیگر قرار داد. نتایج این مطالعه قابلیت انعطاف‌پذیری ریختی این گونه در سازگاری با زیستگاه‌های مختلف در صفات مشابه شامل عمق سر، تنه و دم و همچنین طول سر، خود را با شرایط زیستگاهی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انعطاف‌پذیری ریختی، تحلیل خوشه‌ای، ریخت‌سنجی، سیاهماهی بین‌النهرین.

۱. دانشجوی دکتری بوم‌شناسی آرایان شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. نویسنده مسئول: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. پست

الکترونیکی: soheil.eagderi@ut.ac.ir

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

مقدمه

از مجموع ۳۴ گونه جنس *Paracapoeta*، تعداد ۲۱ گونه در آب‌های داخلی ایران پراکنش دارد (Eagderi et al., 2021). براساس مطالعات قبلی، این جنس به سه گروه شامل آناتولی - ایرانی (گروه سیاه‌ماهی‌های فلس ریز یا *P. damascina*)، آزال - خزر (گروه سیاه‌ماهی‌های فلس درشت یا *P. capoeta*) و بین‌النهرین (گروه سیاه‌ماهی‌های خالدار *P. trutta*) تقسیم می‌شوند (Çiçek et al., 2021). اعضای سیاه‌ماهی‌های بین‌النهرینی در ایران سه گونه سیاه‌ماهی باله بلند (*P. trutta*)، سیاه‌ماهی مُند (*P. mandica*) و سیاه‌ماهی میناب (*P. anamisensis*) را شامل می‌شوند که در حوضه‌های تیگریس، زهره، پرسیس و مکران پراکنش دارند (Esmaeili et al., 2018).

گونه سیاه‌ماهی باله بلند به واسطه داشتن فلس‌های کوچک، دهان مورب زیرین با لبه‌های شاخی، شعاع‌های باله پشتی با ۵-۳ غیرمنشعب و ۹-۷ منشعب، شعاع‌های باله مخرجی با ۳-۲ غیرمنشعب و ۵ منشعب و ۹۰-۶۸ فلس در خط جانبی، ۱۵-۱۸ فلس در بالا و ۱۷-۱۰ فلس در پایین خط جانبی و همچنین داشتن ۳۳-۲۳ خار آبششی و دندان حلقی با فرمول ۴، ۳، ۴-۴، ۳، ۲ با سر قاشقی شکل قابل شناسایی اند (Keivany et al., 2016). سر، بدن و باله پشتی این گونه با نقاط سیاه کوچکی پوشیده شده است که در زمینه نقره‌ای به وضوح قابل مشاهده هستند، هرچند که برخی جمعیت‌ها فاقد این لکه‌ها بوده و یا لکه‌های ضعیفی دارند. پایه باله‌های زیرین نارنجی تا زرد با حاشیه تیره است (Keivany et al., 2016). این گونه دامنه پراکنش بالایی در حوضه خلیج فارس دارد و در حوضه Quwayotu سوریه، Orontes ترکیه، سیستم رودخانه فرات-تیگریس و رودخانه زهره در کشورهای ایران، ترکیه، سوریه و عراق یافت می‌شود (Taghavi Niya et al., 2015). این گونه در دامنه

وسیع‌تری از زیستگاه‌ها شامل نهرها، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و تالاب‌ها زندگی می‌کند و اندازه آن تا ۴۸ سانتی‌متر نیز می‌رسد (Keivany et al., 2016).

شکل بدن جزء مهم ریخت یک موجود زنده است که مستقیماً به ویژگی تغذیه‌ای، شنا و تولیدمثلی آن‌ها مرتبط است (Mouludi-Saleh et al., 2020a; Mouludi-Saleh & Keivany, 2018). از این رو مطالعه تفاوت‌های ریختی بین جمعیت‌های یک گونه، یک ابزار مهم برای درک چگونگی ایجاد تنوع ریختی، زیست‌شناسی تکاملی و تنوع یک موجود زنده است (Seçer et al., 2020; Mouludi-Saleh et al., 2020b). چرا که ریخت یک موجود (خصوصاً ماهی‌های آب شیرین) تحت تاثیر فاکتورهای محیطی و زیستگاهی تغییر می‌کند (Mouludi-Saleh et al., 2020a) و به عنوان انعطاف‌پذیری ریختی شناخته می‌شود. درک تفاوت‌های ریختی می‌تواند به عنوان ابزاری برای درجه تمایز جمعیت‌ها، سازگاری‌های اکولوژیک، انتخاب زیستگاه، تنوع ژنتیکی و ارزیابی رابطه بین ریخت و فاکتورهای زیستگاهی مورد استفاده قرار گیرد (Radkhah et al., 2015; Abbasi et al., 2021).

با توجه به مطالب فوق، مقایسه شکل بدن جمعیت‌های سیاه‌ماهی باله بلند که در نواحی بالادست رودخانه‌ها زیست می‌کنند، می‌تواند به درک الگوهای انعطاف‌پذیری ریختی این گونه برای زیست در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها و دلیل پراکنش بالای این گونه در زیر حوضه‌های آبریز خلیج فارس کمک نماید. همچنین جدایی ریختی جمعیت‌های مورد مطالعه می‌تواند به درک روند سازگاری ریختی که منجر به گونه‌زایی برخی جمعیت‌های ناهمجا این گونه در برخی زیرحوضه‌های خلیج فارس از جمله حوضه‌های مُند و مکران شده کمک نموده و تابلویی از روند تکاملی این گونه را در بین سیاه‌ماهی‌های بین‌النهرینی ارائه دهد. از این رو تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ریختی

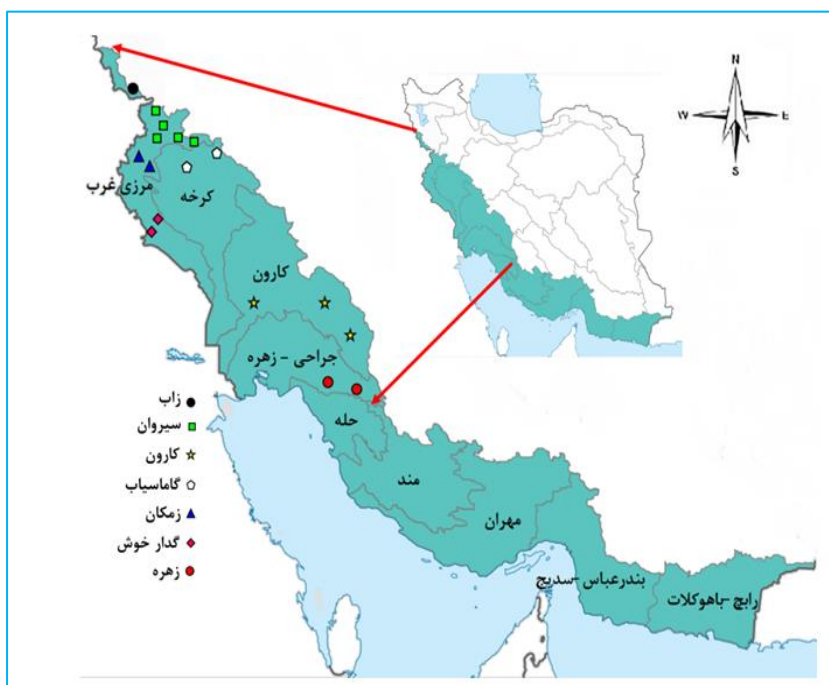
گونه سیاه‌ماهی باله بلند (*Paracpoeta trutta*) در زیرحوضه‌های بخش ایرانی حوضه آبریز خلیج فارس با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد. در روش ریخت‌سنجی هندسی شکل بدن به وسیله نقاط لندمارک استخراج و مورد آنالیز قرار می‌گیرد (Rohlf & Marcus, 1993; Razavipour *et al.*, 2015) و دقت بالایی در آشکارسازی تفاوت‌های ریختی حتی جزئی درون گونه‌ای دارد (Mouludi-Saleh & Mouludi-Saleh *et al.*, 2019; Eagderi, 2021).

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶۱ قطعه ماهی شامل هفت جمعیت از رودخانه‌های سیروان، زاب کوچک، کارون، گاماسیاب، زمکان، گذارخوش و تنگ‌شیو (زهره) با استفاده از تور گوشگیر و الکتروشوکر صید شد (شکل و جدول ۱). نمونه‌ها پس از صید در محلول گل میخک بیهوش و تصاویر دو بعدی از سمت چپ آن‌ها تهیه گردید. نمونه‌ها پس از تثبیت در محلول فرمالین بافری ده درصد، به آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک دانشگاه تهران منتقل شدند. به‌منظور استخراج داده‌های ریختی در روش هندسی تعداد ۱۸ نقطه لندمارک بر روی تصاویر گرفته شده از سمت جانبی نمونه‌ها در نرم‌افزار tpsDig2 تعریف و رقمی‌سازی گردید (شکل ۲). برای حذف اثرات غیر شکل شامل اندازه، جهت و موقعیت، آنالیز پروکراست انجام شد.

داده‌های حاصل به‌منظور بررسی تفاوت‌های ریختی با استفاده از آنالیزهای چند متغیره تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA = Principal Component Analysis)، تحلیل همبستگی کانونی (CVA = Canonical Variate Analysis) براساس ارزش P در تحلیل واریانس چند متغیره

(MANOVA) و تحلیل خوشه‌ای (CA = Cluster Analysis) تحلیل شدند. مقادیر فاصله مایلانوبیس به عنوان درجه تمایز بین گروه‌های مورد مطالعه به دست آمد. رسم الگوهای ریختی میانگین شکل هر جمعیت نیز با استفاده از نرم افزار Morpho J در نمودار قاب سیمی (Wireframe) استخراج شد. تمام آنالیزهای آماری در نرم افزارهای PAST v2.17b (Hammer *et al.*, 2001) و MorphoJ (Klingenberg, 1998) انجام شد.



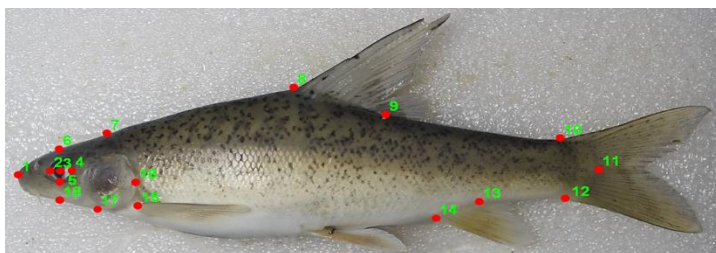
شکل ۱- نقشه ایستگاه‌های نقاط نمونه برداری در بخش ایرانی حوضه خلیج فارس.

Figure 1. Map of sampling stations in Iranian sub-basins of the Persian Gulf.

جدول ۱- اطلاعات ایستگاه‌های نقاط نمونه‌برداری در بخش ایرانی حوضه خلیج فارس.

Table 1. Description of the sites sampled in Iranian sub-basins of the Persian Gulf.

شماره	زیر حوضه	استان - رودخانه	تعداد	کل
جمعیت ۱	سیروان	مریوان - سیروان (پایین تر از سد گاوشان)	۱۵	۴۸
		مریوان - سیروان (قلعه‌چی)	۵	
		مریوان - سیروان (ابراهیم آباد)	۵	
		کردستان - سیروان (هورامان)	۹	
		کرمانشاه - گاوهرود	۱۴	
جمعیت ۲	زاب کوچک	کردستان - زاب کوچک	۱۶	۱۶
جمعیت ۳	کارون	یاسوج - بشار	۷	۱۴
		چهارمحال و بختیاری - کارون	۳	
		خوزستان - کارون	۴	
جمعیت ۴	گاماسیاب	همدان - گاماسیاب (کنگاور)	۳	۱۷
		کرمانشاه - گاماسیاب	۱۴	
جمعیت ۵	زمکان	کرمانشاه - ثلاث باباجانی	۱۴	۲۹
		کرمانشاه - زمکان	۱۵	
جمعیت ۶	گذارخوش	ایلام - گذارخوش	۱۱	۱۵
		لرستان - گذارخوش (سرچم)	۴	
جمعیت ۷	زهره	فارس - تنگ‌شیو	۱۴	۲۲
		کهگیلویه و بویر احمد - دوگنبدان	۸	
جمع کل				۱۶۱



شکل ۲- جایگاه لندمارک‌های تعیین شده بر روی گونه سیاه‌ماهی باله بلند.

۱- ابتدایی‌ترین نقطه پوزه در فک بالا، ۲- ابتدای چشم، ۳- مرکز چشم، ۴- انتهای چشم، ۵- لبه پایین چشم، ۶- قسمت فوقانی سر عمود بر مرکز چشم، ۷- انتهای‌ترین نقطه بالای سر (قفا)، ۸- منشأ قاعده‌ی باله پشتی، ۹- انتهای قاعده‌ی باله پشتی، ۱۰- انتهای بالایی ساقه دم‌ی در محل اتصال به باله دم‌ی، ۱۱- انتهای ساقه دم‌ی (انتهای ستون مهره)، ۱۲- انتهای پایینی ساقه دم‌ی در محل اتصال به باله دم‌ی، ۱۳- انتهای قاعده‌ی باله مخرجی، ۱۴- منشأ قاعده باله مخرجی، ۱۵- ابتدایی‌ترین نقطه‌ی قاعده‌ی باله‌ی سینه‌ی، ۱۶- انتهای‌ترین قسمت سرپوش آبششی، ۱۷- تقاطع شکاف آبششی و ناحیه شکمی و ۱۸- قسمت تحتانی سر عمود بر مرکز چشم.

Figure 2. The defined landmark points for extracting the body shape data of longspine scraper: (1) the anterior-most point of the snout tip on the upper jaw, (2) the anterior-most point of the eye, (3) the center of the eye, (4) the posterior-most point of the eye, (5) ventral edge of the eye, (6) dorsal edge of the head perpendicular to the center of eye, (7) the posterodorsal end of the head (nape), (8) origin and (9) insertion point of the dorsal fin base, (6) posterior dorsal end of the caudal peduncle at its connection to the caudal fin, (11) posterior end of the caudal peduncle (the posterior end of vertebral column), (12) posteroventral end of caudal peduncle at its connection to caudal fin, (13) insertion and (14) origin point of the anal fin base, (15) most anterior point of the pectoral fin, (16) posterior edge of the opercle, (17) ventral end of the gill slit and (14) ventral edge of the head perpendicular to the center of the eye.

نتایج

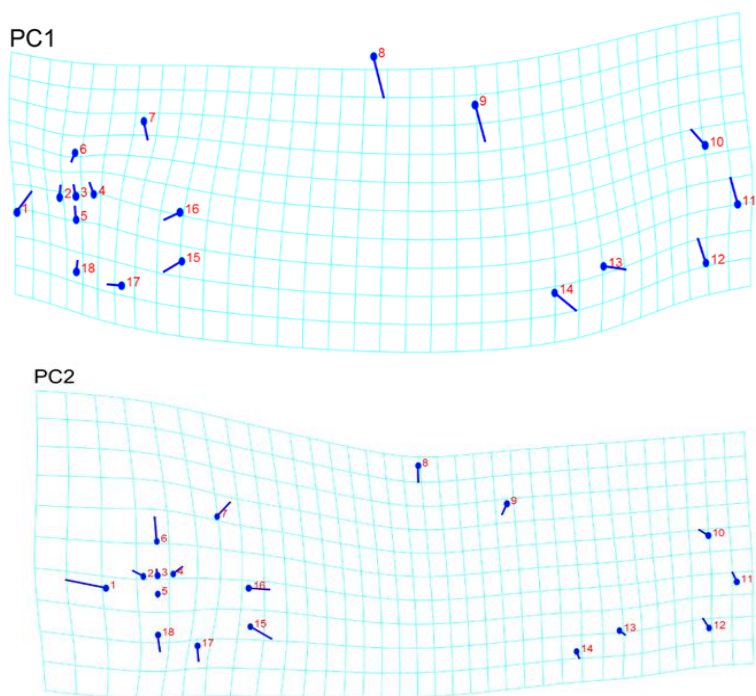
بر اساس نتایج تحلیل مولفه‌های اصلی، پنج مؤلفه به عنوان مولفه‌های اصلی و تاثیرگذار در تفکیک ریختی جمعیت‌های مورد بالاتر از خط برش جولیف (Jolliffe, 2002) قرار گرفتند که مجموع آن‌ها ۷۷/۹۷ درصد واریانس را به خود اختصاص داد (جدول ۲). نمودار تحلیل مولفه‌های اصلی بیانگر همپوشانی

جمعیت‌های مورد مطالعه بود و الگوی تغییر شکل بدن جمعیت‌ها در دو انتهای مولفه اصلی اول و دوم (PC1 و PC2) در شکل ۳ آورده شده است.

جدول ۲- نتایج تحلیل مولفه‌های اصلی

Table 2. The results of principal component analysis.

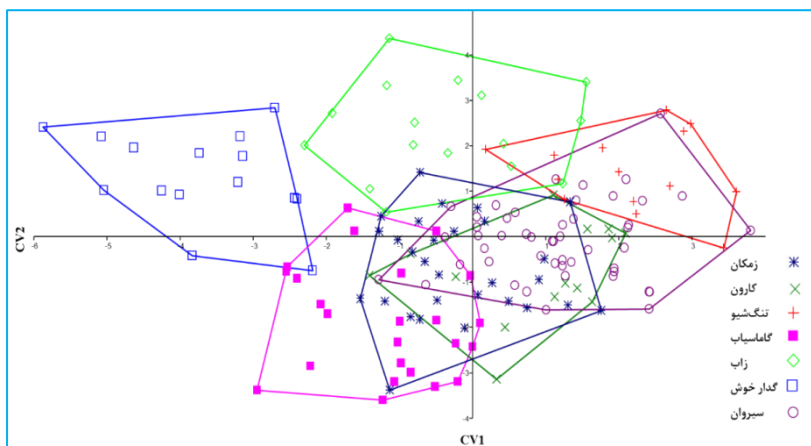
% variance	Eigenvalue	PC
۳۶/۱۳	۰/۰۰۰۳۹	۱
۱۸/۶۰	۰/۰۰۰۲	۲
۹/۷۶	۰/۰۰۰۱	۳
۷/۵۷	۰/۰۰۰۰۸۱۷	۴
۵/۹۱	۰/۰۰۰۰۶۳۹	۵



شکل ۳- تغییرات شکل بدن در جمعیت‌های مورد مطالعه سیاه‌ماهی باله بلند در جهت مولفه‌های اول و دوم.

Figure 3. Body shape variations of the studied longspine scraper populations along the first and second PCA axes.

براساس نتایج تحلیل همبستگی کانونی جمعیت گدارخوش و زاب کوچک از سایر جمعیت‌ها جدا افتاده و جمعیت‌های دیگر نیز تا حدودی از یکدیگر تفکیک شده‌اند (شکل ۴). همچنین نتایج MANOVA، بین شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد (Wilks lambda $= 0.01242$, $f = 4.184$; $P < 1.668E-44$). فواصل مایلانوبیس و پروکراست بین جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. براساس نتایج، بیشترین و کمترین مقدار فاصله مایلانوبیس به ترتیب بین جمعیت‌های تنگ‌شیو و گدارخوش (۶/۱۰۱۶) و جمعیت سیروان و زمکان (۲/۳۹۶۳) به دست آمد.



شکل ۴- نمودار تحلیل همبستگی کانونی (CVA) شکل بدن جمعیت‌ها مورد مطالعه سیاه‌ماهی باله بلند.

Figure 4. Graph of canonical variate analysis of body shape of the studied longspine scraper populations.

جدول ۳- فواصل ماحالانوبیس بین جمعیت‌ها مورد مطالعه سیاه‌ماهی باله بلند.

Table 3. Mahalanobis distances of the studied populations of longspine scraper.

سیروان	کارون	گاماسیاب	زاب کوچک	گذارخوش	تنگ‌شیو	
					۶/۱۰	گذارخوش
				۵/۰۱	۵/۱۶	زاب کوچک
			۴/۷۳	۴/۶۶	۵/۳۳	گاماسیاب
		۳/۵۸	۴/۵۲	۴/۴۷	۴/۳۲	کارون
	۲/۷۳	۳/۳۸	۳/۴۳	۵/۲۱	۴/۱۳	سیروان
۲/۴۰	۲/۸۸	۲/۷۲	۴/۱۳	۴/۳۳	۴/۲۵	زمکان

جدول ۴- مقدار ارزش P حاصل از تست permutation برای فواصل ماحالانوبیس بین

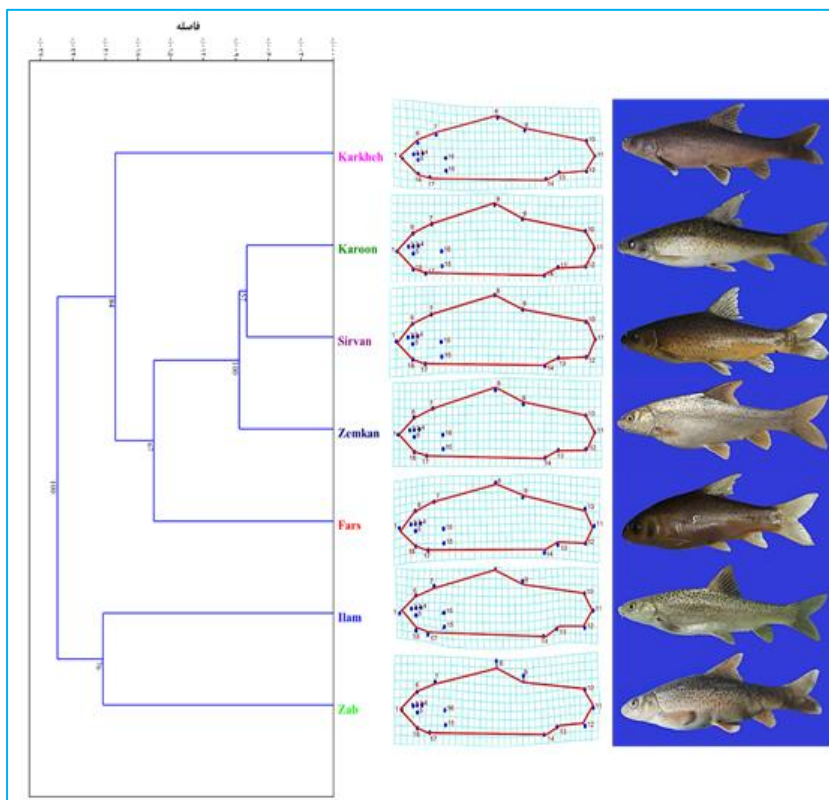
جمعیت‌های سیاه‌ماهی باله بلند.

Table 4. P-value obtained from the permutation test from Mahalanobis distances between the populations of longspine scraper.

سیروان	کارون	گاماسیاب	زاب کوچک	گذارخوش	تنگ‌شیو	
					<۰/۰۰۱	گذارخوش
				<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	زاب کوچک
			<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	گاماسیاب
		<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	کارون
	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	سیروان
<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	زمکان

آنالیز خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه براساس شکل بدن ضریب کوپرنیک ۰/۹۳ داشت که بیانگر همبستگی بالای نمودار است. بر این اساس جمعیت‌های گاماسیاب، کارون، سیروان، زمکان و تنگ‌شیو با ۱۰۰ درخت احتمالی در یک شاخه و جدا از شاخه جمعیت‌های گذارخوش و زاب کوچک قرار گرفته‌اند. میانگین شکل بدن هر جمعیت نسبت به میانگین شکل کل در شبکه تغییر شکل براساس الگوی جابجایی لندمارک‌ها در مقابل هر جمعیت ارائه شده است (شکل ۵).

براساس نتایج، ماهی‌های رودخانه زاب کوچک دارای ساقه دمی و بدن کم عمق نسبت به جمعیت گذارخوش بودند. همچنین، جمعیت گذارخوش دارای سر کوچکتر و کم عمق تر و موقعیت قدامی تر باله سینه‌ای بود. جمعیت رودخانه تنگ‌شیر دارای قاعده باله مخرجی کوتاه‌تر و موقعیت دهانی شکمی تر بودند. به علاوه جمعیت ماهی‌های رودخانه گاماسیاب دارای سری درازتر در مقایسه با دیگر جمعیت‌ها بودند.



شکل ۵- تحلیل خوشه‌ای شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه سیاه‌ماهی باله بلند.
Figure 5. Cluster analysis results of the studied longspine scraper populations' body shape.

بحث

نتایج این مطالعه تمایز شکل بدن جمعیت‌های مختلف سیاه‌ماهی باله بلند در بخش ایرانی حوضه خلیج فارس با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی را نشان داد که بیانگر انعطاف‌پذیری بالای این گونه به شرایط محیطی زیستگاه‌های آن‌ها است. عمده تفاوت‌های مشاهده شده مربوط به تغییرات عمق بدن و ساقه دمی و موقعیت باله‌ها بود، به‌طوری که جمعیت‌های تنگ‌شیو، زمکان، سیروان، کارون و گاماسیاب به واسطه عمق بدن بیشتر در یک گروه و دو جمعیت گدارخوش و زاب کوچک به واسطه سر کوتاه‌تر و عمق دم و بدن کمتر از جمعیت‌های دیگر تفکیک و در شاخه دیگر قرار گرفتند.

Asgardoan و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تنوع ریختی میان جمعیت سیاه‌ماهی (*Paracapoeta trutta*) در رودخانه‌های کنگیر سیاهگل ایلام، گاماسیاب و چم نهشت کردستان بیان کردند که عرض و ارتفاع سر در ناحیه چشمی، فاصله چشم تا انتهای سرپوش آبششی، قطر چشم، طول قاعده باله پشتی، ارتفاع باله پشتی، طول قاعده باله شکمی، ارتفاع باله شکمی، ابتدای باله مخرجی تا نوک پوزه و تعداد فلس‌های ابتدای باله شکمی تا خط جانبی در طول مولفه اول و صفات طول سر، ارتفاع سر در ناحیه چشمی، ارتفاع کمینه بدن، ارتفاع باله پشتی، ارتفاع باله مخرجی و ارتفاع باله سینه‌ای در طول مولفه دوم از صفات اصلی متمایز کننده جمعیت‌ها بود.

در مطالعه‌ای دیگر عرب و کیوانی (۱۳۹۹) در بررسی ریخت‌سنجی هندسی سیاه‌ماهی خالدار (*Paracpoeta trutta*) در رودخانه‌های اهرم، خیرآباد، فهلیان و مند حوضه بوشهر گزارش کردند که بیشترین تفاوت بین جمعیت‌های خیرآباد و فهلیان وجود دارد و عمده تفاوت‌های موجود بین جمعیت‌ها نیز ارتفاع سر، ساقه دمی و بدن بیان شد. هرچند که در این مطالعه

ماهی‌های رودخانه‌های اهرم و مند به اشتباه شناسایی شده و متعلق به گونه سیاه‌ماهی مُند (*P. mandica*) است.

در مطالعه دیگر که در هشت رودخانه از حوضه تیگریس که بر روی سیاه‌ماهی خالدار انجام شد و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب و فواصل جغرافیایی را عامل اصلی تغییرات ریختی مشاهده شده بیان کرده‌اند (Keivany & Arab, 2017). با توجه به شباهت صفات تفکیک کننده مطالعه‌های پیشین با مطالعه حاضر، می‌توان چنین بیان نمود که این گونه عام‌گرا با پراکنش بالا با استفاده از تغییرات ریختی مرتبط با عمق سر، تنه و دم و همچنین طول سر، خود را با شرایط محیطی و زیستگاه مورد پراکنش سازگار می‌کند. تغییرات ریختی در ماهی‌ها به رفتارهای مختلفی از جمله شنا (تغییر در موقعیت باله‌ها)، جلوگیری از شکار و سازگاری با شدت جریان آب (عمق بدن) و رژیم غذایی مختلف (اندازه سر و موقعیت دهان) ارتباط داده شده است (Guill et al., 2003; Nasri et al., 2015). ماهی‌ها با عمق بدن بیشتر خود را از شکار می‌شوند (Ahmadi et al., 2016) و نسبت به محیط‌های ساکن و با جریان کم سازگار می‌گردند (Eagderi et al., 2020).

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که این گونه در زیستگاه‌های مختلف با استفاده از انعطاف‌پذیری ریختی در صفات مشابه شامل عمق سر، تنه و دم و همچنین طول سر، خود را با شرایط زیستگاهی سازگار می‌کند. به علاوه با توجه به الگوی تنوع ریختی جمعیت‌های مورد مطالعه سیاه‌ماهی خالدار، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تفاوت‌های ریختی ارتفاع سر، تنه و دم، طول سر و جایگاه‌های باله‌های مخرجی و سینه‌ای مربوط به قابلیت انعطاف‌پذیری ریختی این گونه جهت سازگاری با ویژگی‌های زیستگاهی است. کاربرد این ویژگی‌های ریختی به عنوان صفات تمایز دهنده آرایه‌شناختی

می‌تواند سبب اشکال در شناسایی آرایه‌های سیاه‌ماهی‌های بین‌النهرینی گردد، بنابراین از کاربرد چنین صفاتی در مطالعات آرایه‌شناختی اجتناب گردد. همچنین با توجه به نتایج، پیشنهاد می‌شود که جمعیت‌های این گونه در هر زیرحوضه به همراه فاکتورهای موثر محیطی مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان بهتر در مورد عوامل موثر بر تمایز ریختی وابسته به زیستگاه اظهار نظر نمود.

در پایان از آقای عطا مولودی صالح جهت همکاری سپاسگزاریم.

فهرست منابع

- Abbasi, K., Mouludi-Saleh, A. & Eagderi, S. (2021). Morphological diversity of the Caspian Asp, *Leuciscus aspius*, in the South Caspian Sea basin (*Osteichthyes: Cyprinidae*). *Zoology in the Middle East*, 67(1), 25-31.
- Ahmadi, S., Eagdari, E. & Javadzadeh, N. (2016). Study of body shape phenotypic plasticity of Carassin (*Carrassius auratus*): case study of Sefidrood River and Alagol Lake. – *J. Wet. Ecobio*, 8, 107-115.
- Arab, M. & Keivany, Y. (2020). Geometric morphometric comparison of Mond trout barb *Capoeta mandica* Bianco & Bianco & Bă nă rescu, 1982 in the Bushehr basin. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 8(2), 1-8. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=808869>. (In Persian)
- Asgardoost, Sh., Noofresti, H., Gozarianpoor, K. & Vatandoust, S. (2013). Morphological diversity of *Capoeta trutta* populations in three rivers of western Iran. *Proceeding of the Second National Iranian Ichthyology conference*. <https://civilica.com/doc/1024201>. (In Persian)
- Çiçek, E., Eagderi, S., Seçer, B. & Sungur, S. (2021). *Capoeta kosswigi* Karaman, 1969 a junior synonym of *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842) (Teleostei: Cyprinidae). *Turkish Journal of Zoology*, 45(3), 235-240.
- Eagderi, S. & Mousavi-Sabet, H. (2021). *Capoeta raghazensis*, a new species of algae-scraping cyprinid from the Raghaz Canyon in Hormuz basin, southern Iran (Teleostei: Cyprinidae). *FishTaxa*, 22, 37-44.
- Eagderi, S., Mouludi-Saleh, A., Ahmadi, S. & Javadzadeh, N. (2020). Phenotypic plasticity of the body shape in Prussian carp (*Carassius gibelio*), in response to lentic and lotic habitats using geometric morphometric technique. *isfj*, 29 (1):49-58
- Esmaili, H. R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. & Abbasi, K. (2018). Checklist of freshwater fishes of Iran. *FishTaxa*, 3(3), 1-95.
- Guill, J.M., Hood, C.S. & Heins, D.C. (2003). Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae). *Journal of Freshwater Ecology*, 12: 134-140.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(4), 1-9.
- Keivany, Y. & Arab, M. (2017). Geometric morphometric comparison of trout barb, *Capoeta trutta* (Teleostei: Cyprinidae) in the Tigris River

- basin. Iranian Journal of Ichthyology 4(3): 220-230.
- Keivany, Y., Nasri, M., Abbasi, K. & Abdoli, A. (2016). Atlas of inland water fishes of Iran. Iran Department Environment Press. 218 p.
- Klingenberg, C.P. (1998). Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. Biological Reviews, 73(1), 79-123.
- Jolliffe, I.T. (2002). Graphical representation of data using principal components. Principal component analysis, 78-110.
- Mouludi-Saleh, A. & Keivany, Y. (2018). Morphological diversity in three species of Chubs (*Squalius* spp.) populations in Iranian Basins. – Nova Biologica Rep. 2018: 192-204.
- Mouludi-Saleh, A. & Eagderi, S. (2021). Habitat-Associated Morphological Divergence of *Gasterosteus aculeatus* in the Southern Caspian Sea Basin. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 45(1), 121-125.
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Cicek, E. & Sungur, S. (2020a). Morphological variation of Transcaucasian chub, *Squalius turcicus* in southern Caspian Sea basin using geometric morphometric technique. Biologia, 75(10), 1585-1590.
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Latif-Nejad, Sh. & Nasri, M. (2020b). Morphological study of transcasian marinka (*Schizothorax pelzami*) in Harirud and Dasht-e Kavri basins using geometric morphometric technique. Nova Biologica Reperta 7: 185-191. (In Persian).
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Poorbagher, H. & Kazemzadeh, S. (2019). The effect of body shape type on differentiability of traditional and geometric morphometric methods: A case study of *Channa gachua* (Hamilton, 1822). European Journal of Biology, 78(2), 165-168.
- Nasri, M., Eagderi, S. & Farahmand, H. (2015). Interspecies morphological variation of *Cyprinion watsoni* (Day, 1872) from southern and southeastern inland water basins of Iran based on Geometric morphometrics method. Journal of Applied Ichthyology, 2: 1-14.
- Radkhah, A., Poorbagher, H. & Eagderi, S. (2016). Investigation of morphological differences of *Capoeta capoeta* populations in the upstream and downstream of Zarinerood River in Urmia Lake Basin. Journal of Animal Environment, 8, 167–174.
- Razavipour, P., Eagderi, S., Poorbagher, H. & Keivany, Y. (2015). Phenotypic plasticity of the Tuini fish, *Capoeta damascina*

- (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in the Iranian part of Tigris basin using geometric morphometric approach. Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology) 28, 170-179.
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. (1993). A revolution morphometrics. Trends in ecology & evolution, 8(4), 129-132.
- Taghavi Niya, M., Javaheri Baboli, M., Roomiani, L., Pazira, A. & Lakzaie, F. (2015). Study on the growth parameters of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) in Shour River, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14(1), 262-274.



Morphological variation of longspine scraper (*Paracapoeta trutta*) in Iranian sub-basins of Persian Gulf

Z. Mehrabani¹, S. Eagderi^{2*}, H. Poorbagher³

Abstract

Introduction: This work was conducted to study the morphological variation of longspine scraper (*Paracapoeta trutta*) in seven populations in the Iranina sub-basins of the Persian Gulf basin, including Sirvan, Little Zab, Karun, Gamasiab, Zemkan, Godarkhosh, and Zohreh (Tang-Shive).

Methods: For this purpose, 161 specimens were sampled using cast-net and electrofishing device. To extract morphological data in the geometric morphometric method, photographs were taken from the left side of the fish, and then 18 landmark-points were digitized on their 2D images.

Results and Discussion: The results of Canonical Variate Analysis showed that Godarkhosh and Little Zab populations are separated from others. Based on the results of Mahalanobis distances between the studied populations, the maximum and minimum distances were between the Tang-Shive and Godarkhosh populations and the Sirvan and Zemkan populations, respectively. Based on the Cluster analysis, the populations of Gamasiab, Karun, Sirvan, Zemkan, and Tang-Shive were clustered together, and Godarkhosh and Little Zab in another one. The results also showed the phenotypic plasticity of this species in adapting to different habitats in traits including depth of head, trunk, and tail as well as head length, based on habitat conditions.

Keywords: Cluster analysis, Phenotypic plasticity, Cluster analysis, Mesopotamian scraper, Morphometrics, Phenotypic plasticity, Mesopotamian scraper.

1.h.D student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2.Corresponding author: Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: soheil.eagderi@ut.ac.ir

3.Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.



Investigation of phenolic acids and some biological activities of *Nepeta macrosiphon*

S. Mollaei^{1*}, H. Abbasi Holasu¹, B. Asghari², M. Ebadi³, H. Hashempour¹

Abstract

Introduction: Phenolic acids are secondary metabolites which have many biological activities, which are found at different organs of plants and have an important role in human health.

Methods: In this study, the extraction from different organs of *Nepeta macrosiphon* was done by using ethanol 80% as solvent, and divided into free and esterified phenolic acids. Then, the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity and inhibition of alpha-glucosidase enzyme of the extracts and also their fractions were evaluated by using Folin-Ciocalteu, aluminum chloride, DPPH, spectrophotometric methods, and finally their compounds were analyzed by HPLC.

Results: The results indicated that the ethanolic extract of flower with the amount of 70.5 mg GAE/g of dry sample, and 29.2 mg QE/g of dry sample had the highest total phenolic and flavonoid, respectively. Also, this extract with the IC₅₀ value of 315.2 showed the highest antioxidant activity. Moreover, the flower extract had a greater ability to inhibit the alpha-glucosidase enzyme. The results of phenolic acids analysis showed that among the studied organs, flower had the highest amount of phenolic acids, rosmarinic acid, para-coumaric acid with the amounts of 672.7 and 614.3 µg/g of sample were the main free phenolic acid, respectively, and caffeic acid was the main compound in the flower extract of esterified phenolic acids. Also, the flower extract containing free phenolic acids had the highest antioxidant activity and inhibition of alpha-glucosidase enzyme in comparison with the extracts containing esterified phenolic acids and other organs.

Conclusion: Based on the results, the flower has the highest phenolic compounds, including rosmarinic, para-coumaric, and caffeic acids and due to its high antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase enzyme, it can be used in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Alpha-glucosidase enzyme; Antioxidant; *Nepeta macrosiphon*; Phenolic acid.

1. Corresponding author: Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of chemistry. Email: s.mollaei@azaruniv.ac.ir Tel: 041314520235

2. Qazvin, Imam Khomeini International University, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Horticultural Sciences Engineering.

3. Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of Biology.



Investigation of hormonal treatments in physiological alterations of Sistan Yaghooti grapes

Noosin Kalkali¹, Abbasali Emamjomeh^{2&1*}, Yasoub Shiri³, Mahmood Solouki¹

Abstract

Introduction: Yaghooti grape is the earliest ripening grape in Iran and has advantages such as good taste and high heat and drought resistance; but it has highly clustered density.

Materials and methods: Physiological alterations of Yaghooti grape in three growth stages, as well as the amount of accumulation of some physiological substances, under the three hormones gibberellic acid, indole-3-acetic acid, and abscisic acid.

Results and discussion: Absciscic acid hormone had the most positive effect on total chlorophyll and carotenoid levels. The average amount of total chlorophyll was equal to (25.51), (18.76) and (26.16) mg/ml in the pre-flowering, flowering, and post-flowering stages, respectively. Under three hormones, the protein level is greatly reduced by 70%, Gibberellin treatment in the third stage of cluster development caused a 26% increase in carbohydrate level. The guaiacol peroxidase increased under indole acetic acid, but other hormonal treatments decreased the amount of this enzyme in Yaghooti grapes. The biggest reduction was related to gibberellin treatment with nearly 80% of the control sample in the first and second stage of cluster development and 55% in the third stage. The amount of ascorbate peroxidase enzyme was accompanied by an upward trend under influence of abscisic acid. Also, all three hormones almost caused a decrease in catalase enzyme activity in all three developmental stages. Indole acetic acid increased the activity of polyphenol oxidase enzyme during stages. Gibberellin, apart from slightly increasing the activity of ascorbate peroxidase enzyme during flowering, strongly reduced the activity of three other enzymes during all stages.

Keywords: Antioxidants, chlorophyll, grapes, phytohormones, plant physiology.

1.M.Sc. graduated, Associate Professor & Professor, respectively; Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB); Faculty of Agriculture; University of Zabol; Zabol; Iran

2.**Corresponding Author:** Associate Professor; Department of Bioinformatics; Faculty of Basic Sciences; University of Zabol; Zabol; Iran. E-mail: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

3.Assistant Professor; Department of Agronomy and Plant Breeding; Agriculture Research Center; Zabol Research Institute; Zabol; Iran.



The origin of chicken PGCs and factors affecting self-renewal in order to their long-term proliferation *in vitro*

Masumeh Zare¹, Seyed Ziaedin Mirhoseini^{2*}, Seyedeh-Nafiseh Hassani³,
Shahrokh Ghovvati¹

Abstract

Introduction: Primordial germ cells (PGCs) are responsible for transmission of genetic information to the next generation by way of producing gametes. PGCs migrate to the developing gonad and undergo an extensive reprogramming during this migration. Once located in the gonad, the developmental pathway leads to the production of germ cell precursors. **Method materials:** One of the main challenges of PGCs is their lack of proliferation and self-renewal in culture condition. One approach to induce proliferation in PGCs is to manipulate intracellular signaling pathways, including TGF- β and Wnt/ β -catenin, via growth factors and small molecules. Moreover, along with activation of involved signaling pathways in self-renewal, improvement in culture conditions can be an effective way to achieve chicken PGC cell line. **Results:** Therefore, establishment of defined culture conditions and activation of the related signaling pathways can lead to induction of proliferation in chick PGCs.

Keywords: Pluripotency, Self-renewal, Primordial germ cells, Long-term culture, Signaling pathway

1 .Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2 .**Corresponding authors:** Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. University of Guilan, 5 km of Persian Gulf Highway, P.O. Box: 4199613776, Rasht, Iran. Tel: +98 13 33690348, Fax: +98 13 33690250, Email: szmirhoseini@gmail.com

3. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.



Investigation of the CuO nanoparticles effect on activity and structure of *Lepidium draba* peroxidase enzyme

A. Riahi-Madvar^{1*}, F. Barzegary-Dehaj², R. Mirzaee³, F. Bahramnejad²

Abstract

Introduction: Entrance of nanoparticles into the environment provides possibility of their entry into living organisms. Their entry into the body can affect biological macromolecules and affect their life. Here, to investigate effect of copper oxide nanoparticle (nCuO) on recombinant *Lepidium draba* peroxidase, changes in enzyme activity and structure were analyzed in presence of nCuO.

Methods: Enzyme activity was measured in the presence of different concentrations of nCuO and repeated three times. Results were statistically analyzed using SPSS software at a significance level of 5 percent. Intrinsic fluorescence studies in the presence of nanoparticles were utilized to investigate structural changes of the enzyme. These studies were done at different temperatures to determine thermodynamic parameters such as the type of forces involved in the nanoparticle-enzyme interaction.

Results and discussion: Enzyme activity in the presence of nCuO significantly increased at the level of 5 percent. The most enzyme activity were attributed to the concentration ranges of 80-180 nM nanoparticles, which it increased more than 46 percent compared to the control. Intrinsic fluorescence intensity decreased in the manner nanoparticles concentrations increased in media. Decrease intrinsic fluorescence emission indicates changes in the enzyme structure in presence of nanoparticle. Thermodynamic parameters including entropy (ΔS°) and enthalpy (ΔH°) related to the interaction of enzyme with nanoparticle were calculated as 0.108 and 3.81 respectively. The positive sign of these parameters indicates the important role of hydrophobic interactions in this process. On the other hand, negativity of free energy (ΔG°) changes indicates that this process is exergonic and proceeds spontaneously.

Keywords: Fluorescence, Hydrophobic interactions, Thermodynamic parameters.

1. **Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran
Email: riahi.ali@gmail.com

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

3. Assistance Professor, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran.

Isolation and purification of petroleum-decomposing bacteria from contaminated soils and identification the resulted compounds of degradation of such compounds

Seyed Afshin Hosseini Boldaji^{1*}, Hamed Soltani², Maryam Teimouri³

Abstract

Introduction: There are various methods to remove oil pollution from natural sources, which biological methods seem to be more appropriate methods due to their cheapness, sustainability and biodegradability. So, the aim of the present study was to isolate and identify the bacteria which able to degrade oil from contaminated soils to determine the optimal conditions for decomposition of these compounds in complementary studies.

Methods: Soil sampling was performed from contaminated areas around the Tehran refinery and after isolating oil-degrading bacteria in a culture medium containing 2% kerosene (as the only carbon source), the ability of separated isolates to oil degradation were evaluated using FTIR and GC-MS. Finally, these isolates were identified using morphological, biochemical and molecular methods.

Results and conclusion: The results showed that, three oil decomposing isolates were able to reduce or eliminate the aromatic compounds from the oil. They decomposed oil complex alkanes into simpler alkanes. So in their culture medium, substances with amine and carboxyl functional groups (organic compounds) were observed. The identification of these three isolates showed that they belong to the species *Nocardia sp*, *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter baumannii*. As conclusion, the use of this biological method can be a good alternative for physical and chemical ones. Isolation of native soil bacteria that have adapted with petroleum products in the soil can be helpful for bioremediation.

Keywords: Aromatic hydrocarbons, Bioremediation, Decomposing bacteria, Oil pollution.

¹. Corresponding author: Department of Biology, Yadegare Imam Khomeini (Rah) Shehre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: Afshin.h.b@gmail.com

². Graduated student of MSc. In Biochemistry, Department of Biology, Yadegare Imam Khomeini (Rah) Shehre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³. Assistant Professor, Research Institute of Forest and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension organization, Tehran, Iran.



A comparative study of inoculation with two growth-promoting and siderophore-producing bacteria (*Enterobacter cloacae* & *Bacillus cereus*) on iron availability in pistachio seedlings (*Pistacia Vera* L.)

F. Bahraminejad¹, F. Nasibi², H. Oloumi³, R. Arab⁴ *

Abstract

Iron deficiency is one of the most important problems that affects the growth of plants. In this study, the effect of two strains of growth stimulating bacteria producing siderophore (*Enterobacter cloacae* & *Bacillus cereus*) on biochemical properties of pistachio seedlings in conditions of availability and deficiency of iron was investigated. In this research, which was done in a factorial design in the form of a completely randomized pattern, ferric iron (Fe^{+3}) and ferrous iron (Fe^{+2}) were given to plants that had grown for two months at a concentration of 20 micromolar. Plants without iron (zero iron) were considered as controls.

The results showed that ferric iron in concentrations of 20 μM and zero iron reduced plant growth and damage to them. By using growth-promoting bacteria in ferric iron-treated plants, some growth parameters such as fresh weight, photosynthetic pigments, phenolic compounds, soluble sugars, lipid peroxidation and proline were improved. Treatment of plants with growth-promoting bacteria also increased the amount of protein in plants treated with ferric iron. Growth-promoting bacteria also increased iron uptake in the shoots of ferric iron-treated seedlings. It seems that in plants treated with ferric iron, growth-promoting bacteria with the production of siderophore led to the reduction of iron and increase the available iron in the plant and reduce iron deficiency stress.

Key words: Ferric iron, Plant growth promoting bacteria, Lipid peroxidation, iron deficiency.

¹.MSc student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.

².Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.

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

⁴.Corresponding author: Instructor, Department of Biology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran. Email: rozaarab.iau@gmail.com.



Effect of chlorine on survival and ultrastructural changes of *Acanthamoeba castellanii*

Zeinab Asadi¹, Somayeh Bahrami^{2*}, Mehdi Zarei³, Hossein Hamidinejat¹

Abstract

Introduction: Chlorine is an effective disinfection agent to kill pathogenic microorganisms in the municipal water treatment system. However, despite treatment, studies have shown that *Acanthamoeba* is isolated from different water sources in Iran. In this study, the effect of standard concentrations of chlorine used in urban water treatment systems was evaluated on the survival of *Acanthamoeba castellanii* and its ultrastructure.

Materials and methods: *Acanthamoeba* trophozoites and cysts were exposed to different concentrations (1-10 ppm) of calcium hypochlorite at different times (30 minutes, 1 and 2 hours). Field emission scanning electron microscopy (FESEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to study the ultrastructural changes of amoebic trophozoite.

Results: This study showed that conventional chlorine concentrations could not completely eliminate *A. castellanii* trophozoites and cysts. Cysts were more resistant to different chlorine concentrations and compared to trophozoites, fewer cysts were killed at the same chlorine concentration and exposure time. Alteration of the cell membrane permeability, decrease in the number of pseudopodia, increase in mitochondria, vacuolation of the cytoplasm, and changes in the endoplasmic reticulum were the main ultrastructural changes in the chlorine-treated amoeba.

Conclusion: This study showed that standard chlorine concentrations used as a disinfectant could not eliminate the trophozoites and cysts of *A. castellanii*. Due to the pathogenicity of the amoeba and its role as the reservoir and transmission of microbial agents, revising the guidelines for using disinfectants such as chlorine in the treatment of urban water systems is highlighted by this study.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, Chlorine, Survival, Ultrastructural changes.

1.Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2.Corresponding author: Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E- mail: s.bahrami@scu.ac.ir

³.Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.



Investigation of some morphological and physiological characteristics of *Cyperus. vera alternifolius*, *Chrysopogon zizanioides* and *Aloe* irrigated with urban wastewater

S. Ebrahimi Nokande¹, S. M. Razavi^{2*}, M. Afshar Mohammadian³

Abstract

Phytoremediation is a cost-effective and environmentally friendly method to remove heavy metals from contaminated soil and the environment and choosing the right plant for phytoremediation is important considering the increasing expansion of urban wastewater. In this regard, an experiment was conducted in the form of a completely randomized design with three replications for 14 months at Guilan University.

In this study, the accumulation index of metals (MAI) including zinc, chromium, lead, copper, manganese, nickel, and magnesium was measured in three plants of *Cyperus alternifolius* L., *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty and *Aloe vera* (L.) Burm.f. treated with urban wastewater, and some of their morphological and physiological characteristics were compared. The results showed that under urban wastewater treatment, the MAI in *C. zizanioides* and *A. vera* was higher than in *C. alternifolius*. In all three studied plants, the indices of root length, shoot length, total biomass, uptake index (UI), and tolerance index (TI) were significantly reduced compared to the control plant, and *A. Vera* had the highest percentage of reduction. Also, the highest percentage of increase in total soluble sugar, total phenol, total flavonoid, total anthocyanin, total tannin, and DPPH radical-scavenging percentage was observed in *C. zizanioides*. Therefore, it can be said that *C. zizanioides* was more successful in terms of metal accumulation and morphological and physiological characteristics.

Keywords: Flavonoid, Heavy metals, Metal accumulation index, Phenol, Phytoremediation.

1 . Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2 .Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: razavi694@gmail.com

3 . Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran.



Numerical Study of *Smilax excelsa* L. in Mazandaran Province

A. Izadkhah¹, A. Mahmoudi Otaghvari² *, T. Amini³

Abstract

Introduction: *Smilax* genus are climbing and dioecious plants which are growing in north of Iran and they have too variation of morphological characters.

Material & Methods: In this study, morphological characters of vegetative and generative organs of 17 population of *Smilax excelsa* from Mazandaran province are studied for the purpose of distinguishing significant characters that effective in segregation of populations. The results were analyzed by SPSS (Ver. 16) software and dendrogram constructed using within group method. In this study there was only *Smilax excelsa* in Mazandaran province.

Results & discussion: The results have shown that characteristics such as Stem diameter, Stipule length and width max, Stipule length max/Stipule width max, Leaf shape, Leaf length and width max, Leaf length max/Leaf width max, Peduncle length, Inflorescent length max, Inflorescent peduncle length, Flower number in inflorescent and Berry length and width max are effective in taxonomic segregation of populations.

Conclusion: The present results showed that there is leaf diversity among the studied populations and characters like Leaf shape, Leaf length and width max, Leaf length max/Leaf width max are variable between populations.

Key words: *Smilax excelsa*, Leaf variation, Morphology, Mazandaran.

1. M.Sc. student of Plant systematics, Department of Botany, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2. **Corresponding author:** Associate Professor of Plant systematics, Department of Botany, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. E-mail: Botany1347@gmail.com

3. Instructor, Nowshahr Botanical Garden, Research Institute of Forest and Rangelands, Agricultural Resources, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

content

	page
1507-Numerical Study of Smilax excelsa L. in Mazandaran Province: <i>A. Izadkhah, A. Mahmoudi Otaghviri, T. Amini</i>	13-42
1511-Investigation of some morphological and physiological characteristics of <i>Cyperus. alternifolius</i>, <i>Chrysopogon zizanioides</i> and <i>Aloe vera</i> irrigated with urban wastewater: <i>S. Ebrahimi Nokande, S. M. Razavi, M. Afshar Mohammadian</i>	43-74
1510-Effect of chlorine on survival and ultrastructural changes of <i>Acanthamoeba castellanii</i>: <i>Zeinab Asadi, Somayeh Bahrami, Mehdi Zarei, Hossein Hamidinejat</i>	75-94
1493-A comparative study of inoculation with two growth-promoting and siderophore-producing bacteria (<i>Enterobacter cloacae</i> & <i>Bacillus cereus</i>) on iron availability in pistachio seedlings (<i>Pistacia Vera</i> L.): <i>F. Bahraminejad, F. Nasibi, H. Oloumi, R. Arab</i>	95-122
1486- Isolation and purification of petroleum-decomposing bacteria from contaminated soils and identification the resulted compounds of degradation of such compounds: <i>Seyed Afshin Hosseini Boldaj, Hamed Soltani, Maryam Teimouri</i>	123-152
1500- Investigation of the CuO nanoparticles effect on activity and structure of <i>Lepidium draba</i> peroxidase enzyme: <i>A. Riahi-Madvar, F. Barzegary-Dehaj, R. Mirzaee, F. Bahramnejad</i>	153-178
1488-The origin of chicken PGCs and factors affecting self-renewal in order to their long-term proliferation in vitro: <i>Masumeh Zare, Seyed Ziaedin Mirhoseini, Seyedeh-Nafiseh Hassani, Shahrokh Ghovvati</i>	179-214
1497-Investigation of hormonal treatments in physiological alterations of Sistan Yaghooti grapes: <i>Noosin Kalkali, Abbasali Emamjomeh, Yasoub Shiri, Mahmood Solouk</i>	215-240
1480-Investigation of phenolic acids and some biological activities of <i>Nepeta macrosiphon</i>: <i>S. Mollaei, H. Abbasi Holasu, B. Asghari, M. Ebadi, H. Hashempour</i>	241-270
1492-Morphological variation of longspine scraper (<i>Paracapoeta trutta</i>) in Iranian sub-basins of Persian Gulf: <i>Z. Mehrabani, S. Eagderi, H. Poorbagher</i>	271-287

Journal of Applied Biology

Spring 2023

Alzahra University – Vice Chancellery for Research.

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

Chief Editor: M. Soudi, Professor of Alzahra University.

Editorial Boards:

- ✚ M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University.
- ✚ H. Ejtehad, Professor of Ferdowsi University of Mashhad.
- ✚ N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
- ✚ F. Darvishi, Professor of Alzahra University.
- ✚ M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University.
- ✚ M. Ranjbar, Professor of Bu Ali Sina University.
- ✚ Saboora, Associate Professor of Alzahra University.
- ✚ 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 RIs.

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

In the Name of God



**The Quarterly Scientific
Journal Of Applied Biology**

Vol.36, No.1, Sering.74, Spring 2023