



مجله زیست‌شناسی کاربردی

بهار ۱۳۹۸

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

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

سردبیر: دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه

دکتر فرشته افتخار، دانشیار دانشگاه شهید بهشتی

دکتر منیژه پاکروان، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عذرا ربانی چادگانی، استاد دانشگاه تهران

دکتر پروین رستمی، استاد دانشگاه تربیت معلم

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر طاهره فلسفی ممقانی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عذرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار فارسی: دکتر پونه سادات پورحسینی

ویراستار انگلیسی: دکتر سید ابوالقاسم قدمی

چاپ و صحافی: انتشارات دانش نگاران اوج

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

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

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست‌شناسی ایران منتشر می‌شود.

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می‌شود: www.Isc.gov.ir

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

۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۷۹۰۱-۲۲۵۱

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

Email: Oolomepaieh@gmail.com

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

هدف

مجله تخصصی زیست‌شناسی کاربردی با نام انگلیسی Applied Biology، نشریه علمی-پژوهشی وابسته به دانشگاه الزهراء، به منظور انتشار نتایج پژوهش‌ها، افزایش آگاهی و ترویج دانش تخصصی در زمینه علوم کاربردی سالی ۴ بار منتشر می‌شود.

موضوعات مرتبط با مجله

مجله مقالاتی که نتیجه‌ی تحقیقات در زمینه‌ی زیست‌شناسی کاربردی است که پس از داوری دقیق به صورت "مقاله کامل" به چاپ می‌رساند.

قوانین نشر

- مقالات ارسال شده به مجله، نباید قبلاً در سایر مجلات چاپ و یا همزمان به مجلات دیگر ارسال شده باشد. مقالاتی که فقط چکیده آنها در مجامع علمی داخلی و خارجی ارائه و چاپ شده‌اند، مستثنی هستند.
- مقالات باید دارای متن کامل فارسی و خلاصه انگلیسی باشند.
- اعضای هیئت تحریریه در پذیرش، عدم پذیرش یا هر گونه ویرایش مقاله، اختیار کامل دارند
- مسئولیت علمی مطالب ارائه شده، به عهده نگارنده (گان) مقاله می‌باشد.
- اسامی نگارندگان می‌تواند تحت نظر نویسنده مسئول تغییر کند.
- مقالاتی که مطابق راهنمای نگارش مقاله تهیه نشوند، به نگارندگان عودت داده می‌شوند.
- مقالات دریافت شده پس از داوری توسط داوران تخصصی و پذیرش علمی از سوی اعضای هیئت تحریریه، با رعایت نوبت به چاپ می‌رسند.

پیش از ارسال مقاله حتماً به نکات زیر توجه فرمایید:

- مقاله به زبان فارسی پذیرفته خواهد شد.
- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله (<http://jab.alzahra.ac.ir>) به دبیرخانه ارسال شود. مقالاتی که از طریق به جز سایت ارسال شوند، در جلسه هیئت تحریریه بررسی نخواهند شد. تمامی مراحل داوری نیز از طریق سایت مجله قابل پیگیری است.
- نگارندگان همزمان با ارسال مقاله، فرم تعهدنامه را در سایت مجله، تکمیل و پس از امضای تمام نگارندگان و اسکن فرم، آن را به همراه مقاله از طریق سایت مجله ارسال نمایند.
- در مقاله‌های ارسالی باید تمامی نکات مربوط به شیوه صحیح نگارش از جمله اصول نقطه گذاری، رسم جدول، شکل، نوشتن منابع و ... به دقت رعایت شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی باشد، این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد (استادان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
- به دانشجویان محترم توصیه می‌شود پیش از ارسال مقاله، از استاد راهنمای خود تقاضا نمایند که آن را مطالعه و کاستی‌های آن را رفع نمایند.

- در متن مقاله، اعداد صفر تا نه به حروف و اعداد ۱۰ به بالا به عدد نوشته شوند (به استثنای اعداد جداول، شکل‌ها، شماره منابع و شماره گذاری فرمول‌ها).
- در متن مقاله، علامت % با کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جدول‌ها و شکل‌ها که علامت % در سمت چپ اعداد قرار گیرد).
- در متن مقاله (بجز جداول، شکل‌ها و چکیده انگلیسی که بر اساس سال میلادی بیان شوند)، اگر مقاله فارسی است سال شمسی، و اگر مقاله انگلیسی است سال میلادی باید باشد.
- اسامی علمی (از جمله نام گیاهان، جانوران، میکروب‌ها) باید بر اساس سیستم دوفامی طبق جدیدترین طبقه بندی‌های سیستماتیک و با حروف ایتالیک نوشته شوند. این اسامی در عنوان و چکیده بدون ذکر نام‌گذار (author) درج شوند، اما در متن، آنجا که برای اولین بار ذکر می‌شود، همراه ذکر مخفف نام‌گذار (به عنوان مثال L. به معنی Linnaeus) و به صورت غیر ایتالیک نوشته شوند و در صورت تکرار در متن، دیگر به نام‌گذار اشاره نشود. اسم نام‌گذار باید طبق استانداردهای مربوطه نوشته شود.
- میان کلمه و نقطه (.)، کاما (،)، علامت سوال (؟) و پرانتز () فاصله نباشد و بعد از این علامت‌ها یک فاصله (Space) منظور شود.
- در نگارش مقاله تا حد امکان، از واژه‌های فارسی استفاده شود.
- در موارد ضروری، اصطلاح خارجی در متن مقاله به زبان فارسی نگاشته و خواننده به زیرنویس (Footnote) صفحه که واژه مورد نظر به زبان اصلی نوشته شده، هدایت شود. عدد هر زیرنویس در قسمت بالا و سمت چپ زیرنویس مربوطه و با قلم Times New Roman 10 نازک درج شود. اعداد زیرنویس در هر صفحه از عدد ۱ آغاز شوند.
- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). در صورتی که منبع مورد استفاده دو نگارنده داشته باشد، نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001). در منابع با بیش از دو نگارنده، تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al.* و سپس سال انتشار ذکر شود (Fernandes *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 (1953, Petrak) معتقد است..... و یا به اعتقاد شیمی و همکاران (Shimi *et al.*, 2005).
- *et al.* واژه‌ای لاتینی است و حتماً باید ایتالیک و به نقطه ختم شود.
- متن مقاله با نرم افزار Microsoft Word 2007 و با پسوند *.doc تهیه شود.
- مقاله به صورت الکترونیک روی کاغذ سفید به ابعاد 21×29.7 سانتی‌متر (A^4) با حاشیه $2/5$ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن $1/5$ (به جز جداول، شکل‌ها و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم شماره گذاری شود و در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
- تعداد صفحات قابل قبول مقاله، حداکثر ۱۵ صفحه می‌باشد. شماره هر صفحه در وسط و پایین صفحه و با قلم نازنین معمولی و فونت ۱۲ باشد.
- قلم فارسی مورد استفاده، نازنین و قلم انگلیسی Times New Roman باشد. منظور از قلم توپر، Bold و قلم نازک، غیر Bold است.
- اندازه قلم انگلیسی در تمام موارد، دو سایز از قلم فارسی کوچکتر است.
- ابتدای هر پاراگراف به صورت تورفته (Indent) به اندازه $1/27$ سانتی‌متر باشد.

تدوین مقاله با شرح جزییات

- عناوین اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و Abstract انگلیسی.
- عناوین اصلی فارسی: راست چین، ۱۴ توپر، انگلیسی: چپ چین، ۱۲ توپر

- پس از عناوین اصلی، نیازی به استفاده از دو نقطه (: نیست. مانند مقدمه (نه مقدمه):).
- سایر عناوین، عناوین درجه دوم و سوم محسوب می‌شوند.
- پس از عناوین اصلی و درجه دوم، ادامه متن از سطر جدید آغاز شود. اما عناوین درجه سوم، با دو نقطه (: از مطلب جدا شوند.
- تمام عناوین اعم از اصلی، درجه دوم و سوم، توپر باشند.
- ۱- عنوان مقاله: فارسی: وسط چین، ۱۴ نازنین توپر، انگلیسی: وسط چین، Times new Roman ۱۲ توپر
- ۲- نام نگارندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ توپر، با ویرگول از هم جدا شوند. شماره هر نگارنده، ۱۱ توپر در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)، درج علامت ستاره (*) در سمت راست و بالای (superscript) نام نگارنده مسئول مکاتبه، انگلیسی: ۹ توپر با ویرگول از هم جدا شوند. قبل از آخرین نگارنده از حرف ربط and استفاده شود. شماره هر نگارنده در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)،
- ۳- آدرس نویسندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ نازک، انگلیسی: وسط چین، ۹ نازک در پاورقی
- ۴- چکیده: فارسی: ۱۲ نازک و ایتالیک تنها در یک پاراگراف، حداکثر ۳۰۰ تا ۳۰۰ کلمه، فاقد علائم اختصاری مبهم. پس از ذکر اهمیت موضوع در یک سطر، اشاره‌ای به اهمیت پژوهش، روش و نتایج شود. انگلیسی (Abstract): ۱۲ نازک و تنها در یک پاراگراف، ترجمه دقیق و علمی چکیده فارسی، فاقد علائم اختصاری مبهم
- ۵- واژه‌های کلیدی: فارسی: (۱۲ توپر و ایتالیک)، انگلیسی (Key words): (۱۰ توپر).
- واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی، کلمات مشترکی با عنوان مقاله نداشته باشند، به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.
- ۶- مقدمه: ۱۲ معمولی، محتوی بررسی منابع کامل با تاکید به آن موضوع خاص وبا استناد به جدیدترین منابع، اشاره دقیق به اهمیت تحقیق و هدف بررسی.
- ۷- مواد و روش‌ها: ۱۲ معمولی، توضیح دقیق مواد و روش‌ها از جمله محل و سال اجرای تحقیق، محل جمع آوری نمونه، شرح دقیق روش کار. در صورت استفاده از روش‌های متداول، نیازی به ذکر کامل روش نیست و تنها به منبع مورد استفاده اشاره شود.
- ۸- نتایج و بحث: ۱۲ معمولی، به جدیدترین منابع مرتبط با آن موضوع اشاره شود. تحلیل کاملی از نتایج انجام و نتایج حاصل از آزمایش با نتایج سایر پژوهش‌ها مقایسه شود.
- برای بیان اوزان و مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
- نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها
- استفاده از جدول و شکل تنها هنگامی مجاز است که نتوان اطلاعات بدست آمده (نتیجه) را براحتی بیان کرد.
- عنوان جدول و شکل باید گویا باشد به نحوی که نیاز به مراجعه به متن مقاله نباشد. علائم اختصاری یا زیرنویس‌ها در پایین جدول یا شکل معرفی شوند.
- داده‌ها یا بصورت جدول و یا شکل نمایش داده شوند، یعنی داده‌هایی نباشند که به هر دو صورت شکل و جدول ارائه شوند.
- شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند، بصورت سیاه و سفید، با بافت ساده طراحی و شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند، بدون سایه و با کیفیت بالا، ارسال شوند.
- در هر قسمت که به یک جدول یا شکل اشاره می‌شود، حتی المقدور بلافاصله ارائه شوند و ارائه آنها به صفحات بعد موکول نشود.
- ابعاد جدول یا شکل طوری تنظیم شود که حداکثر در یک صفحه مجله جا بگیرد.
- جدول با ۳ خط افقی رسم شود. (دوخط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول) و بقیه خطوط عمودی و افقی غیر فعال شوند.

- تمامی اعداد و متن درون جداول و شکل‌ها، انگلیسی (وسط چین، ۱۰ نازک) باشد. اعداد در صورت اعشاری بودن، تنها تا دو رقم اعشار ادامه داشته باشد.
- عنوان جدول (در بالای جدول) و شکل (در پایین شکل) به زبان فارسی باشد. عنوان وسط چین ۱۱ توپر (Bold)
- زیرنویس و علائم اختصاری زیر جداول و شکل‌ها، فارسی نازنین ۸ نازک باشد.
- شکل‌ها در جای مناسب در متن ارائه شود.
- کادر اطراف شکل‌ها حذف شود.
- ۹- سپاسگزاری: اختیاری است، نازنین ۱۲ معمولی.
- ۱۰- منابع: ۱۲ معمولی.
- تمام منابع پایان مقاله، بدون شماره باشند، بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشند.
- عنوان مجله‌ها کامل نوشته شوند.
- (برای استفاده از نام‌های اختصاری استاندارد یا کامل مجلات علمی، به سامانه مجلات مربوطه مراجعه شود .
- بین حروف اختصاری نام‌های اول یک نگارنده، فاصله نباشد (مثال: A.D.C).
- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده اند، به جای ذکر سال، از عبارت in press استفاده شود.
- بر حسب نوع منبع، فقط مطابق الگوی زیر عمل و حتماً به علائم جداکننده و ویرایشی توجه شود.

نشریات

- الف) با یک نویسنده: نام خانوادگی، نام (ها). (سال انتشار) عنوان مقاله. عنوان نشریه، جلد (شماره): شماره صفحات.
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: مشابه بالاست، جز این که بعد از نام کوچک نویسنده اول، ویرگول بیاید.
Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998) Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posmergrnce herbicides. Weed Technology 3: 424-428.

کتاب

- الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار) نام کتاب. ناشر، تعداد صفحات.
- ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار)، نام کتاب، ذکر تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک استو سپس شهر محل انتشار.
Ahrens, W.H. (1994) Herbicide Handbook. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America Pp 224 . los Angeles.
- ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود.
-مقاله‌ای در یک کتاب: نام خانوادگی، نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفحات 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، نام (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام

همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور.

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

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

Shimi, P. (2003) Management of *Cynanchum acutum* in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institute of Plant Protection 25 Pp.

-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/michelm/summary.htm>. Accessed August 23, 2001.

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

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

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

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

زیست‌شناسی کاربردی

بهار ۱۳۹۸

صفحه

فهرست

بررسی مراحل تولیدمثل و میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی *Onychoprion anaethetus* در جزیره قبرناخدا در سال ۱۳۹۴

بهرروز بهروزی راد ۹

تاثیر اتانل بر تولید پیگمان‌ها در *Chlorella sorociniana* در شرایط اتوتروف

زهرآ خلیلی، حسن جلیلی، مصطفی نوروزی ۲۴

بررسی میزان تحمل گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) به تنش کروم بر اساس رشد، شاخص های فتوسنتز و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

راهله رهباریان، الهام عزیزی، آسیه بهداد، آتنا میربلوک ۳۴

بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در سه ژنوتیپ *Lolium perenne* تحت تنش خشکی

فرزانه ترکش اصفهانی، لیلا شبانی، محمد رضا سبزیعلیان ۵۸

عادات غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری

مسیب عالی‌پور، یزدان کیوانی، عیسی ابراهیمی ۷۷

بهینه سازی رشد و تولید آنزیم کاتالاز در باکتری *Kocuria sp. ASB 107* در محیط کشت های اقتصادی

عزت عسگرانی، الهام گودینی، جمشید فولادی ۱۰۰

اثر آب مغناطیده بر روی اندام های رویشی و روزنه گیاه عدس (*Lens culinaris L.*)

نفیسه عظیمی، احمد مجد، فائزه فنانی، صدیقه اربابیان، طاهر نژادستاری ۱۱۰

ارزیابی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی-آبی و متانولی پوست نارنج

مهسا مایلی، حسین تاجیک، تورج مهدی‌زاده، فاطمه اسماعیلی ۱۲۱

جداسازی و شناسایی میکسوباکتر تولیدکننده *Myxothiazol* و *Althiomycin* از خاک ایران

اعظم مرادی، محمد یعقوبی اوینی، غلامحسین ابراهیمی پور، علیرضا قاسم پور ۱۳۶

- مکانیسم اثر بازدارندگی کافئین چای ایرانی بر سینتیک سیگموئیدی فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز
 رویا مهین پور، مجید قاسمی، سیده زهرا موسوی نژاد، زهره زهرایی..... ۱۵۱
- برخی ویژگی های زیست شناختی و بوم شناختی میش مرغ در کشور با تاکید بر وضعیت به شدت بحرانی
 گونه
 مرتضی نادری..... ۱۶۳
- بررسی تاثیر یک دوره تمرین های هوازی و مصرف دارچین بر برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی در زنان
 فعال
 حمیده نخعی، پروانه نظرعلی، پریچهر حناچی، مهدی هدایتی..... ۱۷۸
- بررسی تغییرات درون گونه ای مورفومتزیک جمجمه خرگوش غربی (*Lepus europaeus*) در استان های غربی
 ایران
 فرزاد هوشیار، سحر رضائی، حمیدرضا رضایی، حمیدرضا کبیری بالاجاده..... ۱۹۳

بررسی مراحل تولیدمثل و میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی

Onychoprion anaethetus در جزیره قبرناخدا در سال ۱۳۹۴

بهرروز بهروزی راد^{*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

چکیده

بررسی مراحل تولیدمثل و میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی *Onychoprion anaethetus* (Scopol 1876) در جزیره قبرناخدا از فروردین تا شهریور ۱۳۹۴ انجام شد. در ۱۴۲ آشیانه منتخب میانگین قطر بزرگ آشیانه ها $23/23 \pm 0/42$ ، میانگین قطر کوچک آشیانه ها $19/08 \pm 0/29$ و میانگین عمق آن ها $3/07 \pm 0/17$ سانتیمتر تعیین شد. میانگین قطر بزرگ تخم ها $43/43 \pm 0/23$ ، میانگین قطر کوچک $31/11 \pm 0/15$ میلی متر، وزن تخم ها $21/98 \pm 0/35$ گرم و میانگین حجم تخم ها $45/2 \pm 0/12$ میلی متر مکعب تعیین شد. شاخص شکل تخم ها بیضوی و میانگین آن $71/63 \pm 3/09$ تعیین شد. میانگین دوران تفریح $18/5 \pm 1/5$ روز تعیین شد. میانگین موفقیت در مرحله آشیانه نشینی جوجه ها (nestling)، $92/60$ درصد، در مرحله ترک آشیانه جوجه ها (Post-nestling) $91/44$ درصد و میزان موفقیت کل جوجه آوری $73/94$ درصد تعیین شد. بیشترین میزان تلفات در مرحله ترک آشیانه (Post-nestling) 12 درصد و کمترین تلفات در مرحله تخم 5 درصد بود.

واژه‌های کلیدی: پرستو دریایی پشت دودی، موفقیت تولیدمثل، جزیره قبرناخدا، Post-Nestling

مقدمه

زیستگاههای جوجه آوری پرندگان به‌عنوان زیستگاههای حساس، جهت آگاهی از پویایی جمعیت گونه های پرندگان زادآور محسوب شده و منعکس کننده شرایط مطلوب زیستگاهی هستند (Symens, 1996; Blaber et al., 1998). در ایران ۱۰۵ منطقه به‌عنوان زیستگاههای حساس جوجه آوری و زمستان گذرانی پرندگان در (Birdlife International) ثبت شده است (Evans, 1994). جزیره قبرناخدا در خورموسی جزو این ۱۰۵ منطقه بوده و برای جوجه آوری پرستوهای دریایی از جمله پرستو دریایی پشت دودی حساس و مهم است (بهرروز راد، ۱۳۸۷a و ۱۳۸۷b; Scott, 1995; 2007; 2008).

۱- گروه محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی اهواز، اهواز، ایران
(نویسنده مسئول: behrouzirad@yahoo.com)

کلنی زندگی و در جزایر تولید مثل می‌کند (Stanley *et al.*, 1983; Symens, 1996; Scott, 1985) و گونه‌های ماهی خوار است (Cramp *et al.*, 2008; Behrouzi-Rad, 2007).

اولین بار جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی از جزیره قبرناخدا در سال ۱۹۷۰ گزارش شده است (Scott, 2007; 2008); از آن پس جوجه آوری این گونه در جزیره قبرناخدا همه‌ساله گزارش شده است (اداره کل حفاظت محیط‌زیست خوزستان، ۱۳۹۲). علاوه بر جزیره قبرناخدا در سایر جزایر خلیج فارس، از جمله جزایر شیدور، دارا، بنی فارو، بونه، ام‌الکرم و نخیلو، نیز تولیدمثل میکند (Scott, 1995; Behrouzi-Rad, 2014a). مهم‌ترین مشخصات شناسایی پرستو دریایی پشت دودی از سایر پرستوهای دریایی، رنگ دودی پشت، نوار سفیدروی پیشانی، سطح شکمی سفید و دم دوشاخه آن است (شکل ۱) (اسکات و همکاران، ۱۳۵۲؛ بهروزی راد، ۱۳۸۷b). این گونه با معیارهای موسسه بین‌المللی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (International Union Conservation Nature and Natural Resources (IUCN) در خطر انقراض نیست و در فهرست سرخ IUCN ثبت نشده است (IUCN, 2010). در ایران غیر حمایت شده است و جمعیت وافری دارد (قوانین و مقررات سازمان حفاظت محیط‌زیست، ۱۳۷۹؛ بهروزی راد، ۱۳۸۷b). پرستوی دریایی پشت دودی بر روی زمین، در زیر سایه گیاهان، بوته‌های کوچک آشیانه سازی و تخم‌گذاری می‌کند (حسینی طایفه، ۱۳۸۴؛ بهروزی راد، ۱۳۸۷b؛ Meininger & Verkerk, 1998). ساختمان آشیانه ساده و بدون مواد خاص بوده و به صورت گودالی کم‌عمق است (بهروزی راد، ۱۳۸۴؛ حسینی طایفه، ۱۳۸۴؛ Cram *et al.*, 1985). یک تخم و گاهی نیز بندرت ۲ تخم می‌گذارد. اندازه تخمها (۳۳ تا ۲۹ × ۴۶ تا ۴۰ میلی‌متر) و وزن متوسط آن ۲۲ تا ۲۰ گرم گزارش شده است. دوران تفریح ۲۸ تا ۳۰ روز بوده و مراقبت از تخمها توسط هر دو جنس انجام می‌گیرد (حسینی طایفه، ۱۳۸۴؛ اسکات و همکاران، ۱۳۵۲؛ Blaber Cramp *et al.*, 1985; *et al.*, 1998). جوجه‌ها نیمه-زودرس (Semi-precocial) بوده و مدت‌زمان اندکی را در آشیانه می‌گذرانند، سپس آشیانه را ترک و در سواحل جزیره در کنار آب به وسیله هر دو والدین مراقبت و تغذیه میشوند. مدت‌زمان پروازی شدن جوجه‌ها ۶۰-۵۵ روز است (Behrouzi-Rad, 1996; Symens, 1996; Losif, 1989; Falsola, & Canova, 1991; Cramp *et al.*, 1985). هدف از این مطالعه، تعیین مراحل مختلف تولیدمثل و میزان موفقیت زادآوری پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا بود. چون هرچه میزان موفقیت گونه بیشتر باشد، حاکی از وضعیت مناسب زیستگاه جوجه آوری است و برعکس (Behrouzi-Rad, 2014b; Meininger & Verkerk, 1998; Losif, 1989). برای پی بردن به وضعیت شرایط محیط‌زیست جزایر، سنجش میزان موفقیت در زادآوری پرندگان آبی که یکی از بهترین شاخصها می‌باشند، ضروری است (Wang, 2011). چون مراحل مختلف تولیدمثل پرندگان از حساسترین مرحله زندگی آنها است و شرایط زیستگاهی می‌تواند در بقاء و یا انقراض نسل آنها نقش اساسی داشته باشد.

به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی میزان موفقیت جوجه آوری پرستودریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا برای آگاهی از وضعیت زیستگاهی جزیره و میزان موفقیت زادآوری این گونه به منظور استفاده در مدیریت جزیره قبرناخدا بود که مورد نیاز اداره حفاظت محیط زیست ماهشهر و اداره کل حفاظت محیط زیست استان خوزستان است.



شکل ۱: پرستودریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا، (بهروزی راد، ۱۳۹۴)

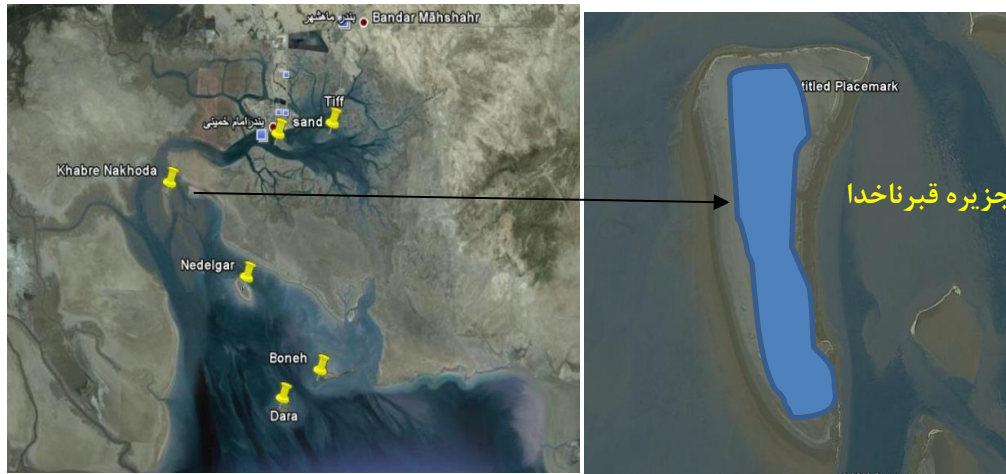
مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه

جزیره قبرناخدا در خور موسی در استان خوزستان در جوار شهر ماهشهر در موقعیت جغرافیایی ۳۰ درجه ۲۰ دقیقه و ۲۶ ثانیه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۵۵ دقیقه و ۵۳ ثانیه طول شرقی قرار دارد (اداره کل حفاظت محیط زیست خوزستان، ۱۳۹۲؛ بهروزی راد، ۱۳۸۷a). مساحت آن در زمان مد ۳ هکتار و در زمان جزر به ۵۰۰ هکتار میرسد (Behrouzi-Rad, 2014a). در وسط جزیره مقبره ناخدا قرار دارد (شکل ۲) که جزیره نیز به همین نام شناخته شده است. بخشهایی که در زمان مد زیر آب میروند و در زمان جزر از زیر آب بیرون می آیند، گلی و فاقد پوشش گیاهی است (شکل ۲). مساحت دائمی جزیره ۳ هکتار است و حدود ۴۰ درصد آن پوشیده از گیاه است. تراکم گیاهی با روش پلات گذاری شناسایی و اندازه گیری شده است. گونه های گیاهی موجود شامل (*Atriplex leuoclada*, *Stipa capensis*, *Suaeda fruticosa*, *Halostachys belangeriana*, *Calanderula persica*, *Malva sp*, *Cistanche tubolusa*). *Suaeda fruticosa* بود (اداره کل حفاظت محیط زیست، ۱۳۹۲؛ Behrouzi-Rad, 2013a). پرستودریایی پشت دودی در زیر این گونه های گیاهی آشیانه می سازد (Behrouzi-Rad, 2013a; 2013b). شکل ۲ جزیره قبرناخدا و شکل ۳ محدوده آشیانه سازی گونه را در آن جزیره نشان میدهند.



شکل ۲: نمای جزیره قبر ناخدا (عکس بهروزی راد، ۱۳۹۴)



شکل ۳: محدوده جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبر ناخدا (Google Earth 2015)

برآورد جمعیت جوجه آور پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبر ناخدا

جزیره با (GPS) مدل (Garmin 72H) سه هکتار تعیین شد. آشیانهها با روش تمام شماری (Total Count) در این سه هکتار شمارش شدند (Evans, 1994; Scott, 2008; Behrouzi-Rad, 2007; 2014b). از ابتدای جزیره در بخش پوشش گیاهی تا انتهای آن زیر سایه تمام بوته ها بررسی و در صورت وجود آشیانه تعدادشان یادداشت شد.

چون هر آشیانه به دو پرستو دریایی (نر و ماده) تعلق دارد تعداد آشیانه های شمرده شده در ۲ ضرب شدند مساحت (Eduardo & Lucía, 2005; Behrouzi-Rad, 2014a Losif 1989) و جمعیت جوجه آوری تعیین شد. سپس از بین آن ها ۱۴۲ آشیانه که امکان مشاهده و پیگیری چگونگی تفریح تخمها و رشد جوجه ها وجود داشت، انتخاب شدند. هر آشیانه به وسیله شاخص چوبی کوچک که رنگ شده بودند، کدگذاری شد. در آشیانه های انتخاب شده کلیه مراحل شروع تخم گذاری، مدت زمان خوابیدن روی تخمها با مشاهده مستقیم یادداشت شد.

پارامترهای آشیانه شامل، طول یا قطر بزرگ، عرض و یا قطر کوچک و گودی آشیانه در عمیق ترین قسمت توسط خط کش فلزی با دقت یک میلی متر اندازه گیری شد (Meininger & Verkerk, 1998; Eduardo & Lucía, 2005). به دلیل اهمیت سایه برای ممانعت از تابش مستقیم خورشید بر روی تخم ها و جوجه های تازه متولد شده و وابستگی شدید جوجه آوری به سطح سایه، جهت جغرافیایی آشیانهها نیز ثبت شد. بدین منظور ابتدا در بخش جوجه آوری جهت ۸ گانه اصلی و فرعی جغرافیایی شامل N, NE, NW, E, S, SE, SW, W با قطب نما مشخص و سپس مکان قرارگیری آشیانهها با جهات جغرافیایی مشخص و ثبت گردید (جسینی طایفه، ۱۳۸۴). پس از تخم گذاری، پارامترهای قطر بزرگ یا طول تخم، قطر کوچک و یا عرض تخم، توسط کولیس و وزن تخمها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم اندازه گیری شدند. برای تعیین حجم و شکل تخمها از فرمول $V = K \times B^2 \times L$ و $B = \sqrt{V / (K \times L)}$ استفاده شد (V = حجم تخم، K = ۰/۴۸۶۶ ضریب ثابت، L = قطر بزرگ تخم، B = قطر

کوچک تخم به میلیمتر) (Falsola, & Canova, 1991; Symens, 1996; Krebs, 2001; Behrouzi-Rad & Tayfeh, 2008). برای محاسبه میزان کاهش وزن تخمها، تخمها قبل از تفریخ و پوستهها و محتویات باقی مانده بعد از خروج جوجه ها از تخم توزین شدند (حسینی طایفه ۱۳۸۴؛ Behrouzi-Rad & Tayfeh, 2008). نرخ بقاء Mayfield با بیشترین درست نمایی برای مرحله قبل از تفریخ تخمها، مرحله (Nestling) و مرحله (Post-nestling) با کمک نرم افزار (Ecological Methodology) تعیین شد (Krebs, 2001). برای تعیین نرمال بودن مقادیر پارامترهای تخم از آزمون کولموگروف (Kolmogrov-smirnov) و برای تعیین ضریب همبستگی بین پارامترهای تخم از آزمون پیرسون از نرم افزار (Spss, Version 16) استفاده شد. مدت زمان تفریخ و زمان ترک آشیانه جوجهها، روز پرواز و ترک جزیره با مشاهده مستقیم تعیین شد. برای تعیین میزان تلفات و بقاء، دوران رشد جوجهها به سه بخش تقسیم شد (حسینی طایفه، ۱۳۸۴؛ امینی نسب و بهروزی راد، ۱۳۹۰؛ Symens, 1996; Meininger, & Verkerk, 1998).

الف- مرحله آشیانه نشینی (Nestling): دوره زمانی که جوجهها قادر به ترک آشیانه نیستند و به صورت ثابت در درون آشیانه باقی میمانند. در این دوره بدن بدون پر است. این دوره تا رشد نیمی از پوش پره‌های بدن ادامه می‌یابد. این دوره حدود ۱۰ تا ۱۵ روز طول میکشد (شکل ۴).

ب- مرحله آشیانه‌گریزی (Post-nestling): دوره زمانی که بدن جوجهها کاملاً از پر پوشیده شده و می‌توانند از آشیانه خارج شوند و در فضای اطراف آشیانه حرکت کنند، ولی قادر به پرواز نیستند. این دوره معمولاً ۲۰ تا ۲۵ روز طول می‌کشد.

پ- مرحله پروازی (Fledging): زمانی است که جوجهها کاملاً آشیانه را ترک کرده‌اند و در ساحل دریا توسط والدین تغذیه می‌شوند تا کاملاً توان پرواز پیدا کنند. این دوره ۲۵ تا ۳۰ روز طول می‌کشد.

تعیین نرخ بقاء

نشان‌دهنده درصد جوجه‌هایی است که توانسته‌اند مراحل تفریخ، Nestling و Post-Nestli را پشت سر گذاشته و پرواز نمایند. این شاخص از تقسیم جوجه‌های زنده مانده یک مرحله بر تعداد کل جوجه‌ها در ابتدای آغاز همان مرحله ضربدر ۱۰۰ به دست آمده است. نرخ بقاء روزانه به روش مایفیلد (Mayfield)، با بیشترین درست نمایی با حدود اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شده است.

نتایج

در جزیره قبرناخدا تعداد آشیانه‌های فعال (آنهایی که تخم و یا جوجه داشتند) ۸۹۶ عدد شمارش شد. در نتیجه جمعیت جوجه آور پرستودریایی در این جزیره ۸۹۶ جفت (۱۷۹۲ قطعه) تعیین شد. در بین ۸۹۶ آشیانه شمرده شده ۸۶۷ آشیانه یک تخم

(۷۶.۹۷ درصد)، و بقیه ۲ تخم بودند (۰/۲۴ درصد). ۱۴۲ آشیانه انتخاب شده همگی یک تخم داشتند. آشیانه‌ها بسیار ساده، بر روی زمین و بدون مواد گیاهی به صورت گودال کم عمق تقریباً بیضی شکل بودند (شکل ۴).



شکل ۴: جوجه، تخم و آشیانه پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا (عکس بهروزی راد، ۱۳۹۴)

مراحل زمانی فنولوژی تولیدمثل پرستو دریایی پشت دودی در ۱۴۲ آشیانه در جزیره قبرناخدا در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین قطر بزرگ تخمها $۰/۲۳ \pm ۴۳/۴۳$ میلیمتر، میانگین قطر کوچک، $۰/۱۵ \pm ۳۱/۱۱$ میلیمتر، میانگین وزن تخمها در ابتدای تخم گذاری $۰/۳۵ \pm ۲۱/۹۸$ گرم و میانگین وزن تخمها در زمان تفریخ $۰/۵۶ \pm ۱۷/۷۸$ گرم بود که ۲۰/۱۱ درصد کاهش نشان می دهد. میانگین حجم تخمها $۲۰/۴۵۳$ میلیمتر مکعب گزارش می گردد. رنگ تخمها نخودی کم رنگ با خال های تیره و جلادار بود. شکل تخم بیضی و مقدار $۳/۰۹ \pm ۷۱/۶۳$ به دست آمد (شکل ۴). میانگین پارامترهای آشیانه و تخم پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا در سال ۱۳۹۴ در جدول ۲ نشان داده شده اند.

جدول ۱: مراحل زمانی فنولوژی تولیدمثل پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا در بهار سال ۱۳۹۴

فنولوژی تولیدمثل	زمان شروع جوجه آوری	زمان اوج جوجه آوری	زمان پایان جوجه آوری
ورود به جزیره	۲۰-۱۵ فروردین	۱۵-۱۰ اردیبهشت	۳۰-۲۵ اردیبهشت
شروع آشیانه سازی	۱۰-۵ خرداد	۲۰-۱۰ خرداد	۳۰-۲۵ خرداد
شروع تخم گذاری	۱۵-۱۰ خرداد	۲۵-۱۵ خرداد	۱۰-۵ تیرماه
تفریخ تخمها	۱۵-۱۰ تیر	۲۰-۱۵ تیر	۳۰-۲۰ تیر
مرحله (Nestling)	۱۵-۱۰ تیر	۲۵-۱۵ تیرماه	۲۵-تیر-۵ مرداد
مرحله (Post-nestling)	۱۵-۵ مرداد	۲۵-۱۵ مرداد	۳۰-۲۵ مرداد
پروازی شدن جوجه ها	۳۰-۲۵ مرداد	۵-۱ شهریور	۱۵-۱۰ شهریور
زمان ترک جزیره	۳۰ مرداد	۱۰-۵ شهریور	۱۵-۲۰ شهریور

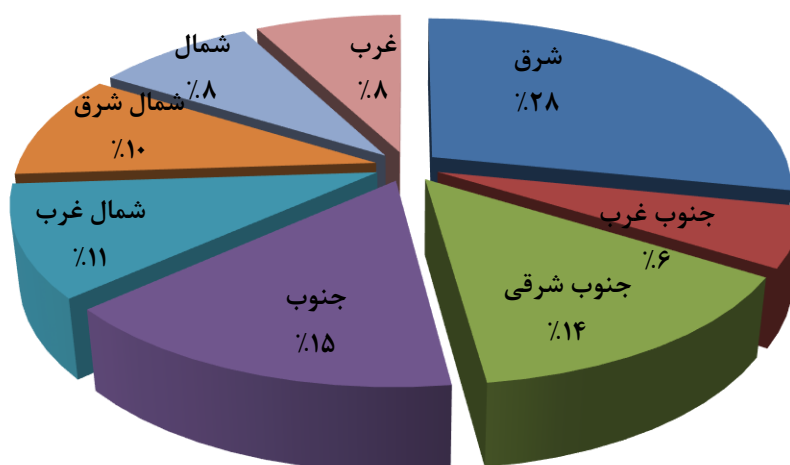
از آنجایی که تمام فعالیتهای کلنی جوجه آور به تدریج انجام میگیرد، بنابراین گذر از مرحله ای به مرحله دیگر تولیدمثل نیز به تدریج و در یک دوره زمانی بین ۱۰ تا ۲۵ روز اتفاق می افتد. میانگین وزن تخمها در زمان تفریخ $۰/۵۶ \pm ۱۷/۷۸$ گرم و میانگین وزن جوجهها در زمان تولد $۰/۷۶ \pm ۱۳/۹۷$ گرم، ($۳/۸۱$ گرم اختلاف) $۲۱/۴۳$ درصد شامل بقایای پوسته و محتویات تخم غیر از جوجه بود.

جدول ۲: میانگین پارامترهای آشیانه و تخم پرستودریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا در بهار سال ۱۳۹۴

پارامتر	میانگین و انحراف معیار	دامنه نوسان
قطر بزرگ (طول آشیانه)	$23/23 \pm 0/42$ سانتیمتر	۲۴/۱۹-۳۰/۲۰ سانتیمتر
قطر کوچک عرض (آشیانه)	$19/08 \pm 0/29$ سانتیمتر	۲۱/۱۷-۳۰/۳۵ سانتیمتر
میانگین عمق آشیانه	$0/17 \pm 0/73$ سانتیمتر	۴/۲-۵/۵ سانتیمتر
میانگین وزن تخم در ابتدا	$21/98 \pm 0/35$ گرم	۲۲/۱۶-۵/۷۸ گرم
میانگین وزن تخم در زمان تفریح	$17/78 \pm 0/56$ گرم	۱۹/۱۵-۴۳/۶۷ گرم
میانگین قطر بزرگ تخمها	$43/42 \pm 0/23$ میلیمتر	۴۴/۴۵ - ۴۱/۴۲ میلیمتر
میانگین قطر کوچک تخمها	$11/31 \pm 0/15$ میلیمتر	۳۳/۶۷ - ۳۰/۲۸ میلیمتر
میانگین حجم تخمها	$1/12 \pm 20/453$ میلی متر مکعب	۱۹/۱۹ - ۲۴/۲۷ میلی متر مکعب
میانگین شاخص شکل تخمها	$63/71 \pm 3/09$	۷۲/۷۸ - ۶۸/۸۷
میانگین زمان تفریح تخمها	$28/5 \pm 1/2$ روز	۲۸ - ۳۰ روز
میانگین وزن جوجهها در بدو تولد	$97/13 \pm 0/76$ گرم	۱۴/۱۱-۳۹/۱۱ گرم

جهت جغرافیایی آشیانهها

بیشترین آشیانهها در طرف شرقی سایه بوتهها، سپس در جهت جنوبی و جنوب شرقی بود. شکل ۵ فراوانی و درصد جهت قرارگیری آشیانهها را نشان میدهد. این امر در ارتباط با جهت خورشید در طول روز هست تا زمان بیشتری جوجهها در سایه کامل قرار گیرند. هرچند که آشیانهها هرگز بهطور کامل از زیر سایه بوته بیرون نمیانند.



شکل ۵: درصد فراوانی نسبی جهت قرارگیری آشیانهها در زیر سایه بوتهها در جزیره قبرناخدا در بهار سال ۱۳۹۴

میزان موفقیت هریک از مراحل تولیدمثل

مطابق جدول ۳، از ۱۴۲ تخم بررسی شده ۱۳۵ عدد تبدیل به جوجه شد (۹۵/۰۷ درصد) و بقیه ۷ تخم (۴/۹۳ درصد) تلف شدند. میزان موفقیت بقیه مراحل زادآوری تا مرحله پروازی شدن جوجهها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. طبق جدول ۳ بیشترین تلفات در مرحله (post-nestling) بود. میزان موفقیت جوجه آور پرستودریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا ۷۳/۹۴ درصد تعیین شد.

جدول ۳: درصد موفقیت مراحل مختلف جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبر ناخدا در سال ۱۳۹۴

تعداد آشیانه	تعداد کل تخم	میزان موفقیت مرحله تبدیل تخم به جوجه	میزان موفقیت مرحله (Nestling)	میزان موفقیت مرحله (Post-nestling)	میزان موفقیت کل جوجه آوری
۱۴۲	۱۴۲	۱۳۵ (از ۱۴۲ تخم)	۱۲۵ (از ۱۳۵ جوجه)	۱۱۰ (از ۱۲۵ جوجه)	۱۰۵ (از ۱۴۲ تخم)
۹۵/۰۷ درصد	۹۲/۶۰ درصد	۸۸ درصد	۷۳/۹۴ درصد		

نرخ بقاء در هر یک از مراحل مختلف

فنولوژی تولیدمثل و نرخ بقاء روزانه (Mayfield)، با بیشترین درست نمایی با حدود اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۴

آورده شده و نشان می دهد از مرحله قبل از تفریح تخمها، نرخ بقاء تخمها تا مرحله (Post-nestling) کاهش می یابد.

جدول ۴: نرخ بقاء روزانه Mayfield و نرخ بقاء روزانه با بیشترین درست نمایی در هر یک از مراحل زادآوری پرستو دریایی

پشت دودی در جزیره قبر ناخدا در سال ۱۳۹۴

مرحله تولیدمثلی	حدود اطمینان ۹۵٪	خطای استاندارد	نرخ بقاء روزانه با بیشترین درست نمایی	نرخ بقاء روزانه Mayfield
قبل از تفریح تخمها	۹۴۵۶۷۳ تا ۹۸۷۵۲۱	۱۰۰۶۷۳۹	۹۸۶۵۴۷	۹۸۴۳۲۱
Nestling	۹۴۱۱۳۹ تا ۹۸۷۶۵۶	۱۰۰۹۳۴۵	۹۶۷۸۵۴	۹۶۳۴۲۳
Post-nestling	۹۷۰۴۳۱ تا ۹۹۹۳۴۵	۴۰۰۴۱۷	۹۴۸۷۶۵	۹۴۸۳۴۶

ضریب همبستگی پیرسون بین پارامترهای اندازه گیری شده

پس از اینکه نرمال بودن نتایج به دست آمده از اندازه گیری پارامترهای تخم با آزمون کولموگروف-اسمرینوف تأیید

شد، برای تعیین میزان همبستگی بین فاکتورهای اندازه گیری شده از آزمون پیرسون استفاده شد. ضریب همبستگی بین

پارامترهای اندازه گیری شده نشان داد که همبستگی معناداری بین وزن تخم با قطر بزرگ و قطر کوچک وجود دارد. ولی بین

دوران تفریح و حجم تخم و وزن جوجه در بدو تولد ارتباط معنی داری مشاهده نشد ($P=0.05$). جدول ۵ ضریب همبستگی

پیرسون بین پارامترهای اندازه گیری شده تخم پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبر ناخدا در سال ۱۳۹۴ را نشان می دهد.

جدول ۵: ضریب همبستگی پیرسون بین پارامترهای تولیدمثلی پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبر ناخدا در سال ۱۳۹۴

پارامتر	وزن تخم در ابتدا	قطر کوچک	قطر بزرگ	وزن تخم قبل از تبدیل شدن به جوجه	دوران تفریح	وزن جوجه در بدو تولد	حجم تخم
وزن تخم در ابتدا	۱						
قطر کوچک	۰/۸۱۰**	۱					
قطر بزرگ	۰/۷۱۵**	۰/۷۲۰**	۱				
وزن تخم قبل از تبدیل شدن به جوجه	۰/۸۹۹**	۰/۷۹۵**	۰/۷۲۱۰**	۱			
دوران تفریح	۰/۱۰۴	۰/۰۴	۰/۳۰۰	۰/۱۰۲	۱		
وزن جوجه در بدو تولد	۰/۶۷۱*	۰/۹۴۳**	۰/۹۶۵**	۰/۷۲۷**	۰/۸۲**	۱	
حجم تخم	۰/۷۵۴**	۰/۷۸۹**	۰/۶۳۵۰**	۰/۸۵۱**	۰/۶۴*	۰/۹۶۶**	۱

**سطح معنی دار ۰/۰۱ *سطح معنی دار ۰/۰۵

بحث و نتیجه گیری

پرستو دریایی پشت دودی در خلیج فارس در جزایر بنی فارو، شیدور، بونه، دارا، قبرناخدا، نخیلو و ام الکریم جوجه آوری می کند (Behrouzi-Rad & Tayfeh, 2008; Behrouzi-Rad, 2013b; 2014a; 2014b) و ورود به جزایر از جمله جزیره قبرناخدا برای آشیانه سازی، اواسط فروردین، شروع آشیانه سازی و تخم گذاری اوایل خردادماه آغاز میشود. آشیانه را در زیر سایه بوته ها میسازد، یک تخم و بندرت ۲ تخم میگذارد، نر و ماده هر دو بر روی تخم می خوابند. دوران تفریح ۲۸ تا ۳۰ روز است. Cramp و همکاران در سال ۱۹۸۵، و Symens در سال ۱۹۹۶ نیز نتیجه مشابه گرفته اند و بیان کرده اند که استراتژی جوجه آوری پرستوهای دریایی پشت دودی گذاشتن تعداد تخم کم، به منظور مراقبت بهتر جهت موفقیت آمیز بودن جوجه آوری است که امکان بقاء نسل در شرایط زیستی سخت جزایر را بیشتر می کند. در جزیره قبرناخدا نیز از ۸۹۶ آشیانه شمرده شده تنها ۲/۲۴ درصد آشیانه ها دو تخم داشتند و بقیه ۹۷/۷۶ درصد یک تخم داشتند. این نتایج با یافته های بهروزی راد و طایفه در سال ۲۰۰۸ در جزیره نخیلو در ارتباط با همان گونه مشابه است. بهروزی راد (۲۰۱۳a) تعداد آشیانه ها را در سال ۲۰۰۹ در جزیره قبرناخدا ۵۵۶ آشیانه گزارش کرده است. مقایسه تعداد آشیانه ها (۵۵۶ عدد) در سال ۲۰۰۹ با سال ۲۰۱۵ (۸۹۶ عدد) نشان می دهد که جمعیت جوجه آور پرستو دریایی پشت دودی ۴۸ درصد در جزیره قبرناخدا رشد داشته است. این امر میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی در جزیره قبرناخدا را نشان می دهد. چون پرستو دریایی پشت دودی برای تولید مثل هر ساله بر مکان تولدشان اولیه برمی گردند. Cramp و همکاران در سال ۱۹۸۵، Falsola و canova در سال ۱۹۹۱ و Stanley در سال ۱۹۸۳، نیز به نتایج مشابهی دست یافته اند. تراکم آشیانه در جزیره قبرناخدا ۲۹۸ آشیانه در هر هکتار ($298/66=3/896$) بود. این تعداد با تراکم آشیانه که در سال ۲۰۰۸ توسط بهروزی راد و حسینی طایفه در جزیره نخیلو ۹۹۰ آشیانه در هر هکتار تعیین شده بود، اختلاف زیادی دارد و دلیل آن مقدار پوشش گیاهی موجود در سطح جزایر نخیلو است که به عنوان مکان آشیانه سازی استفاده می شود.

تراکم گیاهی جزیره نخیلو بیش از ۹۰ درصد، ولی در جزیره قبرناخدا کم تر از ۴۰ درصد بود. علاوه بر آن مساحت جزیره نخیلو ۳۵ هکتار، یعنی ۱۲ برابر جزیره قبرناخدا است. با توجه به اینکه آشیانه ها در سایه زیر بوته ها ساخته میشوند، هر چقدر تراکم پوشش گیاهی کم تر باشد، تراکم آشیانه ها نیز کم تر میشود. در جزیره قبرناخدا میانگین دوران تفریح $28/5 \pm 1/5$ روز و دامنه دوران تفریح ۲۸ تا ۳۰ روز تعیین شد. این عدد با یافته های Cramp و همکاران در سال ۱۹۸۵، Stanley در سال ۱۹۸۳، Symens در سال ۱۹۹۶، Holloway در سال ۱۹۹۳، بهروزی راد و حسینی طایفه در سال ۲۰۰۸ مشابه است. آن ها نیز دوران تفریح تخم های پرستو دریایی پشت دودی را ۲۸ تا ۳۰ روز گزارش کرده اند. از ۱۴۲ تخم بررسی شده در جزیره قبرناخدا، ۱۳۵ تخم به جوجه تبدیل و ۷ تخم تلف شدند؛ یعنی میزان موفقیت ۹۵/۰۷ درصد بود. در تحقیقات بهروزی راد و حسینی طایفه در سال

۲۰۰۸ و حسینی طایفه در سال ۱۳۸۴ در جزیره نخیلو میزان موفقیت این مرحله ۹۴/۴ درصد تعیین کرده اند؛ که با یافته‌های این تحقیق اختلاف معنی‌داری ($p=0.05$) نشان نداد. Losif در سال ۱۹۸۹ میزان موفقیت پرستو دریایی را ۹۳/۹۳ درصد برآورد کرده است. نتایج آن با نتایج این تحقیق اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p=0.05$). تحقیقات حسینی طایفه در سال ۱۳۸۴ و بهروزی راد و حسینی طایفه در سال ۲۰۰۸، میزان موفقیت در این مرحله در جزیره نخیلو ۹۲/۱ درصد و میزان تلفات ۷/۹ درصد تعیین شده است. (از ۱۳۵ جوجه متولدشده در مرحله گذر از Nestling به Post-nestling، ۱۰ جوجه تلف شده و ۱۲۵ جوجه باقی مانده‌اند)؛ که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. تحقیقات بهروزی راد (2013a و 2014b) نشان داده است که درگذر از مرحله Post-nestling تا پرواز جوجه‌ها، ۵ جوجه تلف شده در نتیجه میزان موفقیت ۹۵/۴۵ درصد بوده است؛ و میزان موفقیت کل جوجه آوری ۷۳/۹۴ درصد تعیین شد (از ۱۴۲ تخم ۱۰۵ جوجه پرواز کرد). این میزان در جزیره نخیلو ۷۹/۳ درصد و در جزیره بنی فارو ۸۹/۸۹ درصد تعیین شده است. میزان موفقیت کل جوجه آوری در جزیره نخیلو و بنی فارو در سطح ۵ درصد ($P=0.05$) اختلاف معناداری با میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی با جزیره قبرناخدا داشت. این اختلاف ناشی از شرایط بهتر جزایر نخیلو و بنی فارو برای زادآوری این گونه است. دلیل آن میزان امنیت بیشتر به دلیل دوری این دو جزیره از ساحل، میزان پوشش گیاهی بیشتر آن‌ها برای ایجاد سایه، احتمالاً میزان مواد غذایی بیشتر (امکان صید ماهی توسط والدین و تغذیه جوجه‌ها) و مساحت بیشتر دو جزیره از جزیره قبرناخدا است. در اطراف جزیره قبرناخدا تردد کشتی‌های بزرگ به بندر امام خمینی، و وجود صیادان محلی برای صید ماهی، احتمالاً امکان موفقیت در صید ماهی توسط والدین به منظور تغذیه جوجه‌ها را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر بر روی جزیره قبرناخدا صیادان برای استراحت اطراق می‌کنند و میزان امنیت را کاهش می‌دهند و درصد پوشش گیاهی آن را نیز با سوزاندن و تردد کاهش می‌دهند. این عوامل بر روی میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی مؤثر است (بهروزی راد، ۱۳۸۴؛ Eduardo, 2005; ۱۳۸۵). تحقیقات امینی نسب و بهروزی راد در سال ۱۳۹۰ نشان داده است که میزان موفقیت جوجه آوری سسک تالابی *Acrocephalus arundinaceus* درآبندان زرین کلاً در مازندران ۷۱/۱۰ درصد بود؛ که با میزان موفقیت جوجه آوری پرستو دریایی پشت دودی در سطح ۰/۰۵ اختلاف معناداری داشت. نرخ بقاء روزانه Mayfield با بیشترین درست‌نمایی با حدود اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد، از مرحله قبل از تفریح تخمها تا مرحله Post-nestling کاهش می‌یابد. در سسک تالابی این روند افزایشی بود. دلیل معکوس بودن نتایج این مطالعه با مطالعه امینی نسب و بهروزی راد در سال ۱۳۹۰ درباره سسک تالابی می‌تواند در ارتباط با امکان تأمین مواد غذایی (صید ماهی از دریا توسط پرستو دریایی پشت دودی) (صید حشره توسط سسک تالابی در تالاب) باشد. میزان تلفات سسک تالابی بیشتر از میزان تلفات پرستو دریایی پشت دودی بود که احتمالاً به دلیل عدم امنیت کافی و وجود دشمنان طبیعی در آبندان زرین کلاً به دلیل رفت‌وآمد انسان‌ها باشد. حجم و شکل تخم با قطر بزرگ، قطر کوچک و وزن تخم همبستگی معناداری دز سطح ۰/۰۵ درصد دارد؛ یعنی هرچه ابعاد تخم بزرگ‌تر باشد شکل آن بیضوی‌تر و حجم آن بزرگ‌تر و وزن آن سنگین‌تر است. این یافته با یافته‌های

حسینی طایفه در سال در سال ۱۳۸۴ در جزیره نخیلو مطابقت دارد. ولی ابعاد تخم با میزان موفقیت در تولیدمثل همبستگی نشان نداد. این امر مشخص می‌کند که میزان موفقیت زادآوری به شرایط محیطی زیستگاه بستگی دارد. این چهار فاکتور در جزایر نخیلو، شیدور، دارا، بونه، بنی فارو و قبرناخدا، تاندازه‌ای وجود دارند، به همین دلیل میزان موفقیت جوجه آوری پرستودریایی پشت دودی در این جزایر بیش از ۷۰ درصد است و جمعیت جوجه آور آن در این جزایر بین ۵۰۰۰۰ تا ۷۰۰۰۰ جفت در سال ۱۳۹۳ برآورد شده است (بهروزی راد و مکتبی، ۱۳۹۳). میزان موفقیت جوجه آوری میوه‌خور *Ampelinus Hypocolius* در منطقه هفت‌تپه میان آب خوزستان ۵۳/۳۳ درصد بود (حسینی موسوی و بهروزی راد، ۱۳۹۲) که اختلاف معناداری با میزان موفقیت زادآوری پرستودریایی پشت دودی دارد. چون مارها از اساسی‌ترین دشمنان جوجه‌های میوه‌خور در منطقه بیان شده است که در جزایر خلیج‌فارس حضور ندارند. این یافته نشان می‌دهد که میزان موفقیت جوجه آوری پرندگان آبی و خشکی زی تحت شرایط محیط‌زیست خود قرار دارند.

نتیجه‌گیری نهایی

تغییرات جمعیت جوجه آوری پرندگان آبی شاخص‌های مناسبی برای بیان وضعیت زیستگاه‌های جوجه آوری‌شان است. جزیره قبرناخدا زیستگاه حساس برای جوجه آوری پرستودریایی پشت دودی است. در سال ۱۳۹۴ در جزیره قبرناخدا علاوه بر پرستو دریایی پشت دودی، سلیم‌خرچنگ‌خوار *Dromas ardeola*، پرستودریایی کاکلی کوچک *Sterna bengalensis* و پرستو دریایی کاکلی بزرگ *Sterna bergi* و اگرگ ساحلی *Egretta gularis* و پرستو دریایی خزر *sterna(Hydroprogne) caspia* جوجه آوری کرده بودند. بنابراین تغییرات جمعیت جوجه آور پرستودریایی پشت دودی و سایر گونه‌های تولیدمثل کننده در جزیره یکی از شاخص‌های اساسی برای بیان وضعیت محیط‌زیست جزیره قبرناخدا است. اگر در طولانی مدت میزان تغییرات و موفقیت زادآوری گونه‌ها به همراه آگاهی‌رسانی و آموزش به صیادان و سایر افرادی که در زمان تولیدمثل پرستودریایی پشت دودی برای استراحت پس از صید ماهی و یا تماشای پرندگان به جزیره وارد میشوند، بررسی شوند، می‌توان به مدیریت بهتر جزیره و حفاظت گونه‌های زادآور امیدوار بود. به‌طورکلی کاهش عوامل محیطی منفی و افزایش عوامل مؤثر مثبت بر روی میزان موفقیت زادآوری برای افزایش جمعیت پرندگان از فعالیت‌های مدیریتی است که بایستی در زیستگاه‌های جوجه آوری انجام گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از ریاست محترم و محیط‌بانان اداره حفاظت محیط‌زیست ماهشهر، به خاطر تأمین وسیله رفت‌وآمد به جزیره قبرناخدا سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

- اداره کل حفاظت محیط‌زیست خوزستان. (۱۳۹۲) گزارش حلقه گذاری پرندگان در خورموسی. اداره کل حفاظت محیط‌زیست خوزستان. منتشرنشده. ۱۴۳ صفحه.
- امینی نسب، س.م. و بهروزی راد، ب. (۱۳۹۰) بررسی فنولوژی تولیدمثل و میزان موفقیت زادآوری سس *Acrocephalus arundinaceus* تالابی بزرگ در آب‌بندان دائمی زرین کلای استان مازندران. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۴(۵): ص ۱-۱۴.
- اسکات، د. ادهمی، ع. و مروج همدانی، م. (۱۳۵۰) پرندگان ایران. انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست. صفحات ۱۵۰ تا ۱۹۵.
- بهروزی راد، ب. (۱۳۸۴) بررسی عوامل مؤثر بر جوجه آوری پرندگان مهاجر آبی در جزایر استان بوشهر جهت ارائه راهکارهای مدیریتی. اداره کل حفاظت محیط‌زیست بوشهر. گزارش منتشرنشده. ۲۵۵ صفحه.
- بهروزی راد، ب. (۱۳۸۵) پایش محیط زیست جزایر چهارگانه منطقه حفاظت‌شده مند با توجه به روند تغییرات جمعیت‌های جوجه آور پرندگان مهاجر آبی و کنار آبی. اداره کل حفاظت محیط‌زیست استان بوشهر. گزارش منتشرنشده. ۲۳۵ صفحه.
- بهروزی راد، ب. (۱۳۸۷a) تالاب‌های ایران. انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح جمهوری اسلامی ایران. صفحات ۴۵۰ تا ۵۲۰.
- بهروزی راد، ب. (۱۳۸۷b) فرهنگ پرندگان آبی خلیج‌فارس. انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست. صفحات ۵۰ تا ۷۰.
- بهروزی راد، ب. مکتبی، پ. (۱۳۹۳) شناسایی فون پرندگان پارک جزیره‌ای شادی اهواز در دو فصل زمستان و بهار. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۷(۴): ۴۷۳-۴۶۲
- حسینی موسوی، س. م. بهروزی راد، ب. (۱۳۹۲) بررسی *Hypocolius ampelinus* میزان موفقیت زادآوری میوه‌خور در مجتمع کشت و صنعت هفت‌تپه و میان آب خوزستان. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۱): ۳۷-۴۸
- حسینی طایفه، ف. (۱۳۸۴) بررسی مراحل مختلف جوجه آوری پرستودریایی پشت دودی در جزیره نخیلو. پایان نامه کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات خوزستان. دانشگاه آزاد اسلامی. اهواز.
- دفتر حقوقی سازمان حفاظت محیط‌زیست. (۱۳۷۹) قوانین و مقررات سازمان حفاظت محیط‌زیست. انتشارات سازمان حفاظت محیط‌زیست. صفحات ۲۳۰ تا ۲۴۵.
- Behrouzi-Rad, B. (2007) Identification of fish-eating birds. International Journal of Environmental Research (IJER).1(2): 88-95.
- Behrouzi-Rad, B. and Hoseini Tayfeh, F. (2008) Nest count of Western Reef Heron and four sterna species on Nakhiloo Island in the Persian Gulf from 2005-2007. Podoces. 3 (1-2):45-53.
- Behrouzi-Rad, B. (2013a) Breeding species of waterbirds on 10 islands of Persian Gulf in, 2009. Octa Journal of Environmental Research. 1(1):52-64.
- Behrouzi-Rad, B. (2013b) Waterbirds population, species diversity, and similarity fluctuation in relation to water pollution in Zangi and Ahmadi coastal wetlands In Khore Mosa. Int. Journal of Marine Science. 3(39): 311-318.

- Behrouzi-Rad, B. (2014a) Species and breeding population of waterbirds on four islands in Kore Mosa in Persian Gulf in 2003 and 2012. *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 6(3): 99-110
- Behrouzi-Rad, B. (2014b) Breeding population of birds on Banifaror Island in the Persian Gulf. *Journal of Coastal Development*. 1:1-8
- Blaber, S.J.M. Milton, D.A. Farmer, M. J. and Smith, G.C. (1998) Seabird breeding population on the Far Northern Great Barrier Reef. *Australia. Emu*. 98: 44-57.
- Cramp, S. Simons, K. Gillmo, R. Hollon, P. Helson, E. Ogilvie, M. Roselaar, C. Voous, K. Wallace, D. Vincent, C. Snow, D. and Dunn, E. (1985) *Handbook of the birds of the Europe, the Middle East and North Africa, the birds of the western Palearctic. Vol. IV. Terns to Woodpeckers*. Oxford University press. Pp109-116. London.
- Dave, B. (2010) Waterbirds and Island Loss, Recent changes in the breeding population of seabirds in the Chesapeake Region 1993. Versus 2003, Modified from Brinker *et al.* 2007.
- Declerck, M. and De Meester L. (2006) Small habitat size and isolation can promote species richness, second order effects on biodiversity in shallow lakes and ponds. *Oikos*. 112: 227–231.
- Eduardo, P. and Lucía, A. (2005) Seabird research and monitoring needs in northwestern México. *USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR*, 191pp.
- Evans, M.I. (1994) Important bird area in the Middle East. *Birdlife International*. pp58-65. London.
- Falsola, M. and Canova, L. (1991) Colony site selection by eight species of gulls and terns breeding in the Valli Di Comachio (Italy), *Bool*. 2001. 58:261-266.
- Holloway, M. (1993) The variable breeding success of the Little Tern in south east India and protective measures needed for its conservation. *Biological Conservation*. 65:1-8
- I.U.C.N. (2010) Red List of threatened animals, IUCN, Switzerland. Available at www.IUCN.org.
- Krebs, C. J. (2001) *Ecological methodology*, Version 6.0, pp130-170. London.
- Losif, C. (1989) Breeding population of seabirds (Gulls and terns) on the northern coast of the Black sea and the Sea of Azov proceeding of the 2nd Mediterranean seabird Symposium, Calvia. 21-26 march 1989. pp. 125-131.
- Meininger, P.L. and Verkerk, A. (1998) Whiskered Tern breeding in the Nile Delta, Egypt, *Sandgrouse*. 20(1):123-134.
- Scott, D. A. (1995) *A directory of wetlands in the Middle East*. Published by IUCN. Pp. 43-221. Switzerland.
- Scott, D.A. (2007) A review of the status of the breeding waterbirds in Iran in the 1970s. *Podoces*. 2(1):1-21.
- Scott, D.A. (2008) Rare birds in Iran in the late 1960s and 1970s. *Podoces*. 3: 1-30.
- Stanley, C. *et al.* (1983) *Handbook of the birds of the Middle East and North Africa, Wader to Gulls*, Oxford University Press. Vol.III.pp8765-8984. London.
- Symens, S. (1996) Status of the breeding population of Terns (Sternidae) along the eastern of Saudi Arabic. Following the Gulf War. Pp. 404-420, NCWCD, Riyadh and Senckenberg Research Institute. Frankfort.

Wang, H. (2011) Analyzing coastal wetland change in the Yancheng National Nature Reserve. China. *Regional Environmental Change*.11: 161–173.

Reproductive Phenology and Breeding Success of Bridled Tern *Onychoprion anaethetus* in Ghabre Nakhoda Island in 2015

B.Behrouzi-Rad^{1*}

Received: 2016.8.15
Accepted: 2018.11.11

Abstract

The Present study conducted during March-September 2015 on Ghabre Nakhoda Island in Khure Mosa Creek in Khozestan Province. Entrance of the Bridled Tern *Onychoprion anaethetus* (Scopoli, 1786) to Ghabre Nakhoda Island started in mid-March and they leaved island after breeding in mid-September 2015. In 142 selected nests, breeding success rates, large and small diameter parameters, the shape, size, volume, and weight of eggs before hatching and chicks after birth were measured. Averages of large diameter, small diameter, and depth of nests were 23.42 ± 0.42 , 19.08 ± 0.29 , and 3.07 ± 0.17 centimeter respectively. Averages of large diameter, small diameter, volume shape, and weight of eggs were 43.43 ± 0.23 , 31.11 ± 0.15 mm, 20.453 ± 1.12 mm³, and 21.98 ± 0.35 gr respectively. Average of incubation period was 28.5 ± 1.5 day. Average success of the nestling, post nestling, and fledging were 92.60, 91.44, and 73.94 percent respectively. Most of the mortality was 12 percent at post-nestling and minimum was 5 percent at incubation period.

Keyword: Bridled Tern, Breeding Success, Ghabre Nakhoda Island, Post-Nestling

1. Department of Environment, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

*(Corresponding Author: behrouzirad@yahoo.com)

تأثیر اتانل بر تولید پیگمان‌ها در *Chlorella sorociniana* در شرایط اتوتروف

زهرا خلیلی^۱، حسن جلیلی^{۲*}، مصطفی نوروزی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۶

چکیده

کلرلا نوعی جلبک سبز تک سلولی است که بیشترین کلروفیل را در بین موجودات تولید می‌کند. از جمله متابولیت‌های مهم کلرلا می‌توان به کلروفیل *a* و *b* و آستاگزانتین اشاره کرد. تا کنون جهت افزایش تولید متابولیت‌های ریزجلبک‌ها، برخی مواد شیمیایی به عنوان محرک استفاده شده‌اند که یکی از این محرک‌ها اتانل می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار تأثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین و کلروفیل *a* و *b* در کلرلا سوروکینینا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری نشان داد که اتانل در غلظت ۱۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی سی محیط کشت) سبب افزایش تولید آستاگزانتین به مقدار ۱/۴ برابر می‌شود. در حالیکه میزان تولید کلروفیل‌ها، در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل (در ۱۰۰ سی سی محیط کشت) تنها تغییر اندکی داشته است. با توجه به نقش تنظیمی فیتوهورمون‌ها در ریزجلبک‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اتانل نیز مشابه سیگنال عمل کرده و تولید برخی متابولیت‌ها را تنظیم می‌کند.

واژه های کلیدی: آستاگزانتین، اسپکتروفتومتری، اتانل، ریزجلبک، کلروفیل

مقدمه

کلرلا جلبک سبز تک سلولی از شاخه کلروفیتا است که در آب شیرین پرورش داده می‌شود. کلرلا اولین غذای سبز موجود در کره زمین می‌باشد و قدمت آن به ۲/۵ میلیارد سال می‌رسد. واژه کلرلا از دو جزء «chlor» به معنی سبز و «ella» به معنی کوچک گرفته شده است. این جلبک بیشترین کلروفیل را در بین تمام گیاهان روی کره زمین تولید می‌کند و سبزترین گیاه روی کره زمین است (Luangpipat & Chisti, 2016). اندازه هر سلول کلرلا ۲-۸ میکرون است. سرعت تکثیر کلرلا بسیار زیاد است و یک سلول آن در مدت ۱۷ تا ۲۴ ساعت ۴ سلول جدید تولید می‌کند. سرعت بالای تولید مثل کلرلا نشان دهنده

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: (hjalili@ut.ac.ir)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

پتانسیل حیات بسیار بالای این ارگانسیم است (Rioboo *et al.*, 2009). تحقیقات دانشمندان نشان داده که کلرلا یکی از سالم‌ترین و کامل‌ترین غذاهای روی کره زمین است. کلرلا در دسته ریز جلبک های سبز دسته بندی می شود.

کلرلا منبع غنی از ترکیبات با ارزشی مثل ویتامین ها، مواد معدنی، پروتئین ها، اسیدهای چرب ضروری، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها و رنگدانه‌ها است و به عنوان مکمل های غذایی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (Li *et al.*, 2015). این مسئله با توجه به رشد روز افزون جمعیت جهان و کمبود منابع غذایی بسیار حائز اهمیت است. آستاگزانتین (Astaxanthin) نوعی کاروتنوئید است و جزء رنگدانه های طبیعی شناخته شده می‌باشد. آستاگزانتین به رنگ نارنجی پررنگ بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که تاثیر زیادی روی سلامتی انسان دارد. از جمله اثرات آستاگزانتین می‌توان به تقویت سیستم ایمنی بدن، پیشگیری از پیر شدن سلول‌ها، جلوگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی و غیره اشاره کرد. در نتیجه آستاگزانتین به صورت گسترده در صنایع غذایی، دارویی و حتی آرایشی- بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آستاگزانتین در بدن انسان تولید نمی‌شود لذا باید با رژیم غذایی و از طریق گیاهان و ریزجلبک ها تامین شود. آستاگزانتین را به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی می‌توان به عنوان نگهدارنده و مکمل غذایی استفاده کرد (Chacón-Ordóñez *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). در تحقیقی دیگر اثر محیط‌های کشت مختلف روی تولید آستاگزانتین توسط جلبک *Haematococcus pluvialis* مورد ارزیابی قرار گرفته (Noroozi *et al.*, 2012).

کلروفیل‌ها رنگیزه‌های سبز و فعال فتوسنتزی موجود در کلروپلاست‌اند که به انواع متنوع a, b, c, d و e شناخته شده‌اند. تمام گیاهان فتوسنتز کننده، دارای کلروفیل a هستند ولی وجود کلروفیل کمکی مثل c, b, d و e بستگی به نوع گیاه دارد. در بعضی جلبک‌ها کلروفیل b وجود ندارد و به عوض آن کلروفیل c یا d دیده می‌شود. کلروفیل a به رنگ آبی مایل به سبز و محلول خالص کلروفیل b به رنگ سبز متمایل به زرد است. طیف جذبی کلروفیل a با b تفاوت دارد و بر حسب نوع پروتئینی که با آنها ترکیب شده است فرق می‌کند (Garcia-Camacho *et al.*, 2012). نقش کلروفیل‌ها در افزایش سلامت خون، محافظت در برابر بیماری و حذف فلزات سنگین حائز اهمیت است (Ferruzzi *et al.*, 2002; Stahl & Sies, 2005; Takaichi, 2011). با توجه به اهمیت کلروفیل‌ها در سلامت انسان، افزایش تولید این ماده و تخلیص آن به شکل دارو، می‌تواند نقش به‌سزایی در بهبود سلامت انسان و پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها داشته باشد.

از آنجایی که تولید متابولیت‌ها از جمله آستاگزانتین و کلروفیل، توسط کلرلا وحشی مقرون به صرفه نیست و حتی متابولیت‌های سویه‌های تغییر یافته هم آن‌چنان صنعتی نیست، محققان استفاده از محرک‌های شیمیایی و زیستی را در دستور کار قرار داده‌اند. از جمله محرک‌هایی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است می‌توان به بررسی اثر اتانل بر تولید ترکیبات لیپیدی، اثر متیل جاسمونات بر تولید آستاگزانتین، تاثیر پیرووات و سترات بر تولید آستاگزانتین، اثر فلزات بر رشد سلولی و غیره اشاره کرد

(Yu et al., 2015). در این پژوهش برای نخستین بار تاثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین و کلروفیل توسط ریزجلبک کلرلا سوروکینینا مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* (Shihira & Krauss)، تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک، استفاده شد. مواد بکار رفته در آزمایش همگی از شرکت مرک (Merck) بوده و آزمایشات در آزمایشگاه دانشکده علوم فنون دانشگاه تهران انجام شد.

کشت ریزجلبک کلرلا

جهت کشت این ریزجلبک از محیط کشت BG11 استفاده شد. جهت تهیه ۱ لیتر از این محیط کشت: ۱/۵ گرم NaNO_3 ، ۰/۰۷۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۲ گرم Na_2CO_3 ، ۰/۰۳۹ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۰۳۵ گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۶ گرم اسید سیتریک، ۰/۰۰۶ گرم فریک آمونیوم سترات، ۰/۰۰۱ گرم $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و ۱ سی سی محلول ریز مغذی‌ها استفاده شد. ۱ لیتر از محلول ریز مغذی‌ها نیز شامل ۶۱ میلی گرم H_3BO_3 ، ۱۶۹ میلی گرم $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۲۸۷ میلی گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۵ میلی گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ و ۱۲۵ میلی گرم $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ بود. pH محیط کشت با استفاده از NaOH به ۸/۴ رسید و سپس اتوکلاو شد. محیط کشت پس از تلقیح، در دمای 25°C ، روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm و در معرض ۶۰ فوتون نور قرار گرفت.

ترسیم منحنی رشد کلرلا

جهت رسم منحنی رشد کلرلا، در زمان‌های مختلف تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از هر محیط کشت یکنواخت شده، به لام نئوبار منتقل شده و میانگین تعداد سلول‌های چهار خانه حاشیه لام و یک خانه مرکزی آن محاسبه شده و سپس در عدد 10^4 ضرب شد.

تیمار محیط کشت با اتانل

در سه ارلن با حجم ۵۰۰ سی سی، هر کدام به اندازه ۱۰۰ سی سی محیط کشت ریخته شد و با ۱۰ سی سی از مایه تلقیح، کشت داده شد. ۴۸ ساعت پس از تلقیح (ابتدای فاز رشد لگاریتمی کلرلا در منحنی رشد)، در یکی از ارلن‌ها به اندازه ۱۰ میکرولیتر و در دیگری به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۶ درصد مرک، تحت شرایط استریل اضافه شد. پس از اتمام دوره رشد کلرلا (دوازده روز پس از تلقیح)، میزان آستاگزانتین و کلروفیل‌های این سه محیط کشت اندازه‌گیری و مقایسه شد.

اندازه گیری آستاگزانتین

برای استخراج آستاگزانتین به روش DMSO، ابتدا محیط کشت روی ورتکس به خوبی یکدست شد. سپس تحت شرایط استریل مقدار ۱۰ سی سی از محیط کشت در فالكون ۵۰ سی سی ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰ سی سی DMSO به ته نشست اضافه شد. محلول حاصل به کمک ورتکس به خوبی یکدست شد و به مدت ۱ ساعت در بن ماری °C ۷۰ قرار گرفت. سپس میزان جذب این محلول توسط اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. از محلول DMSO به عنوان کنترل (بلانک) در آزمون اسپکتروفتومتری استفاده شد. غلظت آستاگزانتین توسط معادله منحنی استاندارد آستاگزانتین، که بر اساس جذب رقت های مختلف آستاگزانتین خالص ترسیم شده است، بدست آمد (Greenberg & Watras, 1989).

اندازه گیری کلروفیل ها

استخراج کلروفیل نیز بر اساس روش DMSO انجام شد؛ به این صورت که، محیط کشت روی ورتکس به خوبی یکدست شد. سپس، تحت شرایط استریل مقدار ۱۰ سی سی از محیط کشت در فالكون ۵۰ سی سی ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با احتیاط دور ریخته شد و ۴ سی سی DMSO به ته نشست، اضافه شد. محلول حاصل حدود ۱۶ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. در صورتی که پس از ۱۶ ساعت هنوز سلول ها به طور کامل رنگ خود را از دست نداده بودند مرحله استخراج با افزودن ۳ سی سی DMSO ادامه می یافت. سپس محلول حاصل به خوبی ورتکس، و توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد تا ذرات اضافی آن گرفته شود. جذب محلول صاف شده در دو طول موج ۶۴۹ و ۶۶۵ نانومتر خوانده شد. از محلول DMSO به عنوان کنترل (بلانک) در آزمون اسپکتروفتومتری استفاده شد. میزان کلروفیل a و کلروفیل b از طریق معادله های ۱ و ۲ محاسبه شد (Greenberg & Watras, 1989).

$$\text{Chlorophyll a: } (13.95 - A_{665}) - (6.88 - A_{649}) \quad \text{معادله (۱)}$$

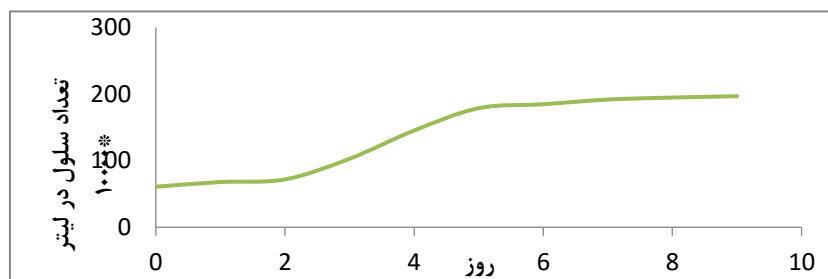
$$\text{Chlorophyll b: } (24.69 - A_{649}) - (7.32 - A_{665}) \quad \text{معادله (۲)}$$

اندازه گیری رشد سلولی

جهت بررسی تاثیر اتانل بر رشد سلولی، شمارش تعداد سلول ها با کمک لام نئوبار در سه ارلن انجام شد.

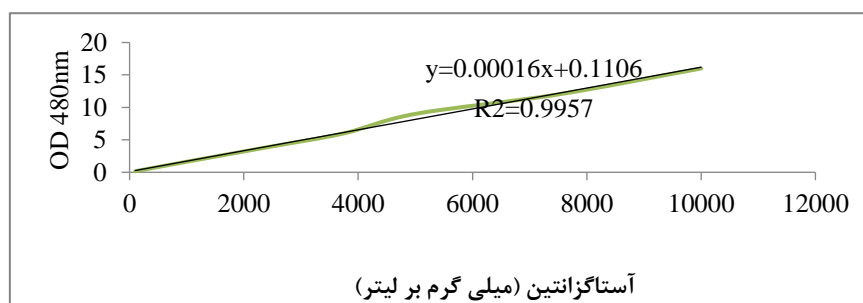
نتایج و بحث

منحنی رشد کلرلا مطابق شکل ۱ رسم شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کلرلا سوروکینینا، ۴۸ ساعت پس از تلقیح، به فاز رشد لگاریتمی و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، به مرحله سکون می‌رسد و نرخ رشد و مرگ یکسانی پیدا می‌کند.



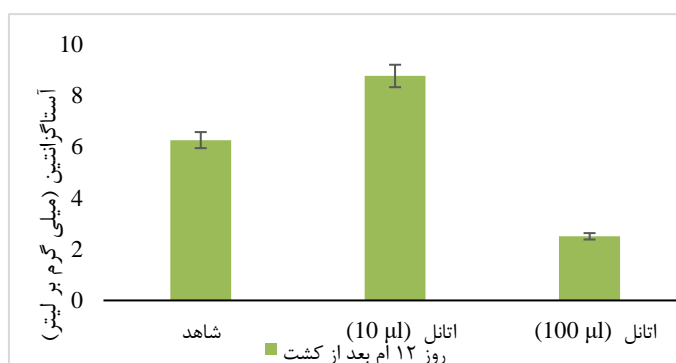
شکل ۱: منحنی رشد کلرلا

منحنی استاندارد آستاگزانتین مطابق شکل ۲ ترسیم شد تا با استفاده از معادله آن بتوان غلظت آستاگزانتین را در آزمایش‌های مختلف محاسبه کرد.



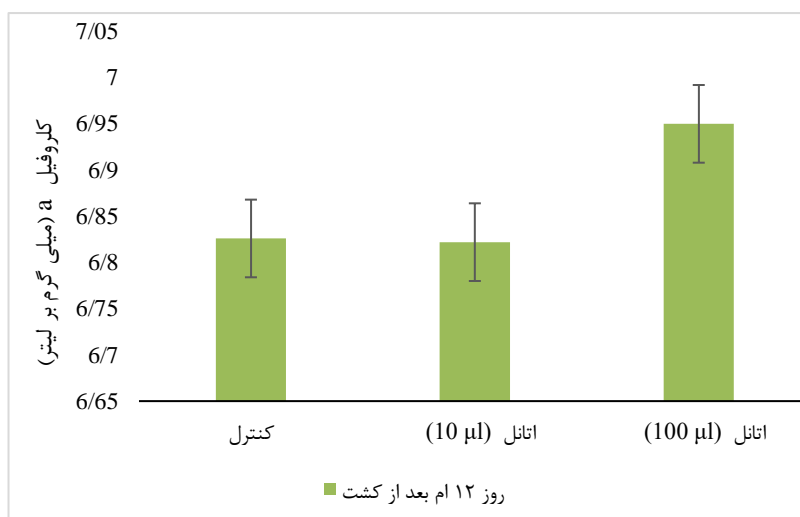
شکل ۲: منحنی استاندارد آستاگزانتین

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، مقدار آستاگزانتین تولیدی در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، نسبت به نمونه شاهد، ۱/۴ برابر افزایش یافته است. این در حالی است که حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل، میزان آستاگزانتین را ۲/۵ برابر نسبت به شاهد کاهش داده است.



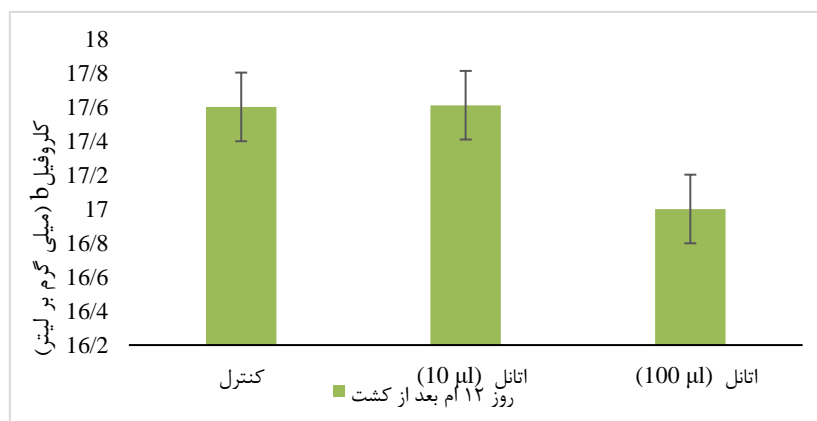
شکل ۳: مقایسه مقدار آستاگزانتین تولیدی در سه ارلن

در شکل ۴، مربوط به تولید کلروفیل a، مشاهده می شود که در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل مقدار تولید کلروفیل a نسبت به نمونه شاهد چندان تحت تاثیر قرار نمی گیرد. در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل نیز مقدار کلروفیل a، به میزان اندک (۱/۰۲) برابر افزایش داشته است.



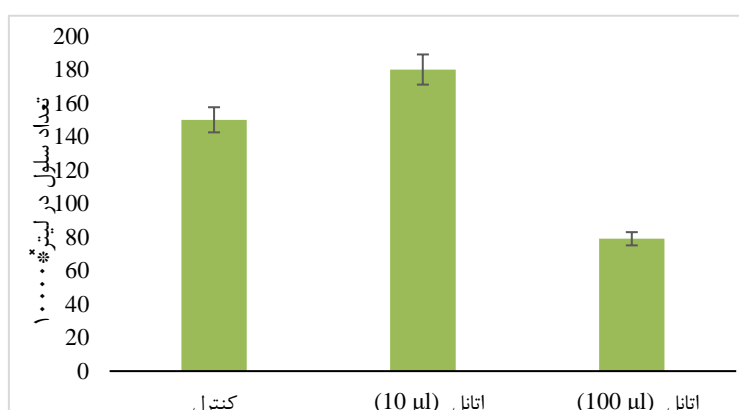
شکل ۴: مقایسه مقدار کلروفیل a تولیدی در سه ارلن

مقدار کلروفیل b، در شکل ۵ نشان می دهد که همانند آنچه در مورد کلروفیل a مطرح شد، در اینجا نیز حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، تولید کلروفیل b را تغییر نداده است. در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل نیز، کلروفیل b، ۱/۰۳ برابر کاهش یافته است.



شکل ۵: مقایسه مقدار کلروفیل b تولیدی در سه ارلن

شکل ۶ تعداد سلول‌ها در سه ارلن در روز دوازدهم بعد از کشت را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، تعداد سلول‌ها نسبت به نمونه شاهد، ۱/۲ برابر افزایش داشته است. در حالی که ۱۰۰ میکرولیتر اتانل، اثر مهاری بر رشد داشته و تعداد سلول‌ها در این نمونه نسبت به شاهد، ۱/۸ برابر کاهش یافته است.



شکل ۶: مقایسه تعداد سلول‌ها در سه ارلن

همان‌طور که در نتایج ذکر شد، تولید آستاگزانتین در حضور ۱۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی‌سی) اتانل افزایش یافته است. در سال ۲۰۰۹، Ren تاثیر افزایشی اتانل بر تولید ترکیبات لیپیدی در شیزوکتیروم را گزارش کرد (Ren *et al.*, 2009). وی طی تحقیقات به این نتیجه رسید که احتمالاً اتانل و محرک‌های دیگری که مورد استفاده قرار داده بود، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در تولید ترکیبات لیپیدی شدند. از آنجایی که تاکنون تاثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین در هیچ ارگانیزی مطالعه نشده است، لذا منبع دقیقی برای توجیه خاصیت افزایشی اتانل بر تولید آستاگزانتین وجود ندارد. با توجه به نتایج تحقیقات Ren می‌توان گفت که احتمالاً در کلرلا نیز اتانل در مسیر سنتز آستاگزانتین، باعث افزایش فعالیت آنزیم خاصی شده و لذا تولید آستاگزانتین را از این طریق افزایش داده است. عبارتی می‌توان گفت اتانل به صورت یک سیگنال عمل کرده و می‌تواند تولید آستاگزانتین توسط ریز جلبک کلرلا را تنظیم کند.

مشاهده شد که اتانل در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی‌سی) تولید آستاگزانتین در کلرلا را کاهش داده است. طبق تحقیقات، اتانل در غلظت بالا اثر مهاری بر رشد سلول داشته و در اینجا هم غلظت اتانل به حد مهار کننده تولید آستاگزانتین رسیده است.

نتایج نشان می‌دهد که اتانل در غلظت ۱۰ میکرولیتر به حد آستانه تحریک تولید کلروفیل‌ها نرسیده است، در حالی که ۱۰۰ میکرو لیتر اتانل باعث افزایش کلروفیل a و کاهش کلروفیل b شده است. این تفاوت در تاثیر اتانل، احتمالاً با تفاوت در نقش این دو کلروفیل مرتبط می‌باشد. کلروفیل a در فتوسنتز نقش اساسی و حیاتی ایفا می‌کند و در مرکز واکنش‌ها است، در حالی که

کلروفیل b در جمع آوری و متمرکز کردن نور و تحویل آن به کلروفیل a نقش دارد (Green & Durnford, 1996). وقتی ریزجلبک با تنش مواجه می‌شود به صورت تدافعی، تولید آستاگزانتین، به جای کلروفیل b، افزایش می‌یابد؛ در واقع، نقش آستاگزانتین در فتوسنتز مشابه نقش کلروفیل b می‌باشد. لذا در برخورد با اتانل و مواجهه کلرلا با تنش محیطی، تولید کلروفیل a به عنوان هسته واکنش‌های فتوسنتزی افزایش و کلروفیل b کاهش یافته است تا احتمالاً به جای آن، انرژی ریز جلبک صرف تولید آستاگزانتین شود؛ ولی، همان‌طور که ذکر شد این غلظت از اتانل برای تولید آستاگزانتین نیز اثر مهاری داشته است. اتانل در افزایش تولید کلروفیل a، احتمالاً مکانیسمی مشابه آنچه در مورد آستاگزانتین بیان شد، داشته است و در واقع باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود.

در مورد تعداد سلول‌ها در شکل ۶ مشاهده می‌شود که اتانل در غلظت کمتر (۱۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی) باعث افزایش تعداد سلول شده است. این میزان افزایش، نسبت به نمونه شاهد ۱/۲ برابر است. این در حالی است که افزایش آستاگزانتین در این نمونه، نسبت به نمونه شاهد به اندازه ۱/۴ برابر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش تولید آستاگزانتین نسبت به افزایش تعداد سلول‌ها، بیشتر بوده است؛ لذا، می‌توان گفت در استفاده از اتانل به عنوان محرک تولید آستاگزانتین در صنعت، مشکل چندانی به لحاظ افزایش رشد سلولی و مشکل هوادهی وجود نخواهد داشت.

نتیجه گیری کلی

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، اتانل اثر افزایشی بر تولید آستاگزانتین توسط کلرلا دارد. از آنجایی که تاکنون جاسمونات و متیل جاسمونات جهت افزایش تولید آستاگزانتین در ریزجلبک هماتوکوکوس بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، می‌توان گفت استفاده از اتانل در جهت افزایش تولید آستاگزانتین، بسیار مقرون به صرفه تر می‌باشد؛ چرا که، هم ارزان تر و هم در دسترس تر از محرک‌های دیگر است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از اتانل به عنوان محرک تولید آستاگزانتین توسط ریز جلبک، در صنعت، بسیار مناسب و مقرون به صرفه است.

در مورد رشد سلولی هم نتایج نشان می‌دهد که اتانل در غلظت کمتر، باعث افزایش تعداد سلول‌ها می‌شود. لذا جهت افزایش بیومس سلولی کلرلا (برای مصارف خوراکی) می‌توان از اتانل استفاده کرد و سپس اتانل را با طریق تبخیر کاملاً از بیومس، حذف کرد. در مورد تولید کلروفیل، همان‌طور که مشاهده می‌شود به دلیل تغییر بسیار کم در حضور اتانل، می‌توان نتیجه گرفت که اتانل محرک مناسبی جهت افزایش تولید کلروفیل‌ها نخواهد بود.

منابع

- Chacón-Ordóñez, T., Schweiggert, R. M., Bosity-Westphal, A., Jiménez, V. M., Carle, R., & Esquivel, P. (2017) Carotenoids and carotenoid esters of orange- and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. *Food Chemistry*, 221: 673-682.
- Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., & Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal of Food Science*, 67: 2589-2595.
- Garcia-Camacho, F., Sanchez-Miron, A., Molina-Grima, E., Camacho-Rubio, F., & Merchuck, J. C. (2012) A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *J Theor Biol*, 304: 1-15.
- Green, B. R., & Durnford, D. G. (1996) The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 685-714.
- Greenberg, E., & Watras, C. (1989) Field evaluation of a micro-extraction technique for measuring chlorophyll in lakewater without filtration *Hydrobiologia*. *Hydrobiologia*, 173: 193-197.
- Li, Y., Xu, H., Han, F., Mu, J., Chen, D., Feng, B., & Zeng, H. (2015) Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy-photoinduction cultivation regime. *Bioresour Technol*, 192: 781-791.
- Luangpipat, T., & Chisti, Y. (2016) Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae - Effects of salinity and other factors. *Journal of biotechnology*, 257: 47-57.
- Meng, Z., Zhang, B., Liu, B., Li, H., Fan, S., & Yu, D. (2017) High carotenoids content can enhance resistance of selected *Pinctada fucata* families to high temperature stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 61: 211-218.
- Noroozi, M., Omar, H., Napis, S., Hejazi, M. A., & Tan, S. G. (2012) Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *Haematococcus pluvialis*. *African Journal of Biotechnology*, 11: 15049-15059.
- Ren, L. J., Huang, H., Xiao, A. H., Lian, M., Jin, L. J., & Ji, X. J. (2009) Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32: 837-843.
- Rioboo, C., O'Connor, J. E., Prado, R., Herrero, C., & Cid, A. (2009) Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquat Toxicol*, 94: 229-237.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*, 1740: 101-107.
- Takaichi, S. (2011) Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar Drugs*, 9: 1101-1118.
- Yu, X., Chen, L., & Zhang, W. (2015) Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Front Microbiol*, 6: 56.

Effect of ethanol on pigments production in *Chlorella sorociniana* in autotrophic condition

Z.Khalili¹, H.Jalili^{2*}, M. Noroozi³

Received: 2017.5.31

Accepted: 2017.12.17

Abstract

Chlorella is a unicellular green algae that produces the highest amount of chlorophyll among of organisms. Some of important metabolites in *chlorella* are astaxanthin, chlorophyll a and chlorophyll b. So far some of chemicals used as inducer for increasing algal metabolites which one of them is ethanol. Effect of ethanol on cell growth and lipid content of microalgae and plants has been studied. In this research, the effect of ethanol on astaxanthin, chlorophyll a and b production in *chlorella sorociniana* was investigated for the first time. The result of spectrophotometry showed that addition of 10 μ l of ethanol (in 100 ml) will enhance the astaxanthin for 1.4 times. However, chlorophyll production changed a little in the presence of 100 μ l of ethanol. According to regulatory role of phytohormones in microalgae, it can be conclude that ethanol acts as a signal and regulates some of metabolites production.

Keywords: astaxanthin, chlorophyll, ethanol, microalgae, spectrophotometry

1-Msc student, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

2-Assistant Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: hjalili@ut.ac.ir)

3-Assistant Professor, Faculty of Biological Sciences, University of Alzahra, Tehran, Iran

بررسی میزان تحمل گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به تنش کروم بر اساس

رشد، شاخص های فتوسنتز و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

راهله رهباریان^{۱*}، الهام عزیزی^۲، آسیه بهداد^۲، آتنا میربلوک^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳

چکیده

به منظور بررسی اثرات تنش کروم بر رشد، شاخص های فتوسنتز و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه خرفه، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح کروم (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام) انجام شد. براساس نتایج، انباشت Cr^{6+} در ریشه بیش تر از اندام هوایی بود. هدایت روزنه ای، کلروفیل *a*، کاروتنوئید، تعرق و کارایی فتوسیستم II با افزایش میزان کروم کاهش یافت. هر چند، میزان تثبیت دی اکسید کربن، کارایی مصرف آب، رشد، ضریب ثبات کلروفیل و میزان کلروفیل *b* و کل در غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیشتر از غلظت ۷۵ پی پی ام بود. میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز با افزایش میزان کروم روند افزایشی نشان داد. بنابراین، احتمالاً کروم در غلظت های پایین، سبب کاهش کارایی فتوسنتز، تولید گونه های اکسیژن فعال و در نتیجه کاهش رشد شده است، ولی در سطوح بالاتر (۱۰۰ پی پی ام)، خرفه توانسته است با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تا حدودی اثرات تخریبی را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: پراکسیداز، فلزات سنگین، کارایی فتوسیستم II، کلروفیل.

مقدمه

کروم هفتمین عنصر فراوان روی کره زمین و یکی از مهمترین آلاینده های محیطی است که طی فرآیندهای وسیع صنعتی به خاک رها می شود (Aldoobie & Beltagi, 2013). چرم سازی و دباغی، صنایع استیل سازی، کاشی سازی و حفاری چاه ها با رهاسازی پساب های صنعتی به آب های جاری، بیشترین سهم را در آلودگی با کروم به عهده دارند (Hussein et al., 2014) با وجود این که کروم در گروه عناصر ضروری برای گیاهان قرار ندارد (Jianmin et al., 2012)، ولی ضرورت وجود کروم در تغذیه جانوران و تاثیر آن بر سلامت انسان ثابت شده است. Cr^{3+} یک جزء مهم در تعادل رژیم غذایی انسان و جانوران است

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: (Rahbarian.r@pnurazavi.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

و کمبود آن موجب بروز اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی ها و ایجاد علائم دیابت و بیماری های قلبی عروقی می گردد (Gonzalez *et al.*, 2015).

دامنه سمیت کروم از ۰/۵ تا ۵ میلی گرم بر لیتر در محلول غذایی و ۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در خاک برای گیاهان زراعی است. جذب و اثر منفی کروم بر گیاهان به فرم شیمیایی آن بستگی دارد. به طوری که Cr^{6+} شکل بسیار واکنش گر کروم است و Cr^{3+} حلالیت و سمیت کمتری در مقایسه با Cr^{6+} نشان می دهد. هر چند، برخی غلظت های کروم محرک رشد به ویژه جوانه زنی هستند. در حضور منگنز در خاک، کروم Cr^{3+} به کروم Cr^{6+} تبدیل می شود که برای مدت طولانی در خاک باقی می ماند و بر روی رشد و نمو گیاه تاثیر می گذارد (Rehana *et al.*, 2012). Behdani و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسی غلظت عناصر کم مصرف و سنگین خاک در چند منطقه کاشت زعفران نشان دادند با افزایش سن مزرعه غلظت روی خاک کاهش و غلظت عناصر سنگین خاک شامل کبالت، کروم و کادمیوم افزایش می یابد. برخلاف سایر فلزات سنگین از قبیل کادمیوم، جیوه و آلومینیوم، تاثیر تنش کروم بر رشد و نمو گیاه کمتر مورد توجه دانشمندان و محققین قرار گرفته است (Olutoyosi *et al.*, 2012).

کروم مانند سایر تنش های غیرزیستی از جمله تنش شوری و خشکی بر مراحل مختلف رشد، شاخص های فتوسنتزی شامل تثبیت دی اکسید کربن، انتقال الکترون، فسفریلاسیون نوری و فعالیت های آنزیمی تاثیر می گذارد (Redondo-Gomez *et al.*, 2011; Rahbarian *et al.*, 2011). کروم به دلیل شباهت ساختاری با بعضی عناصر ضروری، تغذیه معدنی گیاه را نیز تحت تاثیر قرار می دهد (Subrahamyam, 2008). غلظت های بالای کروم بر روی رشد ریشه نیز تاثیر می گذارد و سبب پژمردگی و پلاسمولیز سلول های ریشه ای می گردد (Shamsu *et al.*, 2012). هم چنین Orhue و Uzu (۲۰۱۱) گزارش کردند که سمیت کروم باعث کاهش توده گیاهی، سطح برگ، تعداد برگ ها و وزن خشک ساقه کدو تنبل (*Telfairia occidentalis*) شده است. در بررسی اثر کروم بر فتوسنتز گیاه چای مشاهده شد که غلظت های بالای (۱ میلی مولار) کروم شش ظرفیتی می تواند سبب تخریب غشاء کلروپلاستی و کاهش میزان فتوسنتز در گیاه شود (Jianmin *et al.*, 2012). هم چنین کروم میزان آنزیم دلتا آمینولولینیک اسید دهیدراتاز کاهش می دهد. این آنزیم در مسیر بیوسنتز رنگدانه های فتوسنتزی از قبیل کلروفیل ها نقش مهمی ایفا می کند. بنابراین کروم از طریق مهار بیوسنتز کلروفیل سبب کاهش ظرفیت به دام اندازی نور و در نهایت کاهش فرایند فتوسنتز در گیاه می شود. علاوه بر این کروم می تواند باعث القای تجزیه کاروتنوئیدها در گیاه گردد (Shamsu *et al.*, 2012). هم چنین کروم می تواند سبب تغییر کلروپلاست و فراساختار غشا، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شود (Olutoyosi *et al.*, 2012).

یکی از علت های مهم آسیب بافتی در گیاهانی که در معرض فلزات سنگین قرار می گیرند، افزایش گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو است. ROS باعث ایجاد صدمات متعدد نظیر اکسیداسیون لیپیدهای غشا و تخریب

پروتئین ها، آنزیم ها، رنگدانه ها و ماکرومولکول ها و در نهایت اختلال در فرآیندهای مهم تنفس و فتوسنتز می شوند (Mishra *et al.*, 2006). سیستم دفاعی گیاه در مقابل خسارت اکسیداتیو شامل آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)، کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) و پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.11) و ترکیبات غیر آنزیمی مثل آسکوربات و گلووتاتیون و ترکیبات فنلی می باشند. ترکیبات آنتی اکسیدان به عنوان دفاع اصلی موجب حذف ROS در بخش های مختلف سلول گیاهی می شوند. در نتیجه، تعادل بین میزان آنتی اکسیدان ها و محتوای ROS برای حفظ رشد طبیعی گیاه لازم است (Molassiotis *et al.*, 2005). بر طبق گزارش Zare و همکاران (۲۰۱۵) تنش کروم باعث افزایش در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor*) شد که می تواند دلیلی بر افزایش رادیکال های آزاد تحت تنش کروم باشد.

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. گیاهی علفی و آبدار است که تقریباً در تمامی نقاط ایران پراکندگی دارد و در مناطق جنوبی ایران از جمله خوزستان به عنوان سبزی خوردن کاشته می شود. این گیاه به عنوان ضد درد، ضد تورم، ضد تب، شل کننده عضلانی، آنتی اکسیدان، تقویت سیستم ایمنی، تصفیه کننده خون و رفع تشنگی کاربرد درمانی دارد (Mubashir *et al.*, 2011). علاوه بر این، گیاه خرفه با جذب مقادیر بالای آب در اندام ها، قادر است غلظت های بالایی از فلزها را وارد بافت های خود کند. تحقیقات نشان داده است که این گیاه قادر به تجمع غلظت های بالایی از فلز سنگین کروم در بافت هایش است (Alyazouri *et al.*, 2013). هم چنین، Azizi و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که گیاه خرفه با داشتن فاکتورهای تجمع زیستی بیش تر از ۱ برای کروم، قابلیت رشد در خاک های آلوده به کروم را دارد و احتمالاً می تواند به عنوان یک گیاه بیش تجمع دهنده برای حذف آلودگی های ناشی از کروم شش ظرفیتی مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی با توجه به خواص دارویی این گیاه و احتمال تجمع فلزات سنگین در ریشه آن، استفاده از اندام هوایی آن جهت مصارف دارویی کاربرد خواهد داشت (Mubashir *et al.*, 2012; Uddin *et al.*, 2011). لذا در این پژوهش، سعی بر این بوده است که غلظت های کروم در خاک، ریشه و اندام هوایی تعیین کرده و با تاثیر غلظت های متفاوت فلز کروم بر رشد، پارامترهای فتوسنتزی، میزان پروتئین های محلول و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، میزان تحمل گیاه خرفه به تنش کروم مورد سنجش و ارزیابی قرار گیرد و احتمال معرفی خرفه به عنوان کاندیدای مناسبی جهت گیاه پالایی خاک های آلوده به کروم بررسی گردد.

مواد و روش ها

کشت گلدانی گیاه و اعمال تیمارها

به منظور بررسی تاثیر غلظت های مختلف فلز کروم بر رشد، شاخص های فتوسنتزی و آنتی اکسیدانی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. هر واحد آزمایشی در این آزمایش

از یک گلدان به حجم ۳ لیتر تشکیل شد که از خاک مزرعه پر گردید و در آن، ۱۰ عدد بذر *P. oleracea* کاشته شد. برای تیمار کروم، از غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم نمک دی کرومات پتاسیم در یک کیلوگرم خاک استفاده شد. شرایط گلخانه با دمای روز ۲۴-۲۸ درجه سانتی گراد، دمای شب ۱۶-۲۰ سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد با ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی ثابت نگه داشته و گلدان ها هر بار به میزان ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک در آزمایشگاه گروه خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. به این منظور، خصوصیات خاک از جمله بافت خاک (Klute, 1986)، هدایت الکتریکی (Inbar et al., 1993)، اسیدیته (Inbar et al., 1993)، میزان پتاسیم قابل دسترس (Simard, 1993)، فسفر قابل دسترس (Olsen et al., 1954)، نیتروژن کل (Bremner & Mulvaney, 1982) و کروم قابل دسترس (James & Petura, 1995)، قبل از شروع آزمایش تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک قبل از شروع آزمایش

اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS.m ⁻¹)	میزان عناصر غذایی (ppm)				بافت خاک
		کروم قابل دسترس	نیتروژن کل	فسفر قابل دسترس	پتاسیم قابل دسترس	
۷/۷۵	۱/۱۴	۳/۴۷	۲۹۸	۷/۱	۱۱۸	لوم-سیلتی

گلدان ها در طی ۶۰ روز تا کامل شدن دوره رشد گیاه، ۸ مرتبه (هفته ای یک بار) تا حد ظرفیت مزرعه با محلول های دی کرومات پتاسیم و گلدان های شاهد با آب مقطر آبیاری شدند. پس از ۶۰ روز اندام های هوایی و ریشه گیاهان برداشت شدند. طول اندام هوایی و ریشه گیاه اندازه گیری شد، هم چنین وزن خشک اندام هوایی و ریشه پس از قرار گرفتن در آون (دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت) به طور جداگانه با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ تعیین شد.

تعیین غلظت کروم (VI) موجود در خاک

برای اندازه گیری کروم شش ظرفیتی از مخلوط کربنات سدیم ۰/۲۸ مولار و سود ۰/۵ مولار برای عصاره گیری از خاک استفاده شد و پس از سانتریفیوژ مقدار کروم شش ظرفیتی با استفاده از متد دی فنیل کربازاید در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر UV اندازه گیری شد (James & Petura, 1995).

تعیین غلظت کروم (VI) موجود در اندام های هوایی و ریشه های گیاه

نمونه های ریشه و اندام هوایی به صورت جداگانه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت در آون قرار داده شدند. برای تعیین کروم شش ظرفیتی از هضم قلیایی با استفاده از روش EPA استفاده شد. نمونه ها پس از هضم با معرف ۵۱-۵ دی فنیل کربازاید واکنش داده و میزان کروم شش ظرفیتی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شدند (USEPA, 1996).

تعیین پارامترهای تثبیت کربن

میزان تثبیت دی اکسید کربن و میزان تعرق در ۱ سانتی متر مربع از سطح برگ جوان با دستگاه - Infra red Gas Analyzer IRGA, LCA4, ADC Bio Scientific Ltd., Herfordshire, UK) اندازه گیری شد. کارایی لحظه ای مصرف آب نیز از نسبت میزان اسیمیلاسیون دی اکسید کربن به میزان تعرق محاسبه شد (Ahmed *et al.*, 2002).

تعیین شاخص های فتوسنتزی

میزان کارایی فتوسیستم II ژنوتیپ ها بوسیله دستگاه کلروفیل فلورومتر اندازه گیری و ثبت شد. برای اندازه گیری میزان کارایی فتوسیستم II، ابتدا سطح برگ های جوان توسعه یافته با قرارگرفتن گیره بر روی آنها به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط تاریکی قرار گرفت و سپس با اتصال رابط دستگاه به برگ و تنظیم دستگاه، کارایی فتوسیستم II، بوسیله دستگاه کلروفیل فلورومتر مدل OS5-FI اندازه گیری شد. نسبت Fv (تفاوت حداکثر فلوئورسانس با حداقل فلوئورسانس [Fm-F0]) به Fm (حداکثر فلوئورسانس) توسط دستگاه اندازه گیری شد. کارایی فلوئورسانس در غیاب نور فتوسنتزی است که همان حداقل فلوئورسانس است که با استفاده از یک نور ضعیف ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) اندازه گیری شد. Fm (حداکثر فلوئورسانس) با استفاده از یک نور اشباع ($8000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) به مدت ۰/۸ ثانیه اندازه گیری شد (Maxwell & Johnson, 2000).

سنجش میزان کلروفیل ها و کاروتنوئیدها

برای سنجش میزان کلروفیل ها و کاروتنوئیدها از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. به این منظور ابتدا ۰/۱ گرم برگ با ۴ میلی لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد و جذب محلول رویی جهت تعیین میزان کلروفیل ها و کاروتنوئید توسط اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۴۷، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها از طریق معادله های زیر محاسبه گردید.

$$\text{معادله (۱)} \quad b \text{ کلروفیل (Chlb) (mg/ml)} = \frac{21}{21A_{647} - 5/1A_{664}} \quad (1)$$

$$\text{معادله (۲)} \quad a \text{ کلروفیل (Chla) (mg/ml)} = \frac{12}{25A_{664} - 79/1A_{647}} \quad (2)$$

$$\text{معادله (۳)} \quad \text{کلروفیل کل (TChl) (mg/ml)} = \text{chla} + \text{chlb} \quad (3)$$

$$\text{معادله (۴)} \quad \text{کاروتنوئید (mg/ml)} = \frac{(1000 A_{470} - 1/8 \text{ chla} - 85/0.2 \text{ chlb})}{198} \quad (4)$$

$$\text{معادله (۵)} \quad \text{CSI} = \frac{\text{کلروفیل کل در شرایط بدون تنش}}{\text{کلروفیل کل در شرایط تنش}} \times 100 \quad (\text{Sairam et al., 1997}) \quad (5)$$

A_{647} : میزان جذب نوری در طول موج ۶۴۷ نانومتر، A_{664} : میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۴ نانومتر و A_{470} : میزان جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر می باشد.

تعیین غلظت پروتئین محلول

برای سنجش پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد، استخراج پروتئین های محلول به وسیله ی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با $pH=7/4$ و با نسبت استخراج (w:v) ۱:۲۰ صورت گرفت. از آلومین سرم گاوی با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر به منزله استاندارد استفاده و قرائت نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۲ میلی لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار ($pH=5$) با ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه ۰/۳ درصد و ۰/۱ میلی لیتر بنزیدین ۰/۰۲ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد در حمام یخ مخلوط شدند و سپس ۰/۱ ملی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و جذب نمونه های به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. پس از رسم منحنی تغییرات جذب، فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم پروتئین محاسبه شد (Holy, 1972).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Scandalios و Chandlee (۱۹۸۴) انجام شد. ابتدا ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار ($pH=7$) و ۰/۳ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شدند و بلافاصله ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ تا ۴ دقیقه بررسی شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم پروتئین محاسبه شد.

تحلیل داده ها

پس از اندازه گیری صفات مورد بررسی، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با سه تکرار بوسیله نرم افزارهای JMP و MSTAT C صورت گرفت و سپس نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

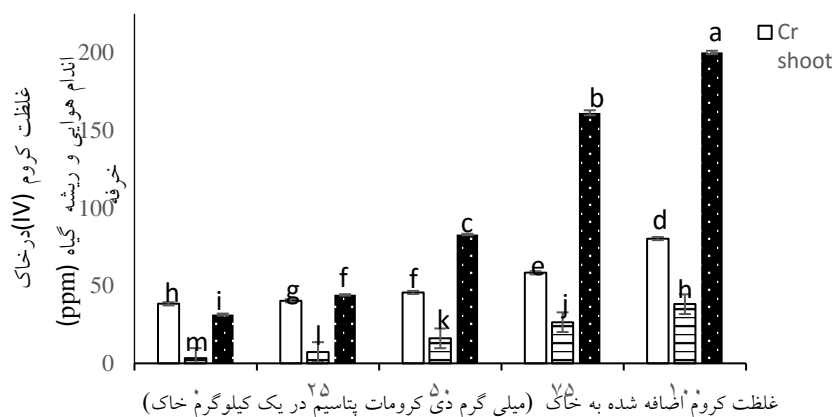
غلظت کروم (VI) در خاک، اندام هوایی و ریشه ی گیاه

براساس نتایج پژوهش حاضر با افزایش غلظت کروم در محیط کشت گیاه خرفه، غلظت کروم شش ظرفیتی در اندام هوایی، ریشه

و خاک نیز به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.01$) (شکل ۱). این روند افزایشی در نمونه های ریشه و خاک مشخص تر بود. به طوری که میزان کروم شش در نمونه های خاک، اندام هوایی و ریشه گیاهان کاشته شده در سطح ۱۰۰ پی پی ام به ترتیب حدود ۱۱، ۲ و ۶/۵ برابر محتوای کروم موجود در نمونه های شاهد بود. هم چنین، با مقایسه غلظت های کروم در نمونه ها مشخص شد که غلظت کروم در ریشه خرفه بیش از بخش هوایی و خاک بود. بر اساس شکل ۱، در غلظت ۱۰۰ پی پی کروم، میزان کروم موجود در ریشه به ترتیب حدود ۲/۵ و ۵ برابر محتوای کروم در اندام هوایی و خاک است

مطابق با نتایج این تحقیق، با افزایش غلظت کروم در محیط، میزان این فلز در بافت گیاه به طور معنی داری افزایش یافت (Khavarinejad *et al.*, 2016). انباشت کروم در بخش های مختلف گیاه، متفاوت است. از بین این بخش ها درخرفه ریشه ها بیشترین مقدار جذب را دارند. تجمع بیش تر کروم در ریشه گیاهان نسبت به بخش های هوایی توسط Pirooz و همکاران (۲۰۱۲) روی گیاه آفتابگردان و Dogo و همکاران (۲۰۱۱) روی گیاه نعنای گزارش شد. این نتایج با نتایج گزارش شده در مورد گیاهان گندم، ذرت و گل کلم نیز مطابقت داشت (Sharma *et al.*, 2003; Vajpayee *et al.*, 2000); Kim و همکاران (۲۰۰۳) تجمع ۳۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروم در ریشه ها و ۲۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروم در اندام های هوایی گیاه *Leersia hexandra* را گزارش کردند.

کروم ابتدا بواسطه سیستم ریشه ای از خاک گیاهان جذب و در غلظت های بالایی در بافت های ریشه ذخیره می شود، زیرا در انتقال کروم از ریشه به اندام هوایی محدودیت وجود دارد که دلیل این امر اتصال یون کروم در جایگاه های تبادل کاتیونی در ریشه و در نتیجه غیر متحرک شدن آن می باشد (Vajpayee *et al.*, 2000). جذب کروم به وسیله ی بافت های گیاهی به طور مثبت با محتوای این فلز در خاک مرتبط بود (Shanker *et al.*, 2005). با توجه به نتایج، میزان کروم در خاک نسبت به مقدار این فلز در ریشه و اندام هوایی کم تر است، یکی از دلایل کاهش میزان کروم شش در خاک، جذب آن ها به وسیله ی ریشه و انتقال قسمت ناچیزی از کروم به اندام هوایی است (Azizi *et al.*, 2016). هم چنین ممکن است کروم (VI) به فرم کروم (III) در خاک تبدیل شود که کروم (III) به دلیل سمیت کم تر مورد اندازه گیری قرار نگرفت. بنابراین، با توجه به تجمع بسیار بالاتر کروم در ریشه نسبت به اندام های هوایی گیاه خرفه، به نظر می رسد در این تحقیق کلیت شدن و کده بندی یون های کروم در ریشه یک مکانیسم مقاومتی است که گیاه خرفه در تنش فلز سنگین کروم اتخاذ کرده است .



شکل ۱: غلظت کروم (VI) در خاک، اندام هوایی و ریشه گیاه خرفه تیمار شده با غلظت های مختلف کروم

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر شاخص های رشد

نتایج این بررسی نشان داد که غلظت های مختلف کروم سبب تغییرات معنی داری در رشد گیاه نسبت به شاهد ($P < 0.05$) شد (جدول ۲). بیشترین میزان طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان شاهد و کمترین میزان آن در گیاهان کاشته شده در خاک با غلظت ۷۵ پی پی ام مشاهده شد (جدول ۲). به طوری که، در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، افزایش چشمگیری در میزان طول اندام هوایی و ریشه نسبت به غلظت ۵۰ پی پی ام و ۷۵ پی پی ام کروم وجود داشت و میزان طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نزدیک به مقدار آن ها در گیاهان شاهد شد (جدول ۲). طبق نتایج مندرج در جدول ۲، وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز روند کاهشی مشابهی با طول اندام هوایی و ریشه داشتند، به طوری که وزن خشک اندام هوایی گیاه شاهد نسبت به وزن خشک اندام هوایی گیاهان کاشته شده در سطح ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام به ترتیب ۱۸/۵ و ۲ برابر بود. هم چنین بیش ترین و کم ترین وزن خشک ریشه به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد (۰/۰۷۰ گرم) و تیمار در سطح ۷۵ پی پی ام کروم (۰/۰۰۷ گرم) بود.

در بررسی اثر کروم بر رشد و عملکرد گیاهان مشخص شد که عملکرد گیاهان، تحت تنش کروم کاهش می یابد. این نتایج در پژوهش های Subrahmanyam (۲۰۰۸) بر روی گندم (*Triticum sativum*) و Zou و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ذرت (*Zea mays*) نشان داده شده است. کروم منجر به عدم توسعه و گسترش سیستم ریشه ای می گردد. با کاهش سطوح جذب کننده و تغییر در ساختار غشای سلولی، جذب آب کاهش می یابد. بنابراین محتوای آب گیاه افت می کند که این امر بر فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تعرق، تنفس و فتوسنتز اثر کرده و نهایتاً موجب کاهش رشد در سایر بخش های گیاه خواهد شد (Sanita et al., 2002). مهار رشد ریشه توسط کروم می تواند به علت سمیت کروم در تقسیم سلولی، ایجاد اختلال در روابط اسموتیک گیاه، کاهش جذب و تثبیت نترات یا محدودیت در انتقال Ca^{+2} از طریق غشای پلاسمایی باشد (Lodeiro et al.,

(2008; Sanita *et al.*, 2002; Orhue & Uzu, 2011) بر طبق گزارش Shanker و همکاران (۲۰۰۵)، کروم (VI) باعث کاهش در غلظت عناصر Ca, K, Mg, P, B و Cu در خاک های مربوط به سویای رشد یافته شد. هم چنین، کاهش زیست توده هوایی بدلیل کاهش رشد ریشه ها و به دنبال آن کاهش انتقال آب و مواد معدنی از ریشه ها به بخشهای هوایی گیاه می باشد (Khavarinejad *et al.*, 2016). بنابراین، براساس نتایج مربوط به شاخص های رشد به نظر می رسد، گیاه تا سطح ۷۵ پی پی ام کروم را تحمل کرده و پس از آن مکانیسم های دفاعی خود را فعال نموده تا از این طریق نه تنها اثرات سو ایجاد شده را جبران کند، بلکه کاهش رشد ناشی از تنش کروم را نیز تا حدودی برطرف سازد.

جدول ۲: وزن خشک و طول اندام هوایی و ریشه ی گیاه خرفه تیمار شده با غلظت های مختلف کروم

کروم (ppm)	طول اندام هوایی (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g)	طول ریشه (cm)	وزن خشک ریشه (g)
۰	۱۶ ^a ± ۰/۵۸	۰/۱۷ ^a ± ۰/۰۴	۸/۰۰ ^a ± ۰/۵۸	۰/۰۷ ^a ± ۰/۰۱
۲۵	۶ ^c ± ۰/۰۰	۰/۰۳ ^{bc} ± ۰/۰۱	۵/۵۰ ^b ± ۰/۲۹	۰/۰۴ ^{ab} ± ۰/۰۰
۵۰	۳/۰۳ ^d ± ۰/۰۳	۰/۰۱ ^c ± ۰/۰۰	۲/۹۰ ^c ± ۰/۳۸	۰/۰۱ ^b ± ۰/۰۰
۷۵	۲/۵ ^d ± ۰/۳۱	۰/۰۱ ^c ± ۰/۰۰	۲/۰۰ ^c ± ۰/۵۰	۰/۰۱ ^b ± ۰/۰۰
۱۰۰	۱۰/۱۰ ^b ± ۰/۵۵	۰/۰۹ ^b ± ۰/۰۲	۵/۶۶ ^b ± ۰/۳۳	۰/۰۴ ^{ab} ± ۰/۰۰

میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

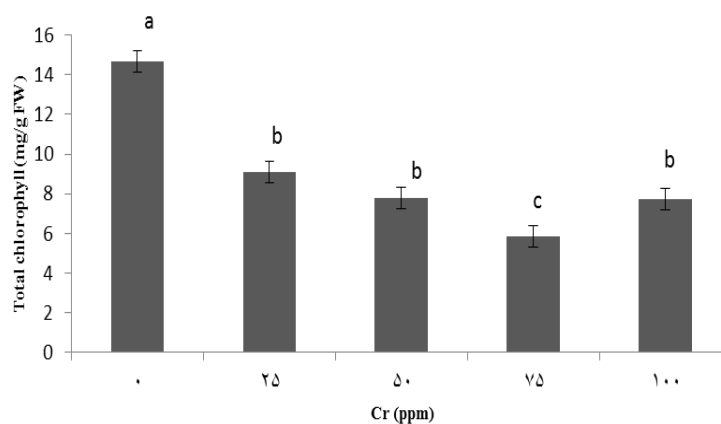
اثر سطوح مختلف کروم بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت کروم در خاک از سطح صفر به ۱۰۰ پی پی ام میزان کلروفیل a و محتوای کاروتنوئیدی گیاهان مورد بررسی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.01$) (جدول ۳). به طوری که بیش ترین و کم ترین میزان کلروفیل a و کاروتنوئید به ترتیب مربوط به شرایط بدون کروم و تحت تنش ۱۰۰ پی پی ام بود (شکل ۳ و جدول ۵). میزان کلروفیل کل و b نیز در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد معنی دار بودند (جدول ۳). ولی بر خلاف روند موجود در کلروفیل a و کاروتنوئیدها، میزان کلروفیل کل و b در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، افزایش چشمگیری نسبت به غلظت ۵۰ پی پی ام و ۷۰ پی پی ام کروم نشان داد و میزان کلروفیل کل و b در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نزدیک به مقدار آن ها در گیاهان شاهد شد (شکل ۲ و جدول ۵). میزان کلروفیل کل و b در گیاهان شاهد به ترتیب ۲/۵ و ۵ برابر مقدار آن ها در گیاهان کاشته شده در خاک با غلظت ۷۵ پی پی ام بود (شکل ۲ و جدول ۵). بالاترین و پایین ترین نسبت کلروفیل a/b به ترتیب مربوط به غلظت ۷۵ پی پی ام و ۱۰۰ پی پی ام بود. در گیاهان شاهد، نسبت کلروفیل a/b از گیاهان با غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ پی پی ام پایین تر بود (جدول ۵). همبستگی مثبتی بین کروم و نسبت کلروفیل a/b مشاهده شد ($R^2 = 0.76$) (شکل ۴). در سطح شاهد میزان کلروفیل a و b تقریباً یکسان بوده است، بنابراین نسبت بین آنها نیز حدود یک است. با اعمال تنش روند کاهشی در هر دو نوع کلروفیل قابل مشاهده است ولی به دلیل کاهش شدیدتر میزان کلروفیل b نسبت به a تا سطح تنش ۷۵ روند افزایشی در نسبت کلروفیل a به b مشاهده شد (جدول ۵). همبستگی مثبتی بین میزان کلروفیل و میزان کاروتنوئید در گیاهان مورد

بررسی مشاهده شد ($R^2=0/82$) (شکل ۵). ضریب ثبات کلروفیل نیز در غلظت های مختلف کروم متفاوت بود. غلظت ۷۵ پی پی ام کمترین و غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم بیشترین ضریب ثبات کلروفیل را به خود اختصاص دادند (جدول ۵).

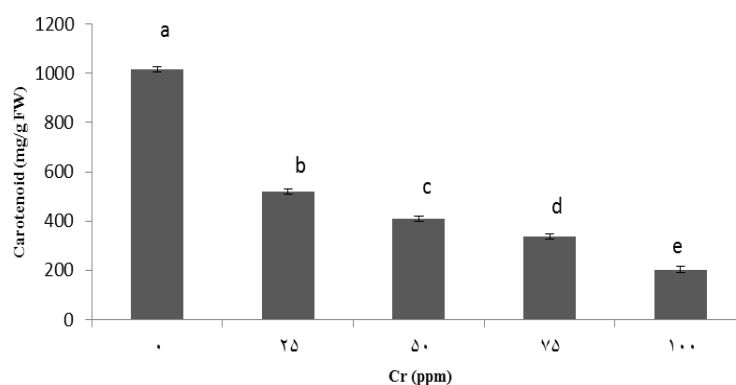
مطابق با نتایج این تحقیق، کاهش تدریجی میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهچه های سویا تحت تیمار با افزایش غلظت کروم نیز مشاهده شد (Sundarmoorthy *et al.*, 2015) و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای بر روی ذرت بیان کردند که کاهش محتوای کلروفیل در راستای افزایش کروم شش، مربوط به مهار مستقیم سنتز رنگیزه های فتوسنتزی است، به طوری که کروم جذب شده به وسیله گیاهان باعث مهار و تجزیه ی آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز کلروفیل می شود و در نهایت، میزان کلروفیل کاهش می یابد. علاوه بر این کروم سبب افزایش تخریب کاروتنوئیدها نیز می گردد (Azmat *et al.*, 2010). به این ترتیب، Sundarmoorthy و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که کاهش فعالیت آنزیم های دلتا آمینولولولینیک اسید دهیدروژناز و فتوکلرو فیلید ردوکتاز منجر به کاهش رنگیزه های فتوسنتزی در گیاه *Nymphaea alba* تحت تیمار با کروم شد. هم چنین، میزان بالای کروم از اتصال منیزیم درون مولکول پروتوپورفیرین جلوگیری می کند، در نتیجه محتوای رنگدانه های کلروفیل کاهش می یابد (Khavarinejad *et al.*, 2016). جانشینی فلزات سنگین با فلزات ضروری در سلول های گیاهی نیز رخ می دهد، از آنجائیکه فلزات ضروری در تشکیل رنگیزه ها و آنزیم ها نقش مهمی دارند بنابراین تشکیل رنگیزه ها دچار اختلال می شود (Barcelo & Poschenrieder, 2004). به طوری که Zou و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که کروم به فرم شش ظرفیتی می تواند جایگزین یون های منیزیم در جایگاه فعال آنزیم های مختلف شود و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را کاهش دهد. بنابر نتایج حاصل از این بررسی می توان گفت که افزایش میزان کروم در خاک احتمالاً از طریق دخالت در مسیر بیوسنتز رنگیزه های فتوسنتزی سبب کاهش بیوسنتز و یا افزایش تخریب رنگیزه های فتوسنتزی شده و متعاقباً کارایی فتوسنتزی گیاه را کاهش داده است. Davies و همکاران (۲۰۰۲) کروم را بعنوان بازدارنده فتوسنتز و فتوسیستم II معرفی کرده اند که این بازدارندگی به تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) نسبت داده می شود. عملکرد فتوسیستم II از جمله مواردی است که به شدت تحت تاثیر تنش غیر زیستی قرار می گیرد، لذا میزان پلاستیدهای جدید، کلروفیل a و b و همچنین کاروتنوئید کاهش می یابد (Zarafshar *et al.*, 2015). با توجه به افزایش میزان کلروفیل کل و b در سطح ۱۰۰ پی پی ام نسبت به سطوح پایین تر کروم، می توان اینگونه نتیجه گیری نمود که احتمالاً این گیاه از طریق افزایش میزان کلروفیل کل و b، مکانیسم های دفاعی خود را جهت تحمل سطوح بالای تنش و کاهش تنش اکسیداتیو فعال می کند و حتی تا حدودی اثرات تخریبی ناشی از تنش جبران می شود. افزایش معنی دار میزان کلروفیل b در سطح تنش ۱۰۰ سبب کاهش شدید این نسبت a/b گردید که این افزایش می تواند به دلیل نقش محافظتی کلروفیل b در تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش کروم باشد. احتمالاً گیاه خرفه از طریق افزایش میزان کلروفیل b توانسته است تا حدودی اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را کاهش دهد (Rahbarian *et al.*, 2011). نسبت کلروفیل a به b شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان تاثیر تنش های غیر

زیستی برگ‌پایه می‌باشد. گزارش‌ها حاکی از آن است که کلروفیل b نسبت به تنش‌های غیر زیستی حساس‌تر از کلروفیل a است و کاهش شدیدتری در میزان آن در شرایط تنش مشاهده می‌شود. بنابراین نسبت کلروفیل a به b در شرایط تنش نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان می‌دهد (Ahmadi & Sio-Se Mardeh, 2004).



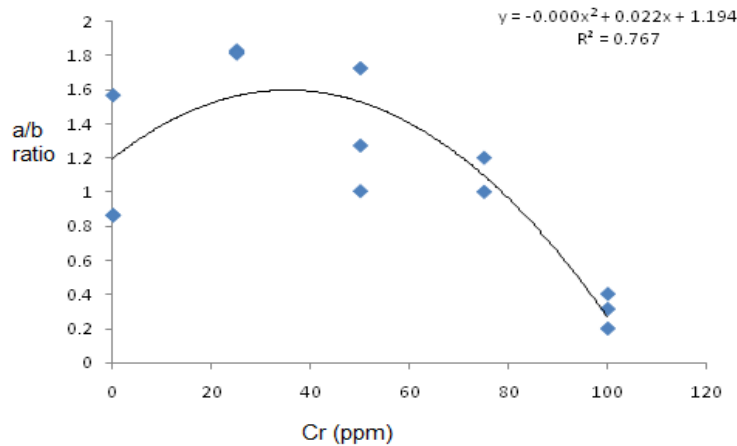
شکل ۲: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین مقدار کلروفیل کل در اندام هوایی گیاه خرفه

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$)

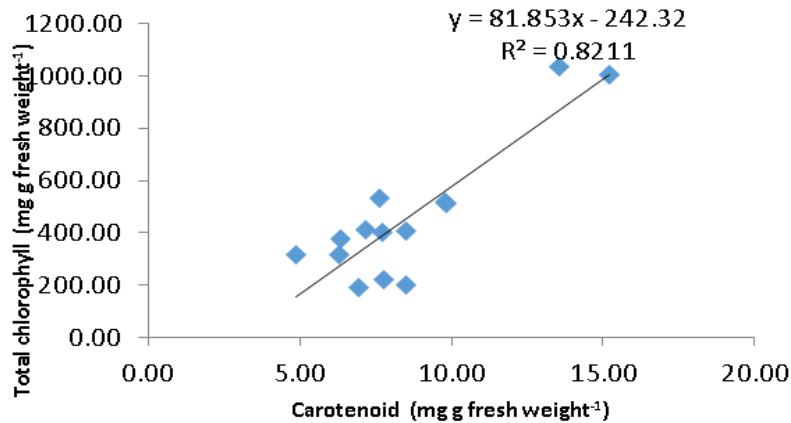


شکل ۳: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین مقدار کاروتنوئیدها در اندام هوایی گیاه خرفه

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$)



شکل ۴: رابطه همبستگی بین مقدار کروم و نسبت کلروفیل a به b در اندام هوایی گیاه خرفه



شکل ۵: رابطه همبستگی بین مقدار کاروتنوئیدها و کلروفیل کل در اندام هوایی گیاه خرفه

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان کارایی فتوسیستم II و نرخ انتقال الکترون

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت کروم در خاک، میزان کارایی فتوسیستم II گیاه خرفه به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/01$) (جدول ۳). به طوری که گیاهان در شرایط بدون کروم حداکثر میزان کارایی فتوسیستم II (۰/۹۳) و در خاک با غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، کمترین میزان کارایی فتوسیستم II (۰/۶۲) را به خود اختصاص دادند (جدول ۵). گیاهان در شرایط غلظت ۵۰ و ۷۵ پی پی ام کروم از نظر میزان کارایی فتوسیستم II با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۵). کروم اثر معنی داری بر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی نداشت (جدول ۳). همچنین در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۲۵ پی پی ام کروم میزان انتقال الکترون فتوسنتزی به طور معنی داری بیشتر از گیاهان تحت تیمار با غلظت ۷۵ پی پی ام کروم بود (جدول ۵). سایر سطوح کروم تفاوت معنی داری از نظر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی نشان ندادند، همچنین کروم به طور معنی داری میزان کارایی فتوسیستم II را کاهش داد (جدول ۵). با توجه به افزایش میزان انتقال الکترون در رنجیره انتقال

الکترون فتوسنتزی و کاهش کارایی فتوسنتزی با افزایش میزان کروم در خاک، می توان نتایج را اینگونه تفسیر نمود که به دلیل تخریب کلروفیل های a و b در فتوسیستمها تحت تنش کروم، انتقال الکترون در مسیر نوری فتوسنتز افزایش یافته ولی قسمتی از انرژی حاصل از مسیر انتقال الکترون به صورت فلئوئورسانس هدر رفته که باعث کاهش کارایی فتوسنتزی شده است و تعدادی از الکترون ها به مولکول های اکسیژن انتقال یافته اند که سبب تشکیل گونه های اکسیژن فعال و ایجاد استرس اکسیداتیو شده اند. Fv/Fm حداکثر کارایی کوانتومی سامانه نوری II است. کاهش Fv/Fm بیانگر اثر اکسیداتیو یا بازدارندگی نوری عوامل تنش زای محیطی از قبیل عناصر سنگین، روی فتوسیستم II می باشد (Maxwell & Johnson, 2000). کاهش Fv/Fm در پاسخ به افزایش کروم خاک با گزارش های سایر محققین در کاهو (Dias *et al.*, 2013) تحت تیمار با کادمیوم مطابقت داشت.

براساس نتایج این تحقیق، افزایش کروم به عنوان یک فلز سنگین در خاک سبب افزایش میزان جذب آن توسط گیاه و در نتیجه افزایش غلظت این فلز در بافت های گیاهی می گردد. سمیت Cr^{6+} ناشی از فعالیت عوامل اکسیدکننده و شکل گیری رادیکالهای آزاد درون سلولهای گیاهی می باشد (Shanker & Pathmanabhan, 2004). در بررسی های مشابه، رابطه خطی بین افزایش میزان کروم با شدت تنش اکسیداتیو توسط Zou و همکاران (۲۰۰۹) و Panda (۲۰۰۷) و Pandey و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. کروم شش باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال می شود که این گونه های اکسیژن فعال از طریق افزایش تخریب رنگیزه های فتوسنتزی و یا مهار فعالیت آنزیم های دخیل در مسیر بیوسنتز رنگیزه های فتوسنتزی، همچنین از طریق آسیب به مولکولهای زیستی نظیر لیپیدها، پروتئین ها و بالاحص اسیدهای نوکلئیک، سبب کاهش میزان کارایی فتوسنتزی گیاه می گردند (Olutoyosi *et al.*, 2012). به دلیل قدرت اکسید کنندگی بالای کروم شش ظرفیتی، امکان افزایش میزان گونه های اکسیژن فعال از طریق انتقال الکترون های اضافی در مسیر نوری فتوسنتز به اکسیژن مولکولی وجود دارد (Liu *et al.*, 2008 ; Shamsu *et al.*, 2012). کروم هم چنین می تواند سبب تغییرات فراساختاری در کلروپلاست گردد و از این طریق سبب مهار فتوسنتز در سلول های گیاهی شود. غلظت های بالای کروم (۱ میلی مولار) سبب تخریب کامل غشاء کلروپلاستی و همچنین بهم ریختگی نظم تیلاکوئیدها می شود که نشان دهنده اثرات سمی کروم ۶ می باشد (Castro *et al.*, 2007)

جدول ۳: تجزیه واریانس میزان کارایی فتوسیستم II، انواع کلروفیل ها، نسبت کلروفیل a/b، کاروتنوئیدها و نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR) در گیاه خرفه در شرایط تنش کروم

Sum square							dF	منابع تغییر
carotenoid	ETR	Total Chl	Chl.b	a/b ratio	Chl. a	Fv/Fm		
۲۹۱۸۸۹/۰.***	۶۵/۲۷ns	۳۳/۷۶**	۱۸/۵۴**	۶۱/۱۸ ^{ns}	۱۲/۶۹**	۰/۰۵**	۴	Cr
۳۶۳	۱۲۰۷/۱۴	۰/۸۵	۲/۱۷	۱۸/۱۲	۰/۰۵	۰/۰۰	۲۰	Error
							۲۴	total

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می باشد.

جدول ۴: تجزیه واریانس میزان اسیمیلاسیون دی اکسید کربن (A)، تعرق (E)، هدایت روزنه ای و کارایی لحظه ای مصرف آب (WUE) گیاه خرقة در شرایط تنش کروم

Catalase	Protein peroxidase	WUE (mg/gFW)	Stomatal conductance (mmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	dF	منابع تغییر
							Sum square
**							Cr
۰/۰۱	۰/۴۸**	۰/۹*	۷۱۶۵۹۵/۶۹**	۰/۰۵**	۰/۲۴**	۱/۱۹**	۴
۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۱۸	۹۸۳۷۸/۹۴	۰/۰۲	۰/۵۸	۱/۴۴	۲۰
							۲۴ total

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ می باشد.

جدول ۵: تغییرات میانگین میزان کارایی فتوسیستم II (Fv/Fm)، نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR)، کلروفیل a و b، ضریب ثبات کلروفیل (CSI)، نسبت کلروفیل a/b در گیاه خرقة تحت سطوح مختلف کروم

a/b	(%) CSI	Chl. b (mg/g fresh weight)	Chl. a (mg/g fresh weight)	Fv/Fm	Cr (ppm)
۱/۰۲ ^{bc} ± ۰/۳۱	۶۳ ^{ab}	۷/۰۶ ^a ± ۱/۱۰	۷/۲۳ ^a ± ۰/۱۸	۰/۹۳ ^a ± ۰/۰۲	شاهد
۲/۲۶ ^{ab} ± ۰/۸۸	۶۱/۹ ^{ab}	۲/۷۸ ^b ± ۰/۶۰	۶/۳۰ ^b ± ۰/۰۳	۰/۸۵ ^b ± ۰/۰۱	۲۵
۱/۲۷ ^{bc} ± ۰/۲۰	۵۳/۲۰ ^{ab}	۳/۴۲ ^b ± ۰/۴۰	۴/۳۷ ^c ± ۰/۰۸	۰/۷۱ ^c ± ۰/۰۰	۵۰
۳/۳۳ ^a ± ۱۰/۱۰	۳۸/۱۰ ^b	۱/۳۵ ^b ± ۰/۵۰	۴/۵۰ ^c ± ۰/۰۶	۰/۷۰ ^c ± ۰/۰۰	۷۵
۰/۲۸ ^c ± ۰/۶۰	۷۸/۴۰ ^a	۶/۶۰ ^a ± ۱/۱۰	۱/۸۸ ^d ± ۰/۱۷	۰/۶۲ ^d ± ۰/۰۱	۱۰۰

میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند (P < ۰/۰۵)

جدول ۶: تغییرات میانگین میزان نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی (ETR)، هدایت روزنه ای، کارایی مصرف آب (WUE)، تعرق (E) و اسیمیلاسیون دی اکسید کربن (A) در گیاه خرقة تحت سطوح مختلف کروم

A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	WUE	stomatal conductance (mmol m ⁻² s ⁻¹)	ETR (μmol electron m ⁻² s ⁻¹)	Cr (ppm)
۸۲۱/۲۸ ^a ± ۳/۲۱	۰/۱۷ ^a ± ۰/۰۲	۰/۰۵ ^c ± ۰/۰۰	۰/۱۳ ^a ± ۰/۲۶	۱۸۹۲/۵۸ ^{ab} ± ۲/۳۶	شاهد
۸۶۸/۴۹ ^c ± ۱/۲۱	۰/۳۱ ^a ± ۰/۰۲	۰/۰۲ ^d ± ۰/۰۰	۰/۳۴ ^b ± ۰/۰۱	۱۹۰۳/۰۰ ^a ± ۰/۰۱	۲۵
۸۷۰/۹۳ ^c ± ۱/۶۱	۰/۳۰ ^b ± ۰/۰۴	۰/۰۳ ^d ± ۰/۰۱	۰/۲۲ ^c ± ۰/۰۱	۱۸۳۸/۷۶ ^{bc} ± ۱۳/۴۵	۵۰
۸۷۸/۹۰ ^b ± ۱/۲۹	۰/۱۶ ^c ± ۰/۰۳	۰/۰۶ ^b ± ۰/۰۰	۰/۱۴ ^e ± ۰/۰۰	۱۸۴۲/۱۸ ^{bc} ± ۱۴/۷۴	۷۵
۹۰۷/۱۲ ^a ± ۱/۱۳	۰/۰۵ ^d ± ۰/۰۳	۰/۱۷ ^a ± ۰/۰۱	۰/۱۸ ^d ± ۰/۰۱	۱۸۹۰/۵۶ ^{ab} ± ۱/۷۵	۱۰۰

میانگین هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند (P < ۰/۰۵)

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان تثبیت دی اکسید کربن

با افزایش غلظت کروم در خاک از سطح صفر به ۲۵ m پی پی ام، میزان تثبیت دی اکسید کربن نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی داری افزایش نشان داد (جدول ۴) (P < ۰/۰۵). روند افزایشی میزان اسیمیلاسیون CO₂، با افزایش غلظت کروم تا سطح ۱۰۰ پی پی ام نیز ادامه یافت. به طوری که گیاهان در شرایط بدون کروم کمترین میزان تثبیت CO₂ و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیشترین میزان تثبیت را به خود اختصاص دادند (جدول ۶). گیاهان با غلظت ۲۵ و ۵۰ پی پی ام تفاوت معنی داری از نظر میزان تثبیت دی اکسید کربن با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۶).

براساس نتایج این تحقیق، کروم از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیمها و تثبیت دی اکسید کربن، بر فتوسنتز گیاه تاثیر می گذارد. کروم در مقدار میکرومولار می تواند اثرات سمی بر فرایند فتوسنتز در سلول های گیاهی اعمال نماید و سبب تغییرات فراساختاری در کلروپلاست و در نتیجه آن مانع انجام عمل فتوسنتز در سلول های گیاهی گردد (Shamsu et al., 2012). کاهش اسیمیلاسیون دی اکسید کربن در شرایط تنش فلزات سنگین به دلیل ذخیره شدن و تجمع ATP و محدود شدن سنتز ریبولوز بیس فسفات و یا مهار فعالیت آنزیم های فتوسنتزی مثل روبیسکو می باشد. بنابراین فرآیند فتوسنتز تولید مجدد ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات (ظرفیت کربوکسیلاسیون روبیسکو) را کنترل می کند. تولید مجدد ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات از طریق غیر فعال شدن و یا کمتر شدن فعالیت آنزیم های سیکل کالوین و عدم مصرف ATP محدود می شود. افزایش میزان تثبیت دی اکسید کربن در شرایط تنش در گیاه خرفه می تواند به دلیل فعال شدن پاسخ های دفاعی گیاه در برابر تنش باشد. بنابراین احتمالا گیاه خرفه در شرایط تنش کروم، مکانیسم های دفاعی از قبیل افزایش فعالیت آنزیم های دخیل در تثبیت دی اکسید کربن را جهت جلوگیری از کاهش تثبیت دی اکسید کربن مورد استفاده قرار می دهد (Jianmin et al., 2012).

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان تعرق، هدایت روزنه ای و کارایی لحظه ای مصرف آب

کروم اثر معنی داری بر میزان تعرق در گیاهان ایجاد نمود (جدول ۴). در گیاهان با غلظت ۲۵ پی پی ام، میزان تعرق نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی داری یافت ($P < 0/05$) (جدول ۶). میزان تعرق با افزایش غلظت کروم از سطح ۲۵ پی پی ام تا سطح ۱۰۰ پی پی ام در خاک روند کاهشی نشان داد و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم، کمترین میزان تعرق مشاهده شد ($P < 0/05$) (جدول ۶). سطوح ۲۵ و ۵۰ پی پی ام کروم میزان تعرق بالاتری نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند، در حالیکه میزان تعرق در سطوح ۷۵ پی پی ام و ۱۰۰ کمتر از گیاهان شاهد بود (جدول ۶).

در بررسی حاضر مشخص شد که اعمال تنش کروم با اثرات تخریبی خود بر ساختار سلول های گیاهی بویژه سلول های نگهبان روزنه، سبب افزایش میزان تعرق و هدایت روزنه ای شده است ولی با ادامه روند افزایشی در میزان کروم گیاه توانسته است با فعال سازی مکانیسم های دفاعی و ترمیمی اثرات تخریبی تنش را کاهش دهد و از اتلاف آب جلوگیری نماید. از این رو در غلظت های بالا (۷۵ و ۱۰۰) کاهش میزان تعرق و هدایت روزنه ای در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد که می تواند یک پاسخ دفاعی به تنش محسوب گردد. با افزایش غلظت کروم در خاک، هدایت روزنه ای در گیاهان مورد بررسی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$) (جدول ۴). این روند کاهشی میزان هدایت روزنه ای نسبت به گیاهان شاهد تا سطح ۱۰۰ پی پی ام ادامه یافت. با این حال میزان هدایت روزنه ای در غلظت ۱۰۰ پی پی ام نسبت به غلظت ۷۵ پی پی ام افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۶).

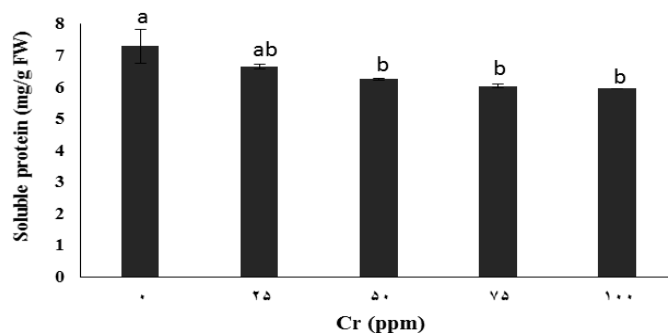
با افزایش غلظت کروم در سطح ۷۵ و ۱۰۰ پی پی ام، کارایی لحظه ای مصرف آب نیز روند افزایشی نشان داد به طوریکه در بیشترین غلظت کروم (۱۰۰ پی پی ام) بیشترین میزان کارایی لحظه ای مصرف آب نیز مشاهده گردید ($P < 0.05$) (جدول ۶). کارایی مصرف آب در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۲۵ و ۵۰ پی پی ام کروم به طور معنی داری کمتر از گیاهان شاهد بود ولی با این دو یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۶).

کروم سبب مهار انتقال آب از ریشه به اندام هوایی می گردد. بنابراین تنش کروم با روابط آبی گیاه مرتبط می شود. پژمردگی برخی گیاهان در اثر سمیت کروم مشاهده شده است. پتانسیل بالای اکسیداتیو کروم ۶ سبب تخریب غشاء سلول های نگهبان روزنه می گردد و از این طریق سبب کاهش نرخ تعرق و افزایش هدایت روزنه ای و هدر رفتن آب موجود در گیاه می گردد (Arun *et al.*, 2005) در صورت متحمل بودن گیاه به فلزات سنگین، گیاه می تواند با اعمال مکانیسم های دفاعی از تخریب غشاء سلولهای نگهبان جلوگیری نموده و یا از طریق کاهش هدایت روزنه ای و کاهش تعرق در هدر رفتن آب کنترل بیشتری اعمال نماید. علاوه براین، با افزایش میزان کروم در خاک، میزان تثبیت دی اکسید کربن روند افزایشی نشان داد و از طرفی در غلظت های بالای کروم (۲۵ و ۵۰)، گیاه توانست میزان تعرق و هدایت روزنه ای را به طور مناسبی کاهش دهد تا کارایی لحظه ای مصرف آب را تنظیم نموده و اثرات ثانویه ناشی از تنش کروم را تا حدودی جبران نماید (Castro *et al.*, 2007). کاهش هدایت روزنه ای میزان دسترسی سلول های فتوسنتز کننده را به دی اکسید کربن، به عنوان فاکتورهای اصلی فتوسنتز کاهش می دهد که برآیند آن عدم تامین متابولیت های مورد نیاز برای رشد و نمو سلول های گیاهی است (Saremi Rad *et al.*, 2014). در نهایت می توان چنین بیان نمود که گیاه در شرایط تنش جهت جلوگیری از خروج آب از طریق برگ، با وجود آسیب به غشاء سلولی، اقدام به کاهش تبخیر و تعرق از طریق کوتیکول می کنند (Karmollachaab *et al.*, 2013).

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان پروتئین محلول

آنالیز واریانس داده ها نشان داد که تیمار کروم باعث تغییر معنی داری ($P < 0.05$) در میزان پروتئین محلول نسبت به شاهد شده است، به طوری که با افزایش میزان کروم از سطح شاهد به سطح ۵۰ پی پی ام، مقدار پروتئین محلول در اندام هوایی گیاهان خرفه به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۵ و جدول ۴) ولی بین میزان پروتئین در سطوح مختلف کروم تفاوت معنی داری مشاهده نشد و با افزایش میزان کروم روند کاهشی بسیار آهسته در میزان پروتئین قابل مشاهده بود (شکل ۵). بنابر این نتایج به نظر می رسد گیاه خرفه توانسته است با استفاده از مکانیسم های تحمل به تنش از قبیل افزایش میزان پروتئین های آنزیمی از قبیل آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش اسمولیت ها در سلول های گیاهی، از کاهش شدید میزان پروتئین در شرایط تنش کروم جلوگیری نماید و از این طریق اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را به حداقل برساند. مطابق با نتایج این بررسی، John و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که میزان پروتئین های محلول در گیاه *Brassica juncea L.* تیمار شده با

غلظت ۹۰۰ میلی مولار کادمیوم کاهش یافتند. در پژوهش انجام شده توسط Bhardwaj و همکاران (۲۰۰۹)، محتوای پروتئین های محلول با غلظت فلز سنگین سرب و کادمیوم به طور معنی داری کاهش یافت. گزارش شده است که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت های بالای فلز کروم می تواند به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین ها و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک باشد (Pirooz *et al.*, 2012). هم چنین، کاهش در محتوای پروتئین گیاهان تحت تیمار با غلظت های بالای کروم می تواند مربوط به تاثیر ROS باشد که ROS باعث تجزیه و نابودی شمار زیادی از پروتئین های گیاه می شود (Sundarmoorthy *et al.*, 2015).



شکل ۵: اثر سطوح مختلف کروم بر میانگین میزان پروتئین محلول در اندام هوایی خرفه

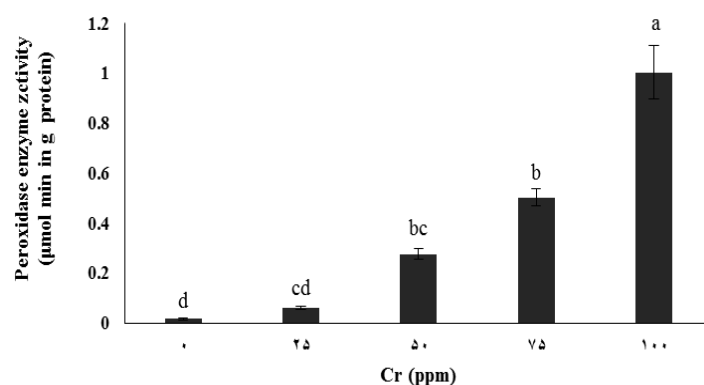
ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

اثر سطوح مختلف کروم بر میزان آنزیم های آنتی اکسیدان

نتایج داده ها نشان داد که کروم تاثیر معنی داری ($P < 0.01$) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز و آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد داشت (جدول ۴). فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به طور معنی دار ($P < 0.01$) هم راستا با افزایش غلظت کروم زیاد شد (شکل ۶ و ۷). به طوری که در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کروم نسبت به نمونه شاهد فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب حدود ۵۷ و ۲ برابر شد (شکل ۶ و ۷). مطابق با نتایج این تحقیق، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان با افزایش غلظت کروم در گیاه سویا نیز زیاد شد (Sundarmoorthy *et al.*, 2015). هم چنین، Malar و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در بافت های برگ و ریشه گیاه *Eichhornia crassipes* تحت تیمار با سرب افزایش یافت. ارزیابی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، به عنوان یک شاخص برای صدمات اکسیداتیو در نظر گرفته می شود. روند تغییر فعالیت هر یک از این آنزیم ها با نوع عنصر ایجادکننده تنش، غلظت عنصر در محیط کشت، آنزیم مورد آزمایش، رقم و اندام گیاهی مورد مطالعه متفاوت است (Wang *et al.*, 2010). بر طبق گزارش Sundarmoorthy و همکاران (۲۰۱۵)، افزایش فعالیت پراکسیداز نشان دهنده قرار گرفتن گیاهان تحت تنش می باشد. پراکسیداز یک آنزیم عمومی برای حذف ROS در گیاه تحت تنش است (Malar *et al.*, 2016). H_2O_2 به وسیله آنزیم کاتالاز جاروب شده و به آب و O_2 تبدیل

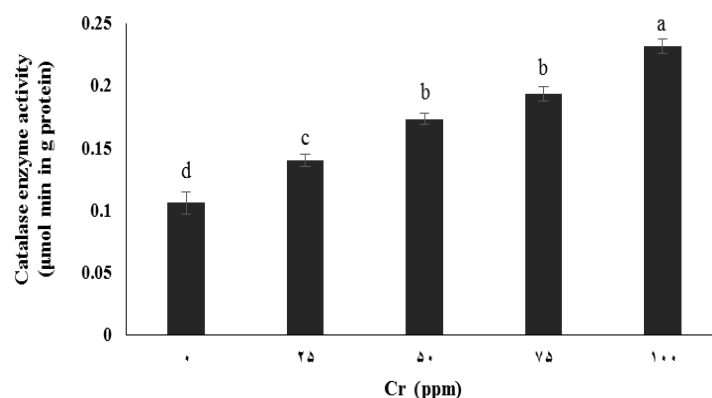
می شود (Pandey *et al.*, 2005). هر چند آنزیم پراکسیداز تمایل بیش تری به H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارند (Malar *et al.*, 2016). تنش اکسیداتیو به عنوان یک تنش ثانویه در پی تنش کروم برای گیاه اتفاق می افتد. به طوری که، از طریق انتقال الکترون های اضافی در مسیر نوری فتوسنتز به اکسیژن مولکولی در گیاهان تحت تنش کروم میزان گونه های اکسیژن فعال افزایش می یابد (Liu *et al.*, 2008).

Shamsu *et al.*, 2012 هم چنین Zare و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در نتیجه اثر مهاری Cr^{3+} بر زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری های سلول های گیاهی می باشد. در پژوهش حاضر، احتمالاً به دلیل قدرت اکسید کنندگی بالای کروم شش ظرفیتی، میزان ROS در سلول افزایش یافته و به دنبال آن فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز برای حذف تنش اکسیداتیو نیز زیاد شده است، که نقش مهمی در حفاظت گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو دارد.



شکل ۶: اثر سطوح مختلف کروم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در برگ خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)



شکل ۷: اثر سطوح مختلف کروم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در برگ خرفه

ستون هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند ($P < 0.05$)

نتیجه گیری کلی

بنابر نتایج حاصل از این پژوهش مشخص گردید که هم راستا با افزایش غلظت های کروم، به دلیل تولید اکسیژن های واکنشگر و ایجاد تنش اکسیداتیو میزان رشد، کلروفیل a، کاروتنوئید، هدایت روزنه ای و تعرق کاهش یافت، در صورتی که میزان تثبیت دی اکسید کربن، کارایی مصرف آب، رشد، ضریب ثبات کلروفیل و میزان کلروفیل b و کل در غلظت ۱۰۰ پی پی ام به طور معنی داری بیشتر از غلظت ۷۵ پی پی ام بود. در نتیجه، گیاه خرفه با فعال نمودن مکانیسم های دفاعی از قبیل افزایش میزان پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (کاتالاز و پراکسیداز) و ترکیبات مهار کننده گونه های اکسیژن فعال نه تنها اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را به حداقل ممکن کاهش داده بلکه توانسته است تا حدودی کارایی مصرف آب و میزان تثبیت دی اکسید کربن در سطحی مناسب حفظ نماید و از کاهش شدید آنها جلوگیری نماید، علاوه براین، از این طریق سطح کلروفیل را نیز در حد مطلوبی حفظ نموده و کاهش رشد ناشی از تنش کروم را نیز تا حدودی برطرف نموده است. بنابراین، گیاه خرفه می تواند کاندیدای مناسبی جهت پالایش خاک های آلوده به کروم معرفی گردد. هم چنین، با توجه به خواص دارویی خرفه و تجمع فلزات سنگین در ریشه گیاه (Azizi *et al.*, 2016)، استفاده از اندام هوایی آن جهت مصارف دارویی کاربرد خواهد داشت و تا حدودی کشت این گیاه را توجیه خواهد نمود.

منابع

- Ahmad, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002) Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to water logging. *Plant Science*. 63(1): 117-123.
- Ahmadi, A. and Sio-Se Mardeh, A. (2004) The Effects of Water Stress on Soluble Carbohydrates, Chlorophyll and Proline Contents of four Iranian Wheat Cultivars under Different Moisture Regimes. *Iranian Journal of Agriculture Science*. 35(3): 753-763. (in Persian)
- Aldoobie, N.F. and Beltagi, M.S. (2013) Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *African Journal of Biotechnology*. 12(29): 4614-4622.
- Alyazouri, A.H., Jewsbury, R.A., Tayim, H.A., Humphreys, P.N. and Al-Sayah, M.H. (2013) Phytoextraction of Cr (VI) from soil using *Portulaca oleracea*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95(8): 1338-1347.
- Arun, K.S., Cervantes, C., Herminia, L.T. and Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31: 739-753.
- Azizi, E., Rahbarian, R. and Mirbolook, A. (2016) Phytoremediation of Cr+6 in Contaminated Soil Using *Portulaca oleracea*. *Iranian Journal of Soil Research*. 30(2): 161-172. (in Persian)
- Azmat, R., Qureshi, S., Akhtar, Y. and Ahmed, T. (2010) Treatment of Cr+3 contaminated soil by solid tea wastage; a study of physiological processes of *Vigna radiata*. *Pakistan Journal of Botany*. 42(2): 1129-1136.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C. (2004) Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. *Heavy metal stress in plants*. Springer, Berlin Heidelberg 2248 Pp.

- Behdani, M.A., Sayyari-Zaha, M.H., Alahrasani, A. and Nakhaei, A.R. (2014) The comparison of micro elements (Mn, Fe and Zn) and heavy metals (Co, Cr and Cd) in the soil of perennial farms of saffron (*Crocus sativus* L.) in southern Khorasan Province. *Agroecology journal*. 6(4): 891-904. (in Persian)
- Bhardwaj, P., Chaturvedi, A.K. and Prasad, P. (2009) Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Nature and Science*. 7(8): 63-75.
- Bremner, J.M. and Mulvaney, C.S. (1982) Nitrogen total. In: Page, A.L., Miller, R.H. and Keeny, D.R. (Eds), *Method of soil analysis*. American Society of Agronomy Madison. 575-624 Pp.
- Chandlee, J.M. and Scandalios, J.G. (1984) Analysis of variants affecting the catalase development program in Maize scutellum. *Theoretical and Applied Genetics*. 69: 71-77.
- Castro, R.O., Trujillo, M.M., Bucio, J.L., Cervantes, C. and Dubrovsky, J. (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science*. 172: 684-691.
- Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N. and Grossi, J.A.S. (2002) Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: Influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *Journal of Plant Nutrition*. 25(11): 2389-2407.
- Dias, C.M., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Goncalves, B. and Santos, C. (2013) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35: 1281-1289.
- Dogo, S., Razic, S., Manojlovic, D. and Slavkovic, L. (2011) Analysis of the bioavailability of Cr (III) and Cr (VI) based on the determination of chromium in *Mentha piperita* by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 76(1): 143-153.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M. and Jiang, W. (2008) Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L.. *Bioresource Technology*. 99(7): 2628-2636.
- Gonzalez, A., Gil-Díaz, M. and Lobo, M.C. (2015). Response of two barley cultivars to increasing concentrations of cadmium or chromium in Soil during the growing period. *Biological Trace Element Research*. 163(1-2): 235-243.
- Holy, M.C. (1972). Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiology*. 50: 15-18.
- Hussein, A., Mohammed, A.H. and Walaa, E. (2014). Comparative effects of purslane seed oil (PSO) and 5-lourourasil on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) in female albino mice. *International Journal of Pharma Science*. 4(1): 424-430.
- Inbar, Y., Hadar, Y. and Chen, Y. (1993) Recycling of cattle manure: The composting process and characterization of maturity. *Journal of Environmental Quality*. 22(59): 857-863.
- James, B.R. and Petura, J.C. (1995) Hexavalent Chromium extraction from soils acomparison of 5 methods. *Environmental Science and Technology*. 29(9): 2377-2381.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*. (3): 65-76.
- Jianmin, T., Jingyi, X., Yongsheng, W., Yansheng, L. and Qian, T. (2012) Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *African Journal of Biotechnology*. 11(9): 2248-2255.

- Karmollachaab, A., Gharineg, M.H., Bakhshandeh, A., Moradi Telvat, M. and Fathi, G. (2013) Effect of silicon application on physiological characteristics and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress condition. *Agroecology*. 5(4): 430-442. (in Persian)
- Khavarinejad, R.A., Najafi, F. and Aslani, F. (2016) The effect of different concentrations of potassium dichromate on some antioxidants contents and growth in *Zea mays* L., *Journal of Plant Researchs*. 28(2): 285-296. (in Persian)
- Kim, I.S., Kang, K.H., Jonson-Green, P. and Lee, E.J. (2003) Investigation of Heavy Metal Accumulation in *Polygonumthunbergii* for Phytoextraction. *Environmental Pollution*. 126: 235–243.
- Klute, A., and Dinauer, R. C. (1986) Physical and mineralogical methods. *Planning*. 8: 79.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membrane. *Method Enzymology*. 148: 350-382.
- Lodeiro, P., Fuentes, A., Herrero, R. and Sastre de Vicente, M.E. (2008) Cr (III) binding by surface polymers in natural biomass: the role of carboxylic groups. *Environmental Chemistry*. 5: 355-36.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Malar, S. Vikram, S.S., Favas, P.J. and Perumal, V. (2016) Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical studies*. 55(1): 1-11.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51: 659-668.
- Mishra, S., Srivastava, S. and Tripathi, P.D. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Baccopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 25-37.
- Molassiotis, A., Satipoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. and Therios, I. (2005) Boron –induced oxidative damage and antioxidant and unclolytic responses in shoot tips culture of apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environmental and Experimental Botany*. 56: 54-62.
- Mubashir, H., Masoodi Bahar, A., Showkat, R.M., Bila, A.Z. and Nahida, T. (2011) *Portulaca oleracea* L. A Review. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9): 3044-3048.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A. (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *United States Department of Agriculture; Washington*. 939-992 Pp.
- Olutoyosi, A., Ndakidemi, P., Snyman, R. and Odendaal, J. (2012) Assessment of metal concentrations, chlorophyll content and photosynthesis in *Phragmites australis* along the Lower Diep river, CapeTown, south Africa. *Energy and Environmental Science*. 2(1): 128-139.
- Orhue, E. R. and Uzu, F.O. (2011) Residual Effect of Chromium on Early Growth of Fluted Pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook F) in an Ultisol. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 15(3): 493-500.
- Panda, S.K. (2007) Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1419-1428.

- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2005) Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*. 61: 40-47.
- Pirooz, P.S., Manochehri Kalantari, K.M. and Nasibi, F. (2012) A physiological analysis of sunflower under chromium stress: Impact on plant growth, bioaccumulation and oxidative stress induction on sunflower (*Helianthus annuus*). *Iranian journal of Plant Biology*. 4(11). 73-86. (in Persian)
- Rahbarian, R., Khavari nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A. and Najafi, F. (2011) Drought stress effect on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 53(1): 47-56.
- Redondo-Gomez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I. and Feldman, S.R. (2011) Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator *Spartina argentinensis*. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 862-869.
- Rehana, H., Javid, A., Parray, A., Kamili, N. and Mahmood, U. (2012) Chromium stress in *Brassica juncea* L. cv. Pusa Jai Kissan under hydroponic culture. *African Journal of Biotechnology*. 11(90): 15658-15663.
- Sairam, R.K., Deshmaukh, P.S. and Shukla, D.S. (1997) Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 178: 171-178.
- Sanita, L., Fossati, F., Musettim, R., Mikerezi, I. and Favali, M.A. (2002) Chromium on maize and cauliflower plants. *Journal of Plant Nutrition*. 25(4):701-717.
- Saremi Rad, B., Esfandiari, E.A., Shokrpour, M., Sofalian, O., Avanes, A. and Mousavi, S.B. (2014) Cadmium effects on some morphological and physiological parameters in wheat at seedling stage. *Journal of Plant Research*. 27(1): 1-11.
- Shamsu, H., Gulshan, K., Mohammad, I., Arif, S.H., Bhumi, N. and Aqil, A. (2012) Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma*. 249: 599-611.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavewra, H. and Avudainayagam, S. (2005) Chromium Toxicity in Plants. *Environment International*. 31: 739-753.
- Shanker, A.K. and Pathmanabhan, G. (2004) Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr (III) and Cr(VI) stress. *Plant and Soil*. 265: 141-151.
- Sharma, D.C., Sharma, C.P. and Tripathi, R.D. (2003) Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere*. 51(1):63-68.
- Simard, R.R. (1993) Ammonium acetate extractable elements. In: Martin, R. and Carter, S. (Eds), *Soil sampling and method of analysis*. Lewis publisher. Florida, USA. pp. 39-43.
- Subrahamyam, D. (2008) Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*. 46(3): 339-345.
- Sundarmoorthy, P., Sankarganesh, K., Selvaraj, M., Baskaran, L. and Chidambaram, A.A. (2015) Chromium induced changes in soybean (*Glycine max* L.) metabolism. *World Scientific News*. (10):145-178.
- Uddin, M.K., Juraimi, A.S., Ali, M.E. and Ismail, M.R. (2012) Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *International Journal of Molecular Science*. 13: 10257-10267.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1996) Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium. Method 3060A. Washington, DC: USEPA.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N. (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*. 41:1075-1082.
- Wang, S., He, X. and An, R. (2010) Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 7(2): 810-821.
- Zare, M., Siroosmehr, A. and Abdkhani, S. (2015) Effects of mycorrhizal fungi on morphological and physiological parameters of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under Chrome stress. 2(9): 15-169. (in Persian)
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Asgari, H., Hosaini, S.M. and Rahae, M. (2015) Physiological and Biochemical properties of wild pear seedlings (*Pyrus biosseriana*) in response to different watering regimes, *Journal of Applied Biology*. 28(1): 59-78. (in Persian)
- Zou, J.H., Wang, M., Jiang, W.S. and Liu, D.H. (2006) Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 48(1): 7-12.
- Zou, J., Yu, K., Zhang, Z., Jiang, W. and Liu, D. (2009) Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium (VI)-treated *Zea mays* L. seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*. 51(1): 23-33.

Evaluation of Cr stress tolerance in *Portulaca oleracea* L. based on growth, photosynthesis indexes and the activity of antioxidant enzymes

R.Rahbarian^{1*}, E. Azizi², A. Behdad^{1,3}, A. Mirblook^{2,4}

Received: 2016.4.10

Accepted: 2018.4.29

Abstract

In order to investigate effects of Cr stress on growth, photosynthetic indexes and the activity of antioxidant enzymes in *Portulaca oleracea* L. (Purslane), an experiment in the greenhouse of Ferdowsi University of Mashhad, was done in a completely randomized design with three replications of five levels (0, 25, 50, 75 and 100 ppm). The amount of Cr⁺⁶ in the soil, root and shoot at different levels of stress were measured. By increasing the chromium content in shoot and root were significantly increased. Chromium accumulation at root was more than shoot. Stomatal conductance, chlorophyll a, carotenoids, transpiration and efficiency of photosystem II decreased with increasing the amount of Cr. However, the CO₂ assimilation, water use efficiency, growth, coefficient stability index (CSI) and chlorophyll b and total chlorophyll concentration in 100 ppm was significantly higher than 75 ppm. Also, the activity of catalase and peroxidase increased by increasing the amount of Cr⁺⁶. Based on the results, chromium in low concentrations possibly effected on biosynthesis of photosynthetic pigments and caused disorder of photosynthetic electron transport, decreased photosynthetic efficiency, thereby reduced the production of reactive oxygen species and growth. But at higher levels of chromium (100 ppm), purslane by activating defense mechanisms such as increasing the activity of antioxidant enzymes and prevent a sharp decline in total proteins could reduce somewhat the damage and maintained the water use efficiency. The purslane is likely to be as tolerant plants of chromium and it was effective in refining the contaminated soils with this heavy metal.

Keywords: peroxidase, photosystem II efficiency, chlorophyll, heavy metal

1-Department of biology, Faculty of science, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- Department of agronomy, Faculty of agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: Ra_rahbarian@yahoo.com)

3- Ph D student in plant physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran

4- Ph D student in soil chemistry, Urmia University, Urmia, Iran

*(Corresponding Author: Ra_rahbarian@yahoo.com)

بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در سه ژنوتیپ *Lolium perenne* تحت تنش

خشکی

فرزانه ترکش اصفهانی^۱، لیلا شبانی^{۲*}، محمد رضا سبزیعلیان^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۴

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنش خشکی بر پاسخ‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان در ۳ ژنوتیپ از گیاه چچم بود که در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط مزرعه‌ای انجام شد. تنش خشکی RWC، وزن تر، وزن خشک، محتوای کلروفیل *a* کلروفیل *b* و کاروتنوئید را کاهش داد؛ در حالی که، غلظت H_2O_2 و محتوای پرولین افزایش یافت. همچنین در مقایسه با شاهد، فعالیت آنزیم‌های *CAT*، *GPX*، *APX* و *SOD* به علت تنش خشکی افزایش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده (شامل کاهش اندک محتوای نسبی آب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان پرولین در ژنوتیپ اول)، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این ژنوتیپ در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر نسبت به تنش خشکی دارای مقاومت بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پراکسید هیدروژن، پرولین، چچم، خشکی

مقدمه

گیاهان به طور دائم در معرض تغییرات محیطی هستند و هنگامی که این تغییرات سریع و افراطی باشند، سبب تنش می‌شوند (Mahajan & Tuteja, 2005). در بین تنش‌های غیرزیستی، تنش کم‌آبی (خشکی) شدیدترین، مخرب‌ترین و با اهمیت‌ترین عامل محیطی محدودکننده تولید محصولات زراعی در مناطق نیمه خشک است (Jaleel et al., 2007). بیش از ۴۵ درصد از زمین‌های کشاورزی به طور دائم در معرض خشکی قرار دارند و ۳۸ درصد جمعیت دنیا در آن مکان‌ها ساکن هستند. لذا در آینده، بیشترین تلاش‌ها در جهت تولید بیشتر محصول در شرایط کم‌آبی خواهد بود. تنش خشکی دارای سطوح متفاوتی است و بر بخش‌های مختلف گیاهان اثر می‌گذارد. یکی از اثرات تنش خشکی، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو است (Lisar et al., 2012). القای تنش اکسیداتیو در گیاهان منجر به افزایش انباشته شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به

۱- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

* نویسنده مسئول: (Ishabani@gmail.com)

۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه شهرکرد است که با راهنمایی دکتر لیلا شبانی و دکتر محمد رضا سبزیعلیان انجام شده است.

خصوص O_2^- و H_2O_2 در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010). این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول ایجاد اکثر آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشند که شامل شکسته شدن DNA، اکسیداسیون آمینواسید و پروتئین و همچنین پراکسیداسیون لیپید هستند (Asada, 2006). در اثر این آسیب‌ها، پتانسیل کل آب و تورژسانس، کاهش و غلظت مواد حل‌شونده در سیتوزول سلول‌ها افزایش می‌یابد. همچنین توسعه سلول‌ها و به دنبال آن رشد و باروری گیاهان کاهش می‌یابد و در ادامه، سبب تجمع اسید آبسزیک و افزایش اسمولیت‌هایی مانند پرولین می‌شود. پرولین به عنوان ترکیب اسمزی سازگار پیشنهاد شده است، به این علت که پتانسیل اسمزی را در سیتوپلاسم تعدیل می‌کند. از طرفی، تنش خشکی فقط بر میزان فشار تورژسانس اثر ندارد، بلکه منجر به بسته شدن روزنه‌ها برای کاهش تعرق نیز می‌شود؛ در نتیجه، باعث کاهش فتوسنتز و شاخص‌های رشد می‌گردد (Lisar *et al.*, 2012). به منظور کاهش آسیب‌های اکسیداتیو وارده در اثر تولید و تجمع گونه‌های فعال، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاهان تعبیه شده است که در کنترل سطح ROS، هم در شرایط طبیعی و هم در شرایط تنش‌زای محیطی نقش دارند (Anderson *et al.*, 1995). سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیدازهایی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و گلوکاتیون ردوکتاز (GR) هستند (Blokhina *et al.*, 2003) در تحقیقی گیاهچه‌های مقاوم به خشکی *Phaseolus acutifolius* فعالیت بالاتر آنزیم کاتالاز و میزان MDA (شاخص پراکسیداسیون لیپید) کمتری را نسبت به گیاهچه‌های حساس به خشکی نشان دادند (Türkan *et al.*, 2005). Sharma و Dubey (2005) و Zhu و همکاران (2009) نشان دادند که فعالیت آنزیم APX در برنج، تحت تنش خشکی ملایم، افزایش اما تحت تنش خشکی شدید، کاهش یافت. Abedi و Pakniyat نیز در سال (2010) نشان دادند که فعالیت آنزیم SOD به طور قابل توجهی در دانه‌رست‌های تحت تنش آبی افزایش یافت. Farfan-Vignolo و Asard (2012) گزارش دادند که تنش خشکی در گیاه مدل چمنزار یعنی *Lolium perenne* باعث ممانعت شدید در بیوماس و فتوسنتز گیاه شد و آسیب اکسیداتیوی قوی را ایجاد کرد. Hu و همکاران (2010) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک)، میزان پراکسیداسیون لیپید، نشت الکتریکی و محتوای پراکسید هیدروژن را در گیاهچه‌های *L. perenne* افزایش داد؛ به علاوه، برگ‌های گیاهان تحت تنش، فعالیت بالاتری از آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. در تحقیقی Luo و همکاران (2011)، پاسخ‌های فیزیولوژیکی چمن دائمی را تحت تنش کادمیوم مورد مطالعه قرار دادند. چمن دائمی به مدت ۷ روز در گلخانه در معرض سطوح متفاوتی از غلظت کادمیوم قرار گرفت. در چمن تیمار شده، مقدار مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) نسبت به شاهد افزایش یافت و تنش Cd منجر به القاء بیان رونوشت آنزیم‌های FeSOD، MnSOD و POD شد.

گیاه چچم چند ساله از خانواده پوآسه، یکی از اقتصادی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که برای حیوانات شیری و گوشتی مورد کشت و کار است (Wilkins & Humphreys, 2003). همیشه سبز بودن این گیاه باعث شده است که بتوان از آن،

علاوه بر مصارف علوفه‌ای، به طور وسیعی برای احداث چراگاه استفاده کرد. همچنین، کشت این گیاه به منظور تهیه سوخت سبز از کاربردهای دیگر آن است. با توجه به کاربردهای گسترده این گیاه، کشورهایی همچون آمریکا، نیوزیلند، دانمارک و استرالیا از این گیاه برای تولید علوفه و بذر استفاده می‌کنند.

تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر تنش خشکی بر گیاهان مختلف صورت گرفته است؛ ولی، با توجه به اهمیت تنش کم آبی در کشور ایران و کاربردهای متنوع گیاهان علفی، لزوم بررسی اثرات تنش خشکی بر این گیاهان آشکار است. به همین علت، در این پژوهش تغییرات ایجاد شده روی برخی شاخص‌های مهم فیزیولوژیک در سه ژنوتیپ *L. perenne* در پاسخ به تنش خشکی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان (چاه اناری) با موقعیت جغرافیای ۳۲ درجه شمالی و ۵۱ درجه شرقی اجرا گردید. در این منطقه، متوسط بارندگی سالیانه ۱۲۲/۸ میلی‌متر مکعب و دامنه متوسط تغییرات دمای مطلق سالیانه از ۹/۱ تا ۲۳/۴ درجه متغیر است؛ بنابراین، اقلیم منطقه فراخشک و سرد است. تعداد ۳ ژنوتیپ چچم چند ساله (که از جنگل ابر مازندران جمع‌آوری شده بودند) در قالب طرح کامل تصادفی و با ۳ تکرار در مهرماه سال ۱۳۹۳ در مزرعه چاه اناری و در دو محیط مجزا کشت گردیدند. جهت اجرای آزمایش، ابتدا آماده‌سازی زمین شامل شخم، دیسک، تسطیح و کوددهی انجام شد. در این آزمایش، در هر کرت هر توده از هر ژنوتیپ به صورت کپه‌ای (سه کپه) کشت گردید. فواصل بین کپه‌ها ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. آبیاری ۳ بار در هفته انجام شد و به مدت یک ماه هر هفته‌ای یک بار، به منظور رشد رویشی مناسب، ۲۰۰ گرم کود اوره در هر کرت به گیاهان اضافه گردید. پس از ظاهر شدن علائم رشد رویشی مناسب، از اواسط مردادماه آبیاری محیط تیمار تنش خشکی قطع شد و تنش روی گیاهان اعمال گردید. درصد رطوبت خاک دو محیط به کمک دستگاه TDR هفته‌ای یک بار اندازه‌گیری شد. پس از رسیدن رطوبت خاک به ۱۶ درصد در شرایط تنش و ۲۳ درصد در شرایط شاهد، آبیاری مجدد انجام گردید (Kumar *et al.*, 2008). این نحوه آبیاری تا قبل از برداشت نمونه، به مدت ۲ ماه اعمال شد. پس از یک ماه از اعمال تنش، گیاهان کنترل و تیمار جمع‌آوری گردیدند.

اندازه گیری وزن تر و وزن خشک گیاه

به منظور اندازه گیری وزن تر، ابتدا نمونه ها با آب مقطر شسته شده و رطوبت اضافی آن با کاغذ صافی گرفته شد. وزن تر اندام هوایی گیاهان بر حسب گرم اندازه گیری شد. برای محاسبه وزن خشک هر یک از نمونه ها، بعد از قرار گرفتن در پاکت های کاغذی، به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی گراد خشک و سپس بر حسب گرم توزین گردیدند.

سنجش محتوای نسبی آب (RWC)

برای اندازه گیری این شاخص، هر گیاه به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. از هر گیاه دو برگ تهیه و از هر برگ ۳ دیسک با قطر ۱ سانتی متر تهیه شد و با ترازو وزن گردید (FW). سپس دیسک ها در ظروف حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور گردیدند. دیسک ها پس از این مدت از ظروف خارج شده و با استفاده از کاغذ صافی خشک و دوباره وزن گردیدند تا وزن حالت تورژسانس کامل (TW) به دست آید. برای محاسبه وزن خشک (DW)، دیسک ها درون فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوباتور قرار داده شدند و سپس وزن گردیدند. محتوای نسبی آب برگ، از رابطه زیر محاسبه شد (Weatherley, 1950).

$$RWC (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100$$

سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای برگ با هموژنیزه کردن ۱۰۰ میلی گرم از وزن تر برگ در ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ استخراج شدند. پس از سانتریفوژ نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در روشناور نمونه ها مطابق روش Arnon (1949) و Lichtenthaler (1987) محاسبه گردید.

سنجش میزان H₂O₂

برای اندازه گیری H₂O₂ از روش Alexieva و همکاران (2001) استفاده شد. برای عصاره گیری، ۰/۰۵ گرم بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱/۵ میلی لیتر TCA (تری کلرو استیک اسید) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها و عصاره ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و ۱ میلی لیتر محلول KI ۱ مولار ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر خوانش گردید. از محلول پراکسید هیدروژن (سیگما) به عنوان استاندارد استفاده گردید.

عصاره گیری بافت برای سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

برای عصاره‌گیری، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ گیاهچه‌های شاهد و تحت تیمار پس از توزین درون هاون چینی از پیش سرد شده قرار داده شدند و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول بافر عصاره‌گیری سالین فسفات با $\text{pH} = 7/8$ به تدریج به آن افزوده گردید. ضمن افزودن این حجم از محلول، بافت‌ها سائیده شدند. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش توصیف شده توسط Aebi (1984) تعیین گردید. عصاره حاوی آنزیم به محلول واکنش حاوی ۱۰mM پراکسید هیدروژن در بافر سدیم فسفات اضافه شد. فعالیت آنزیم با بررسی کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب ۰/۰۳۹ میلی‌مول بر سانتی‌متر برای پراکسید هیدروژن اندازه‌گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه پراکسید هیدروژن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را بیان می‌کند.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

سنجش فعالیت این آنزیم به روش Beyer و Fridovich (1987) صورت گرفت. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=7/8$)، متیونین (۹/۹ میلی‌مولار)، تریتون X-100 (۰/۰۲۵ درصد)، نیتروبلوتترازولیموم (۷۵ میکرومولار) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیم به همراه ۱۰ میکرولیتر ریووفلاوین (۰/۰۰۴ درصد) در لوله آزمایش ریخته شد. مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در یک محفظه دارای دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات قرار داده شد. افزایش در جذب به واسطه تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانش شد. طبق شرایط توصیف شده، افزایش در جذب در نمونه بدون عصاره آنزیمی معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم با تعیین درصد ممانعت در دقیقه محاسبه گردید. ۵۰ درصد ممانعت معادل با ۱ واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز، مطابق با روش Kao و Lin (1999)، شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی‌مولار و ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی‌مولار بود که با ۵۰ میکرولیتر نمونه در لوله آزمایش مخلوط شد. سینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی‌مول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول-پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می‌شود تعریف شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (1987) تعیین گردید. مخلوط واکنش حاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم، ۰/۵ میلی مولار آسکوربیک اسید، ۲۵۰ میلی مولار H_2O_2 و ۵۰ میلی لیتر عصاره آنزیمی بود. اکسیداسیون آسکوربیک اسید به صورت کاهش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانش گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب جذب ۲/۸ میلی مول بر سانتی متر برای آسکوربیک اسید محاسبه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه آسکوربیک اسید در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد را بیان می کند.

سنجش میزان پرولین

اندازه گیری میزان پرولین به روش Troll و Lindsley (1955) انجام شد. در ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد سائیده شد. پس از قرار گرفتن عصاره حاصل در ۴ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت، به مدت ۵ دقیقه در g ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۴۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱ میلی لیتر مخلوط واکنش (۱۵ میلی لیتر استیک اسید، ۵ میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد، ۰/۲۵ گرم نین هیدرین و ۵ میلی لیتر آب مقطر که دور از نور نگهداری شد بود) رقیق گردید و از این محلول برای سنجش میزان پرولین استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد پرولین، غلظت های ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ و ۰ میلی مولار از پرولین تهیه و همانند عصاره ها رقیق شدند. سپس عصاره ها و استانداردها در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۱ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، عصاره ها و استانداردها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. سپس جذب نوری آن ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

آنالیزهای آماری

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار در هر کدام از محیط های تنش خشکی و بدون تنش خشکی اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح خشکی به عنوان فاکتور اصلی و سه سطح ژنوتیپ به عنوان فاکتور فرعی (در هر محیط) بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی داری (LSD) ($p < 0/05$) مشخص شد. نمودارها با نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

تیمار خشکی بر میزان شاخص های وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و شاخص RWC در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب کاهش میزان وزن تر، وزن خشک و محتوای نسبی آب به ترتیب به میزان

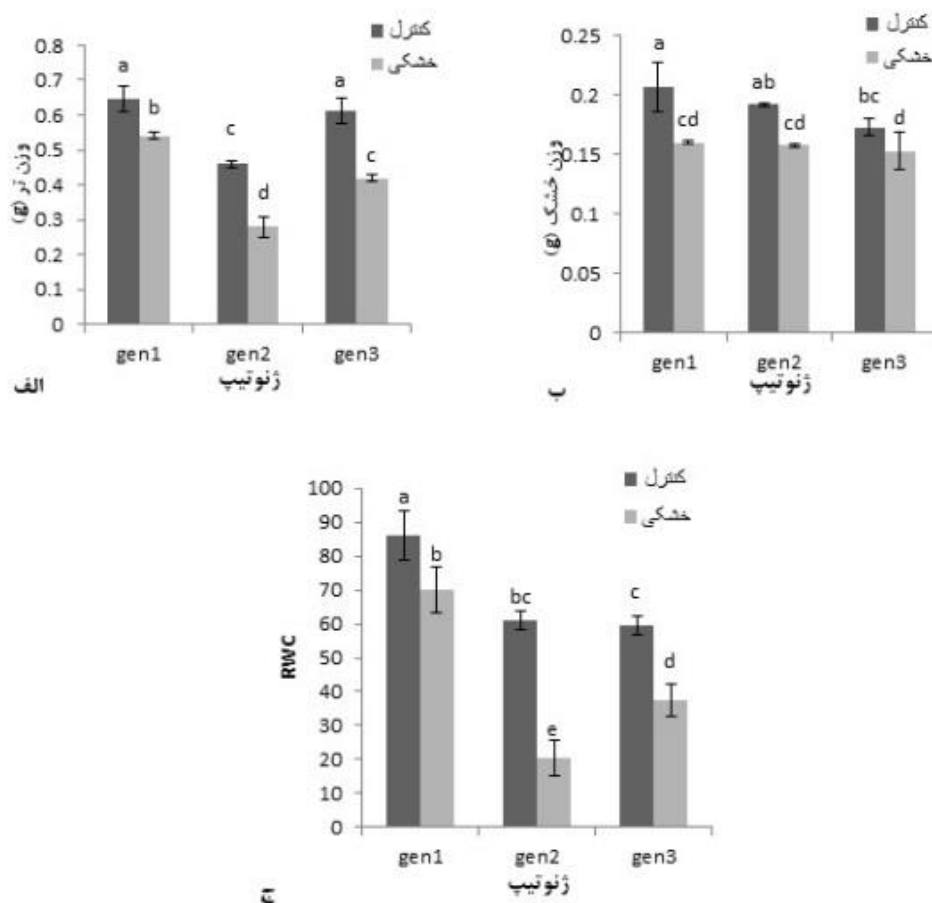
۲۷/۸۲ درصد، ۱۷/۵۷ درصد و ۳۵ درصد در مقایسه با شاهد شد. تاثیر ژنوتیپ نیز بر میزان وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و شاخص RWC در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیوم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر شاخص‌های رشد و محتوای نسبی آب معنی‌دار بود. شاخص وزن تر اندام هوایی در ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۶۰/۵۸ درصد و ۱۴/۹ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داد. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی‌دار در وزن خشک اندام هوایی شد و این تفاوت به صورت ۱۲/۵ درصد افزایش وزن در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۳ بود. محتوای نسبی آب برگ‌ها نیز در ژنوتیپ اول نسبت به دو ژنوتیپ ۲ و ۳ به ترتیب ۹۹ درصد و ۶۷/۵۳ درصد افزایش داشت. بنابراین بیشترین میزان وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، نسبت وزن تر به وزن خشک و محتوای نسبی آب در ژنوتیپ اول مشاهده شد. نتایج نشان داد که زیست توده اندام هوایی و RWC در تمام ژنوتیپ‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) تحت تنش خشکی در مقایسه با شاهد کاهش یافت (شکل ۱). اگر چه کاهش میزان RWC در گیاهان تحت تنش خشکی در ژنوتیپ ۲ در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر مشهودتر بود. تنش خشکی یکی از عوامل محیطی اصلی است که رشد گیاه را محدود می‌کند و باعث کاهش شاخص‌های رشد می‌شود (Filippou *et al.*, 2011). طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، در تمام ژنوتیپ‌های چچم چندساله گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی کاهش معنی‌داری را در شاخص وزن تر و محتوای نسبی آب در مقایسه با شاهد نشان دادند. کاهش شاخص‌های رشد ممکن است به دلیل القای تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تنش باشد که منجر به افزایش انباشته شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به خصوص H_2O_2 و O_2^- در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010). این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول اکثر آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی هستند که شامل شکسته شدن DNA، اکسیداسیون آمینواسید و پروتئین و پراکسیداسیون لیپید است (Asada, 2006). به دنبال آسیب‌های اکسیداتیو اختلالاتی در متابولیسم سلول نیز رخ می‌دهد؛ به عنوان مثال، فقدان هماهنگی بین فرآیندهای تولید انرژی (منبع) و مصرف انرژی (مخزن) در طی فتوسنتز و همچنین اختلالاتی در فرآیندهای مهم تنفس، که منجر به کاهش رشد می‌شود (Reddy *et al.*, 2004). همچنین کاهش شاخص‌های رشد ممکن است به دلیل مهار رشد سلول به علت فشار پایین تورژانس و پیری بیشتر برگ تحت شرایط تنش خشکی باشد (Sayyari *et al.*, 2013).

برخی مطالعات گذشته نیز کاهش شاخص‌های رشد تحت تنش را در گیاهان مختلف نظیر کاهو (Sayyari *et al.*,

2013)، نخود (Khodadadi, 2013)، ۶ جمعیت *Achillea tinctoria* (Shanjani *et al.*, 2014) و ارقام انجیر (Davarynejad, 2013)

گزارش کرده‌اند. اعمال تیمار خشکی در هر سه ژنوتیپ چچم منجر به کاهش محتوای نسبی آب گردید. با این حال ژنوتیپ ۱

نسبت به دو ژنوتیپ دیگر میزان کمتری آب از دست داد و از محتوای نسبی آب بالاتری برخوردار بود؛ در مقابل، ژنوتیپ ۲ بیشترین کاهش در RWC را نشان داد. بنابراین می‌توان گفت ژنوتیپ ۱ مقاومت بیشتری در از دست دادن آب یا حفظ آب تحت تیمار خشکی از خود نشان داده‌است.



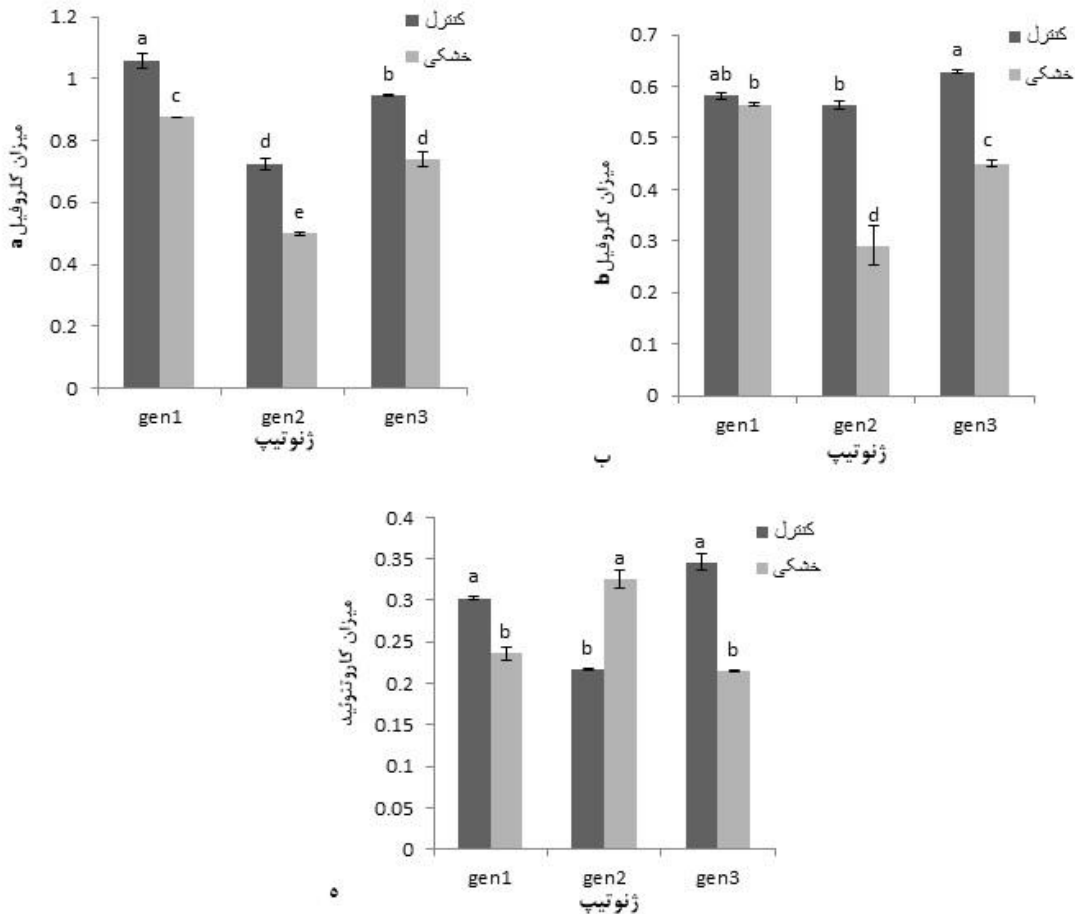
شکل ۱: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان وزن تر (الف)، وزن خشک (ب) و محتوای نسبی آب (ج) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است. تیمار خشکی بر میزان شاخص‌های کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب کاهش میزان کلروفیل a و b به ترتیب به میزان ۲۲/۵۵ درصد و ۲۶/۷۲ درصد در مقایسه با شاهد شد؛ در حالی که، خشکی به تنهایی بر میزان کاروتنوئیدها تاثیر معنی داری نداشته است. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها معنی دار بود. شاخص کلروفیل a در ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۵۷/۷۵ درصد و ۱۴/۶۷ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داده است. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی دار در میزان کلروفیل b شد و این تفاوت به صورت ۳۴/۱۰ درصد افزایش، در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۲ بود (ژنوتیپ ۱ و ۳ تفاوت معنی داری نداشتند). ژنوتیپ گیاه به تنهایی تاثیر معنی داری بر میزان کاروتنوئیدها نداشته است. بنابراین کمترین میزان کلروفیل a و

کلروفیل b در ژنوتیپ دوم مشاهده شد. میزان کلروفیل a در ژنوتیپ ۲ بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) تحت تنش خشکی در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۲)؛ در حالی که، این شاخص تحت تنش خشکی در ژنوتیپ ۳ کاهش نشان داد و هیچ تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a در ژنوتیپ ۱ نداشت. اگرچه تنش خشکی میزان کلروفیل b را در ژنوتیپ دوم افزایش داد ولی هیچ تاثیر معنی‌داری بر مقدار آن در دو ژنوتیپ دیگر نشان نداد. به طور مشابه، تحت تنش خشکی میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ ۲ افزایش یافت؛ اگرچه، در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ در مقایسه با شاهد میزان آن کاهش نشان داد (شکل ۲). با توجه به این که تغییرات در میزان کلروفیل و کاروتنوئید و نسبت رنگیزه‌ها شاخص‌های مهم تنش محیطی هستند، می‌توان تحمل گونه‌ها به تنش را با ارزیابی میزان رنگیزه‌ها توصیف کرد. یکی از نشانه‌های رایج تنش اکسیداتیو، کاهش محتوای رنگیزه‌ها است (Smirnoff, 1993). طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، در تمام ژنوتیپ‌های چچم گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی کاهش معنی‌داری را در میزان کلروفیل a نشان دادند. میزان کلروفیل b در ژنوتیپ ۲ و ۳ در مقایسه با شاهد کاهش یافت؛ در حالی که، در ژنوتیپ ۱ از نظر آماری تغییر معنی‌داری نداشته است. کاهش محتوای کلروفیل در چچم چندساله تحت تیمار خشکی پاسخی به شرایط تنش است که ممکن است به علت ناپایداری کمپلکس‌های پروتئینی و تخریب کلروفیل توسط افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده کلروفیل و کلروفیل‌لاز باشد (Sayyari *et al.*, 2013). همچنین تنش خشکی باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن شده است که با آسیب‌رسانی به فتوسیستم‌ها و تخریب غشای کلروپلاست، منجر به کاهش مقادیر کلروفیل می‌شوند (Herbinger *et al.*, 2002). دلیل دیگری که می‌تواند سبب کاهش کلروفیل در تنش خشکی شود این است که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش‌ماده آمینواسید گلوتامات ساخته می‌شوند؛ بنابراین می‌توان گفت که، افزایش سنتز پرولین در طی تنش‌ها می‌تواند منجر به کاهش سنتز کلروفیل شود (Rabiei, 2003). باتوجه به نتایج، تنش خشکی بر روی کلروفیل a تاثیرگذارتر بوده است.

نتایج بدست آمده در این تحقیق، با پژوهش‌های انجام شده بر روی پنبه و *Catharanthus roseus* (Massacci *et al.*, 2008)، برنج (Jnandabhiram & Prasad, 2012)، انجیر (Davarynejad, 2013)، گوجه فرنگی (Rezaei *et al.*, 2012) و کاهو (Sayyari *et al.*, 2013) تحت تیمار خشکی مطابقت داشته است. Asard و Farfan-Vignolo (2012) گزارش دادند که تنش خشکی در گیاه مدل چمنزار یعنی *L. perenne* باعث ممانعت شدید در بیوماس و فتوسنتز گیاه و آسیب اکسیداتیوی قوی می‌شود.

طبق نتایج بدست آمده، میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ چچم در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد که احتمالاً به دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام گرفته است و در نتیجه به برهم زدن ساختار آن‌ها منجر می‌گردد (Di Toppi & Gabbrielli, 1999). در مقابل، میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ ۲ در مقایسه

با شاهد افزایش داشته‌است که نیاز بیشتر حفاظت نوری را به وسیله کاروتنوئیدها نشان می‌دهد (Elsheery & Cao, 2008; Liu *et al.*, 2011).

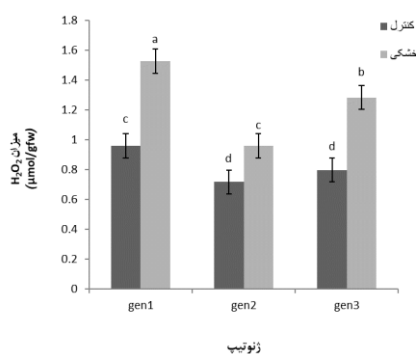


شکل ۲: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر) (الف)، کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر) (ب) و کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) (ج) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

تأثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان H_2O_2 در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب افزایش H_2O_2 به میزان

۵۲/۲۶ درصد در مقایسه با شاهد شد. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان H_2O_2 شد؛ طوری که، این شاخص در ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۴۸/۲۰ درصد و ۱۹/۴۲ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داده است. همچنین نتایج نشان داد که تحت تیمار خشکی، میزان H_2O_2 در هر سه ژنوتیپ در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار ($P < 0.05$) داشته است (شکل ۳). در این تحقیق میزان H_2O_2 در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد که ممکن است، به دلیل کاهش فعالیت فتوسیستم II (PSII)، منجر به عدم تعادل بین تولید و مصرف الکترون‌ها شود.

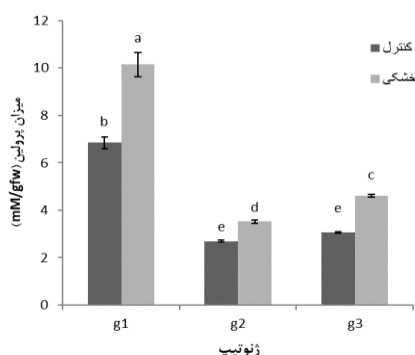
این تغییرات در فتوشیمی کلروپلاست‌های برگ‌های تحت تنش، منجر به اتلاف انرژی نوری زیادی در مرکز و آنتن‌های فتوسیستم II می‌گردد؛ بنابراین، گونه‌های فعال اکسیژن (OH^\cdot , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$) تولید می‌شوند (Peltzer *et al.*, 2002). همچنین واکنش‌های فتوشیمیایی وابسته به فتوسیستم II نسبت به خشکی حساس‌ترند. از دست دادن یا کاهش پروتئین‌های D1 و D2 در فتوسیستم II باعث از بین رفتن فتوسیستم II می‌شود. بنابراین در طی خشکی، پتانسیل قابل توجهی برای افزایش انباشته شدن سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، که از افزایش میزان احیای نوری O_2 در کلروپلاست‌ها حاصل می‌شوند، وجود دارد (Robinson & Bunce, 2000). از سوی دیگر، ممکن است فعالیت بالای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز باعث افزایش تولید H_2O_2 شود. نتایج این تحقیق با مطالعات دیگری که افزایش H_2O_2 را در پاسخ به تنش خشکی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. این مطالعات روی برگ‌های گندم (Luna *et al.*, 2005) و بادام وحشی (Sorkheh *et al.*, 2011) انجام گرفته است. همچنین Hu و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک) میزان پراکسیداسیون لیپید، نشت الکتریکی و محتوای پراکسید هیدروژن را در گیاهچه های *L. perenne* در مقایسه با شاهد افزایش داده است.



شکل ۳: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

تاثیر تیمار خشکی، ژنوتیپ و اثر متقابل تیمار خشکی × ژنوتیپ بر میزان پرولین در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. تیمار خشکی سبب افزایش میزان پرولین به مقدار ۴۵/۰۳ درصد در مقایسه با شاهد شد. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان پرولین شده است. در این شاخص، ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۱۷۳/۲۸ درصد و ۱۲۱/۸۶ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داد. بنابراین بیشترین میزان پرولین در ژنوتیپ ۱ مشاهده شد. میزان پرولین در تمامی ژنوتیپ‌ها تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با شاهد نشان داد که البته این افزایش در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ بسیار مشهود و در مقایسه با ژنوتیپ ۲ بارزتر بود (شکل ۴). طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق، میزان پرولین در هر سه ژنوتیپ چچم تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری در مقایسه با شاهد نشان داد. افزایش پرولین ممکن است نتیجه افزایش پروتئولیز در شرایط تنش باشد (Alizadeh *et al.*, 2011). پرولین به پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و بافری کردن پتانسیل ردوکس سلول تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Sayyari *et al.*, 2013). از طرف دیگر، تجزیه پرولین به محض برطرف شدن تنش ممکن است

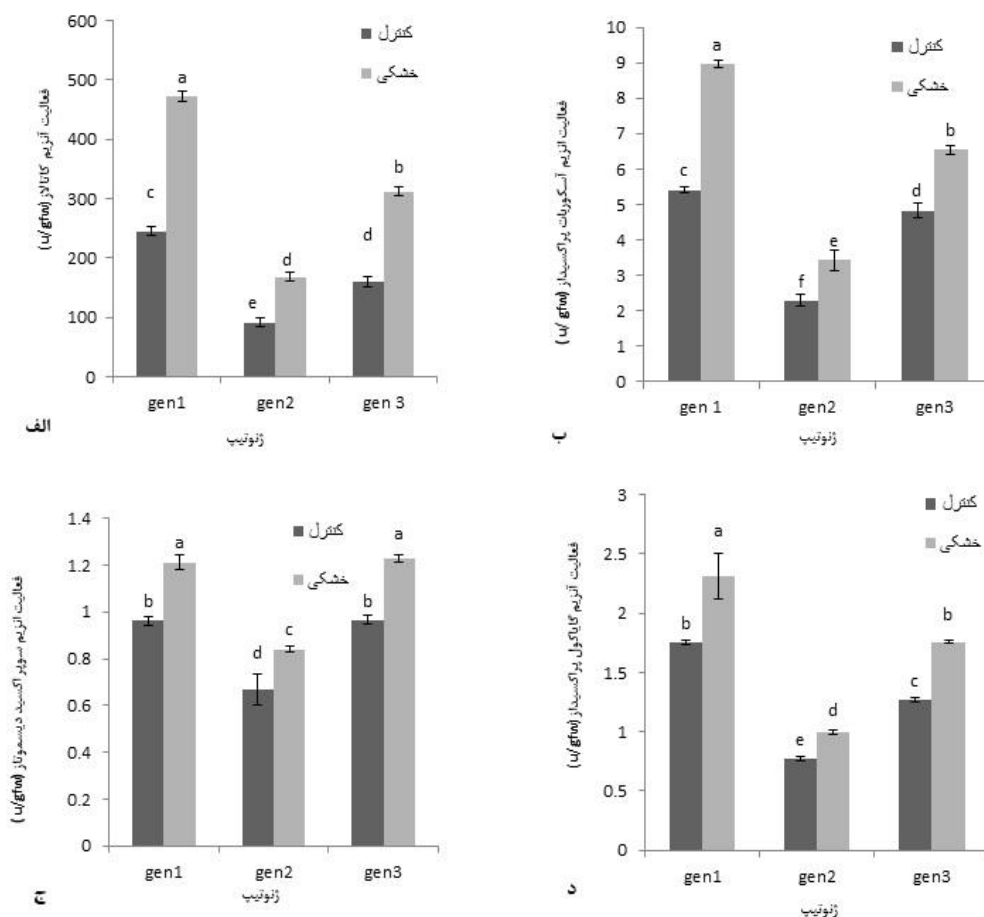
عواملی را فراهم کند تا فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ATP، برای بازیابی از شرایط تنش و ترمیم آسیب‌های القا شده از تنش، را حمایت کند. بنابراین افزایش پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی اثرات شدید تنش را کاهش می‌دهد (Hare & Cress, 1997). برخی از مطالعات گذشته نیز افزایش پرولین تحت تنش خشکی را در گیاهان مختلف مثل گندم (Nayyar & Walia, 2003)، کاهو (Sayyari et al., 2013) و نخود (Mafakheri et al., 2010) گزارش کرده‌اند. افزایش میزان پرولین در هر سه ژنوتیپ به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو کمک کرده است. همچنین، با توجه به این که محتوای پرولین برگ عمدتاً مقیاسی برای مقاومت به خشکی است (Kanani et al., 2013)، می‌توان گفت ژنوتیپ ۱ که دارای مقادیر بالاتری از پرولین است در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر به خشکی مقاوم‌تر است.



شکل ۴: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان پرولین در سه ژنوتیپ از چشم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

تیمار خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز به ترتیب به میزان ۹۱/۸۱ درصد، ۴۸/۸۴ درصد، ۳۳/۶۳ درصد و ۲۶/۴۱ درصد در مقایسه با شاهد شد. تاثیر ژنوتیپ نیز بر میزان فعالیت تمامی شاخص‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیوم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ اول به ترتیب ۱۷۶/۹۶ درصد و ۵۱/۸۸ درصد در مقایسه با ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ افزایش نشان داد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در ژنوتیپ اول نسبت به دو ژنوتیپ ۲ و ۳ به ترتیب ۱۵۳ درصد و ۲۷/۴۸ درصد افزایش داشته است. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز در ژنوتیپ اول به ترتیب ۱۲۹ درصد و ۳۴/۱۶ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۱ و ۳ افزایش داشته است. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی دار در فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شد و این تفاوت به صورت ۴۵/۴۲ درصد افزایش فعالیت در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۲ بود (ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ تفاوتی با هم نداشتند). در تمام ژنوتیپ‌ها، گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند، که این افزایش در ژنوتیپ اول بارزتر بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز و آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر سه ژنوتیپ در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) داشت.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) نشان داد. به طور کلی، افزایش فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در ژنوتیپ ۱ مشهودتر از ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بوده است.



شکل ۵: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب)، سوپراکسید دیسموتاز (ج) و گایاکول پراکسیداز (د) در سه ژنوتیپ از چشم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین در سطح 0.05 آزمون LSD است.

القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

آنتی‌اکسیدان راهکاری برای سازگاری کلی گیاهان برای غلبه بر تنش‌های اکسیداتیو است. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که تمام ژنوتیپ‌های چشم چندساله تحت تیمار خشکی، افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند. این آنزیم در پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی حضور دارد و مهم‌ترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن است. این آنزیم سلول‌ها را از اثرات سمی پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آن‌ها به اکسیژن مولکولی و آب، بدون تولید رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (Arora *et al.*, 2002). میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافته است. فعالیت بالای این آنزیم نقش آن را در سم‌زدایی H_2O_2 نشان می‌دهد (Zhou *et al.*

2008). همچنین این آنزیم، آسکوربیک اسید را اکسید و با تنظیم بیان ژن‌های چرخه اکسیداسیون و احیا، عوامل آنزیمی را فعال می‌کند (Ghorbanli et al., 2012).

میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داده‌است. آنزیم گایاکول پراکسیداز در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، درون سیستم پراکسید/ فنول‌ها/ آسکوربات در تنش خشکی دخالت داشته است (Sgherri et al., 2004). همچنین این آنزیم از غشای سلول در مقابل اکسیدان‌های فعال حفاظت می‌کند و گیاهان را در کاهش اثرات تنش یاری می‌کند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در هر سه ژنوتیپ چچم تحت تیمار خشکی، در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. افزایش بیان SOD، در صورتی که با افزایش مکانیسم‌های پاک‌سازی H₂O₂ مثل فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX همراه شود، به عنوان یک مکانیسم مهم ضد خشکی برای مقابله با تنش اکسیداتیو در طی شرایط تنش آبی به شمار می‌رود (McKersie et al., 1999). نتایج این تحقیق با مطالعات دیگری که افزایش فعالیت SOD را در پاسخ به تنش خشکی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. این مطالعات بر روی آفتاب‌گردان (Gunes et al., 2008)، نخود (Manivannan et al., 2007) و شیرین بیان (Pan et al., 2006) انجام گرفته است. Hu و همکاران (2012) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک) در برگ‌های گیاهچه‌های *L. perenne* موجب فعالیت بالاتری از آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد می‌شود. در تحقیقی Luo و همکاران (2011) پاسخ‌های فیزیولوژیکی چمن دائمی را تحت تنش Cd مورد مطالعه قرار دادند. چمن دائمی به مدت ۷ روز در گلخانه در معرض سطوح متفاوتی از غلظت Cd قرار گرفت. در چمن تیمار شده مقدار مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) نسبت به شاهد افزایش یافت؛ به علاوه، تنش Cd منجر به القاء بیان رونوشت آنزیم‌های FeSOD، MnSOD و POD شد. بنابراین در این تحقیق افزایش همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در هر سه ژنوتیپ چچم چندساله در مقایسه با شاهد معنی‌دار بوده است.

آنزیم کاتالاز با بالاترین فعالیت می‌تواند به عنوان شاخص مهم مقاومت به تنش باشد. این افزایش فعالیت آنزیمی نشانگر وجود یک سیستم آنتی‌اکسیدانی هماهنگ در گیاه است و مقاومت بالایی را در گیاه تحت تیمار خشکی حاصل می‌کند. به طوری که گزارش شده‌است، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحمل به خشکی ارقام توت (Reddy et al., 2004)، چای (Upadhyaya et al., 2008) و زیتون (Ahmed et al., 2009) را تقویت می‌کند. در این پژوهش، ژنوتیپ ۱ چچم چندساله بالاترین سطح عملکردی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر نشان داد. این فرآیند، با افزایش میزان پرولین و کاهش کمتر محتوای نسبی آب، وزن تر، وزن خشک و رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه بود؛ در نتیجه، می‌توان بیان داشت که سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی در این گیاه، مقاومت بالاتری را در برابر تیمار خشکی در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر به وجود آورده است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه دانشجویی و با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفته است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126
- Abedi, T. and Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1): 27-34.
- Ahmed, C.B., Rouina, B.B., Sensoy, S., Boukhris, M. and Abdallah, F.B. (2009) Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2): 345-352.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12): 1337-1344.
- Alizadeh, A., Alizade, V., Nassery, L. and Eivazi, A. (2011) Effect of drought stress on apple dwarf rootstocks. *Technical Journal of Engineering and Applied Science*, 1(3): 86-94.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K. and Stewart, C.R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4): 1247-1257.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.
- Arora, A., Sairam, R. and Srivastava, G. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science-Bangalore*, 82(10): 1227-1238.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2): 391-396.
- Beyer, W.F. and Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2): 559-566.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 179-194.
- Davarynejad, G.H. (2013). Physiological and biochemical responses of four edible fig cultivars to water stress condition. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 3: 473-479
- Di Toppi, L.S. and Gabbriellini, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2): 105-130.
- Elsheery, N.I. and Cao, K.F. (2008) Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(6): 769-777.

- Farfan-Vignolo E.R. and Asard, H. (2012) Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59: 55-62.
- Filippou, P., Antoniou, C. and Fotopoulos, V. (2011) Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2): 270-277.
- Ghorbanli, M., Bakhshi, K.G. and Zakeri, A. (2012) Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(4):647-658.
- Gunes, A., Pilbeam, D.J., Inal, A. and Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(13-14): 1885-1903.
- Hare, P. and Cress, W. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21(2): 79-102.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. and Grill, D. (2002) Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6): 691-696.
- Hu, L., Li, H., Pang, H. and Fu, J. (2012) Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 169 (2): 146-156.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(1): 110-116.
- Jnandabhiram, C. and Sailen-Prasad, B. (2012) Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* L.) genotypes of Assam, India II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 971-980.
- Kanani, S.M., Kasraie, P. and Abdi, H. (2013) Effects of late season drought stress on grain yield, protein, proline and ABA of bread wheat varieties. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(11): 2943-2952.
- Khodadadi, M. (2013) Effect of drought stress on yield and water relative content in chickpea. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(6): 1168-1172.
- Kumar, A., Bernier, J., Verulkar, S., Lafitte, H.R., Atlin, G.N. (2008) Breeding for drought tolerance: Direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations. *Field Crops Research*, 107: 221-231.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148C: 350-382.
- Lin, C.C. and Kao, C.H. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1-2): 147-153.
- Lisar, S.Y.S., Motafakkerzad, R., Hossain, M.M., Rahman, I.M.M. (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses. Pages: 1-14 in Rahman, M. and Hasegawa, H., eds. *Water Stress InTech: Rijeka, Croatia*.
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L. and Yang, R. (2011) Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 174-183.

- Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C.H. (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56(411): 417-423.
- Luo, H., Li, H., Zhang, X. and Fu, J. (2011) Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology*, 20:770-778.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. and Sohrabi, Y. (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8):580-585
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2): 139-158.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G.A. and Panneerselvam, R. (2007) Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2): 141-149.
- Massacci, A., Nabiev, S., Pietrosanti, L., Nematov, S., Chernikova, T., Thor, K. and Leipner, J. (2008) Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(2): 189-195.
- Mckersie, B.D., Bowley, S.R. and Jones, K.S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 119(3): 839-848.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1): 131-140.
- Nayyar, H. and Walia, D. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 46(2): 275-279.
- Pan, Y., Wu, L.J. and Yu, Z.L. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, 49(2-3): 157-165.
- Peltzer, D., Dreyer, E. and Polle, A. (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(2): 141-150.
- Rabiei, R. (2003) Physiological and morphological reaction of some grapes varieties to drought stress. Iranian Ph.D. Thesis of Tehran University.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11): 1189-1202.
- Rezaei, M.A., Jokar, I., Ghorbanli, M., Kaviani, B. and Kharabian-Masouleh, A. (2012) Morpho-physiological improving effects of exogenous glycine betaine on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. PS under drought stress conditions. *Plant Omics*, 5(2):70-86.
- Robinson, J.M. and Bunce, J.A. (2000) Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbate level and redox status1, 2. *International Journal of Plant Science*, 161(2): 271-279.
- Sayyari, M., Ghavami, M., Ghanbari, F. and Kordi, S. (2013) Assessment of salicylic acid impacts on growth rate and some physiological parameters of lettuce plants under drought stress conditions. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(17): 1951-1957.

- Sgherri, C., Stevanovic, B. and Navari-Izzo, F. (2004) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, 122(4): 478-485.
- Shanjani, P.S., Izadpanah, M. and Mohamadpour, M.R. (2014) Effects of water stress on germination of yarrow populations (*Achillea* Spp.) from different bioclimatic zones in Iran. *Plant Breeding and Seed Science*, 68(1): 39-54.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46(3): 209-221.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 52: 27-58.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Khodambashi, M. and Sofo, A. (2011) Regulation of the ascorbate-glutathione cycle in wild almond during drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1): 76-84.
- Troll, W. and Lindsley, J. (1955) A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry*, 215(2): 655-660.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H; (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1): 223-231.
- Upadhyaya, H., Panda, S.K. and Dutta, B. K. (2008) Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4): 457-468.
- Zhou, Z.S., Wang, S.J. and Yang, Z.M. (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70(8): 1500-1509.
- Zhu, Z., Liang, Z., Han, R. and Wang, X. (2009) Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC. growth and saikosaponin production. *Industrial Crops and Products*, 29(2): 629-633.

Survey of antioxidant defensive responses in three genotypes of *Lolium perenne* under drought stress

F.Tarkesh-Esfahani¹, L.Shabani^{2*}, M.R. Sabzalian³

Received: 2017.5.24

Accepted: 2017.10.16

Abstract

The aim of the present study was aimed to investigate the effect of drought stress on antioxidant defensive responses of three genotypes of *Lolium perenne*. This investigation was performed as factorial and a completely randomized complete design with three replications under field conditions. The results indicated that drought stress significantly decreased the relative water content (RWC), fresh and dry weight, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid contents, while the concentration of H₂O₂ and proline increased. Also, compared to the control, the activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) increased due to drought stress. Regarding results of the relative water content, the activity of antioxidant enzymes and proline content, it can be concluded that genotype 1 had more tolerance to drought compared to the two other genotypes.

Keyword: Antioxidant, Drought, H₂O₂, *Lolium*, Proline.

1- Department of Plant Science, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Department of Plant Science, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

*(Corresponding Author: lshabani@gmail.com)

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111

عادات غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در رودخانه بهشت‌آباد

چهارمحال و بختیاری

مسیب عالی‌پور^۱، یزدان کیوانی^{۲*}، عیسی ابراهیمی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۶

چکیده

ویژگی‌های تغذیه‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جمع‌آوری ۳۵۵ نمونه از رودخانه مورد بررسی قرار گرفت. دامنه طول کل ماده‌ها ۱۷/۱-۴۰/۲ (SD ۵۴/۰۵/۲۶/۴±) و نرها ۵/۵-۱۵/۳ (SD ۲۴/۵±۹/۹۳) سانتی‌متر بود. از کل معده‌ها، ۳۹ معده خالی بود (۱۱٪) و در فصول مختلف اختلاف معنی‌داری نداشتند. این ماهی، ۴۵ آرایه غذایی از ۱۰ رده را مورد مصرف قرار داد. گروه‌های شناسایی شده شامل کرم‌های حلقوی و پهن، بندپایان، نرم‌تنان، مرجان‌های آب شیرین و ماهیان استخوانی بود. سخت‌پوستان، حشرات، شکم‌پایان و ماهی‌های استخوانی در تمامی ماه‌های سال توسط این گونه مورد مصرف قرار گرفت. ترکیب جیره غذایی نر و ماده تفاوت مشخصی را نشان نداد؛ رده‌های غذایی عمده توسط هر دو جنس مصرف شدند، ولی با اندازه ماهی دارای تفاوت معنی‌داری بود. میانگین اندازه طعمه با افزایش ماهی افزایش یافت. در مجموع، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دامنه وسیعی از مواد غذایی جانوری را مصرف می‌کند و یک گونه گوشتخوار به شمار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: آزادماهیان، تغذیه، جیره غذایی

مقدمه

ورود ماهیان غیربومی به آب‌های شیرین می‌تواند ساختار و عملکرد اکوسیستم آن را تهدید کند که به عنوان یک اتفاق خطرناک به حساب می‌آید و منجر به کاهش جمعیت ماهیان بومی، به دلیل شکار، رقابت برای مواد غذایی و زیستگاه، می‌شود (Simon & Townsend, 2003; Kitano, 2004; Molineri, 2008; Keivany et al., 2016). آبرزی‌پروری به طور فزاینده‌ای رو به گسترش است و در سراسر جهان، آزادماهیان و خصوصاً قزل‌آلا به سرعت در حال توسعه است و یک راه پراکنش گونه‌های غیربومی است (Erguden et al., 2010). آزادماهیان وارد شده به

۱- دانش‌آموخته گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول: keivany@cc.iut.ac.ir

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.

اکوسیستم‌های آب شیرین موجب کاهش جمعیت‌های طبیعی آزادماهیان نیمکره شمالی شده است؛ همچنین، در نیمکره جنوبی نیز اثرات منفی بر ماهیان بومی داشته است. آبزی‌پروری مدرن برای آزادماهیان از سال ۱۹۸۰ شروع شد. بیشترین سهم، مربوط به قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و سپس آزادماهی اطلس (*Salmo salar*)، کوهو (*O. kisutch*) و چینوک (*O. tshawytscha*) بوده است (Arismendi et al., 2009).

اگرچه اطلاعات خوبی در مورد خصوصیات زیست‌شناختی گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان در منابع آبی کشورهای دیگر وجود دارد (Angradi & Griffith, 1990; Kido et al., 1999; Rikardsen & Sandring, 2006; Sandring, 2006; Molineri, 2010; Cocan, 2010; Erguden et al., 2010; Shafaeepour & Gorji, 2005)، اطلاعات این گونه در آب‌های ایران اندک است (Abdoli & Mirdar, 2013) و بیشتر در ارتباط با پرورش و تولیدمثل این ماهی در شرایط اسارت است. هدف از این مطالعه دستیابی به اطلاعات زیست‌شناسی این ماهی در محیط‌های طبیعی می‌باشد؛ بدین منظور، عادات غذایی گونه با بررسی محتویات معده و اندازه‌گیری برخی شاخص‌های تغذیه‌ای، مانند شاخص فرکانس حضور (Frequency index)، شاخص عددی (Numerical index)، درصد اهمیت (Relative importance) و شاخص تهی‌بودن (Vacuity index)، در ارتباط با جنس، ماه و فصل در رودخانه بهشت‌آباد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رودخانه جونقان از شهرستان فارس استان چهارمحال و بختیاری سرچشمه می‌گیرد و یکی از سرشاخه‌های رودخانه بهشت‌آباد و کارون می‌باشد. آب مناسب این رودخانه سبب احداث کارگاه‌های پرورش ماهی در کنار آن شده و زمینه ورود ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به اکوسیستم طبیعی این رودخانه را فراهم نموده است. نمونه‌برداری از رودخانه بهشت‌آباد در استان چهارمحال و بختیاری در محل پل بهشت‌آباد به صورت ماهیانه از فروردین تا اسفند ۱۳۹۲ با استفاده از تور پرتابی با چشمه ۴ سانتی‌متر، تور گوشگیر با چشمه‌های ۲ تا ۶ سانتی‌متر، تور پره و تورهای محلی انجام گرفت. در مجموع ۳۵۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جمع‌آوری شد. نمونه‌های صید شده پس از بی‌هوشی در محلول ۱٪ گل‌میخک، با یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند که در نهایت منجر به مرگ آنها شد. در آزمایشگاه اندازه‌گیری طول کل (Total length)، طول استاندارد (Standard length)، طول چنگالی (Fork length) و وزن انجام شد. طول نمونه‌ها بوسیله کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر و وزن آنها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. تعیین جنسیت نمونه‌ها، بصورت میکروسکوپی بر اساس برش گنادها و مشاهده ساختار آن از نظر وجود دانه‌های تخمک یا فقدان آنها و همچنین رنگ و رگ‌های خونی انجام و تعیین سن با استفاده از فلس‌های جلویی بالای خط جانبی انجام شد.

جهت بررسی محتویات معده و روده، دستگاه گوارش هر نمونه خارج شد. سپس طول دستگاه گوارش از ابتدای مری

تا انتهای روده اندازه‌گیری شد و بعد از توزین، محتویات آن خارج و وزن معده و روده خالی نیز اندازه‌گیری شد. محتویات موجود در دستگاه گوارش جهت شناسایی و آنالیزهای بعدی در محلول فرمالین ۴٪ نگهداری شد. جهت شناسایی ذرات غذایی مصرف شده، محتویات معده به کمک میکروسکوپ تشریح جداسازی و طبقه‌بندی شد. گروه‌های طعمه بسته به نوع و سطح (میزان) هضم هر ذره، با استفاده از کلیدهای شناسایی مختلف (Elliott *et al.*, 1988; Pescador *et al.*, 2000 & 2004; Pescador & Richard, 2004) تا پایین‌ترین سطح سیستماتیک ممکن شناسایی و شمارش شدند. در صورت عدم وجود ساختارهایی که بتوان ذره غذایی را به کمک آن شناسایی کرد و نیز مواردی که میزان هضم بالا بود، ماده مصرف شده به عنوان ناشناس در نظر گرفته شد. جهت تعیین وضعیت و شرایط تغذیه و نیز تعیین اهمیت هر گروه طعمه، از شاخص‌های زیر استفاده شد. بر اساس مقادیر ثبت شده‌ی این شاخص‌ها می‌توان وضعیت هر ذره غذایی و یا گروه‌های غذایی را مشخص نمود. بر این اساس، برخی ذرات به عنوان غذای تصادفی، برخی به عنوان غذای ثانویه و برخی به عنوان غذای ترجیحی یک گونه در نظر گرفته می‌شوند. این شاخص بصورت مقابل قابل محاسبه است:

$$F = \frac{M}{N} \times 100$$

که در آن M تعداد معده‌هایی است که دارای گونه غذایی مورد نظر هستند و N تعداد کل ماهیان بررسی شده با معده پر است (Hyslop, 1980). مقادیر ثبت شده برای این شاخص بر اساس طبقه‌بندی (Yanez-Arancibia *et al.*, 1976) انجام شد ($F < 10\%$ غذای تصادفی، $10\% < F < 50\%$ غذای ثانویه و $F > 50\%$ غذای ترجیحی). شاخص فراوانی عددی (%N) یا تعداد طعمه در لوله گوارش، از رابطه زیر بدست آمد؛ که در آن، n تعداد ذرات غذایی خورده شده و P تعداد کل ذرات غذایی خورده شده در هر شکم است (Hyslop, 1980).

$$N = \frac{n}{P} \times 100$$

شاخص تهی بودن دستگاه گوارش (%VI) که در آن N_v تعداد معده‌های خالی و N_e تعداد کل معده‌های بررسی شده است، از رابطه زیر محاسبه شد:

$$VI = \frac{N_v}{N_e} \times 100$$

شاخص طول نسبی روده به صورت زیر محاسبه شد؛ که در آن، L_g برابر با طول روده و L_t برابر با طول کل ماهی است (Horn & Ojeda, 1999).

$$RLG = \frac{L_g}{L_t}$$

شاخص معدی (GSI)، که شدت تغذیه را بررسی می‌کند از فرمول زیر است (Desai, 1970):

$$G_a.S.I = \frac{W(stomach)}{W(total)} \times 100$$

شاخص اهمیت نسبی (RI) و درصد اهمیت نسبی (RI%) نیز از فرمول‌های زیر بدست آمد که در آن‌ها N درصد فراوانی

عددی، W درصد فراوانی وزنی و F فرکانس حضور شکار می باشد:

$$RI = F \times (W + N)$$

$$RI\% = \frac{RI}{\sum RI} \times 100$$

تفاوت‌های آماری شاخص فراوانی، حضور آرایه‌های غذایی در ارتباط با فصل و گروه‌های طولی، مقایسه شاخص معدی و ضریب وضعیت، به کمک آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست توکی انجام شد. برای مقایسه فراوانی و شاخص فرکانس حضور آرایه‌های غذایی بین دو جنس و وجود یا عدم وجود تفاوت در میانگین طول گروه‌های سنی مختلف و همچنین میانگین وزن در گروه‌های سنی، از آزمون t مستقل استفاده شد. همچنین، برای تغییرات شاخص تهی بودن و وجود یا عدم وجود تفاوت آماری در نسبت جنسی، از آزمون مربع کای استفاده شد. در آنالیزهای مربوط به تغذیه، برای کاهش اثرات مربوط به ذرات غذایی کمیاب بر روابط و همبستگی‌ها، تنها گروه‌های غذایی که فرکانس حضور و فراوانی آنها در طول سال بیشتر از ۵ درصد بود از لحاظ آمار مقایسه شدند. کلیه آنالیزها با سطح احتمال ۹۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 17.0 و Excel 2007 انجام شد.

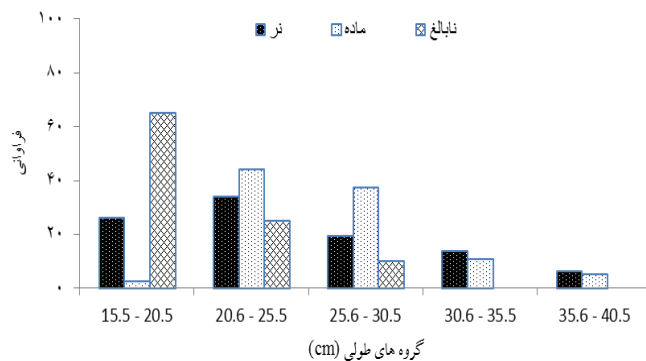
نتایج و بحث

ترکیب طولی و سنی

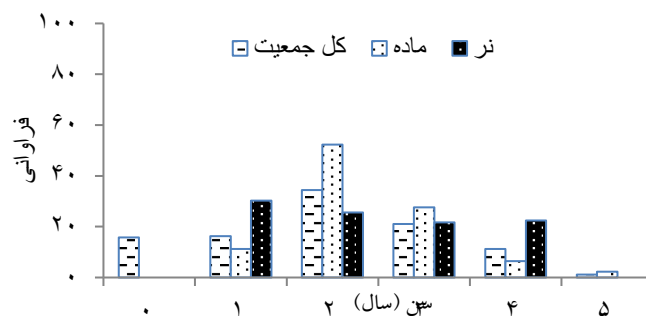
دامنه طول کل ماهی‌های صید شده ۸۲-۴۰۳ میلی‌متر (۲۴۱/۶۰ ± ۹/۳) و دامنه وزنی آنها ۵/۹۷-۷۷۲ گرم (۱۹۲/۱۴۹ ± ۹/۱) و شامل ۱۷۰ قطعه ماهی ماده، ۱۲۹ نر و ۵۶ نامشخص بود. بیشترین فراوانی ماهیان در گروه طولی ۲۰/۶ تا ۲۵/۵ سانتی‌متر بود (شکل ۱). دامنه طول کل برای ماهیان ماده ۱۷/۱-۴۰/۲ سانتی‌متر (۲۶/۴ ± ۰۵/۵۴) و برای ماهیان نر ۱۵/۵-۴۰/۳ سانتی‌متر (۲۴/۵ ± ۹/۹۳) تعیین شد. همچنین وزن ماهیان ماده ۵۶-۷۷۲ گرم (۲۱۸/۱۳۸ ± ۴۴/۳۵) و وزن ماهیان نر ۳۵-۷۳۸ گرم (۲۱۴/۱۶۳ ± ۹۸/۶۱) اندازه‌گیری شد (جدول ۱). همچنین گروه سنی برای جنس ماده ۱⁺-۵⁺ سال و برای جنس نر ۱⁺-۴⁺ سال بدست آمد. گروه سنی ۲⁺ برای جنس ماده و ۱⁺ برای جنس نر بیشترین فراوانی را داشتند (شکل ۲). این شاخص بر اساس آزمون مربع کای اختلاف معنی‌داری را در طول سال نشان نداد (p > ۰/۰۵).

جدول ۱: طول کل و استاندارد و وزن قزل آلابی رنگین کمان رودخانه بهشت آباد در ماه‌های مختلف سال ۱۳۹۲.

ماه	تعداد	طول کل (cm)			طول استاندارد (cm)			وزن (g)	
		حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین	حداکثر	میانگین
فرورد	۳۵	۱۰/۳	۳۸/۸	۲۲/۵±۱۶/۰۳	۷/۹	۳۵/۶	۱۹/۴±۵۷/۷	۱۳/۷	۶۶۱
اردیبه	۲۸	۱۱/۷	۲۸/۵	۲۰/۴±۷۴/۴۱	۹/۴	۲۵/۵	۱۸/۴±۳/۲	۱۸/۲۷	۳۰۱
خرداد	۳۰	۸/۲	۳۵	۲۳/۶±۴۸/۲۵	۶/۱	۳۲/۵	۲۰/۵±۹/۹۷	۶/۹	۵۳۱
تیر	۳۰	۹/۱	۴۰/۳	۲۷/۸±۳۳/۳۶	۷/۲	۳۶/۵	۲۴/۷±۴۷/۹۳	۹/۳	۷۷۲
مرداد	۲۶	۹/۵	۳۶/۴	۲۵/۷±۶۶/۷۳	۷/۴	۳۳/۶	۲۲/۷±۹۴/۳۵	۱۰/۷۴	۶۰۴
شهریو	۲۵	۸/۶	۳۹/۱	۲۴/۷±۴۳/۰۱	۶/۵	۳۲/۷	۲۱/۶±۲۸/۰۵	۵/۹۷	۶۷۰
مهر	۲۹	۱۵/۸	۳۹/۴	۲۴/۶±۵۲/۱۸	۱۳/۴	۳۵/۹	۲۱/۵±۹۲/۸۸	۳۶/۲	۶۷۵
آبان	۳۵	۱۵/۵	۳۹/۸	۲۳/۴±۰۷/۹۲	۱۳/۲	۳۶	۲۰/۴±۶۹/۵	۳۶	۶۹۵/۵
آذر	۳۶	۸/۴	۳۹/۷	۲۴/۴±۹۳/۴۵	۶/۱	۳۵/۸	۲۲/۴±۲۷/۲۵	۷/۴۵	۶۹۳/۲
دی	۲۴	۹/۴	۳۸/۴	۲۶/۶±۲۵/۱	۶/۹	۳۵/۲	۲۳/۵±۵/۸۷	۷/۶۱	۶۵۲/۲
بهمن	۳۰	۹/۷	۳۵	۲۴/۵±۳۶/۰۸	۷/۴	۳۰/۹	۲۱/۴±۷۸/۷۷	۷/۹	۵۵۵
اسفند	۲۷	۸/۷	۲۸/۴	۲۴/۴±۱۲/۲	۶/۳	۲۵/۴	۲۱/۴±۵/۱۲	۸/۴۷	۲۵۲



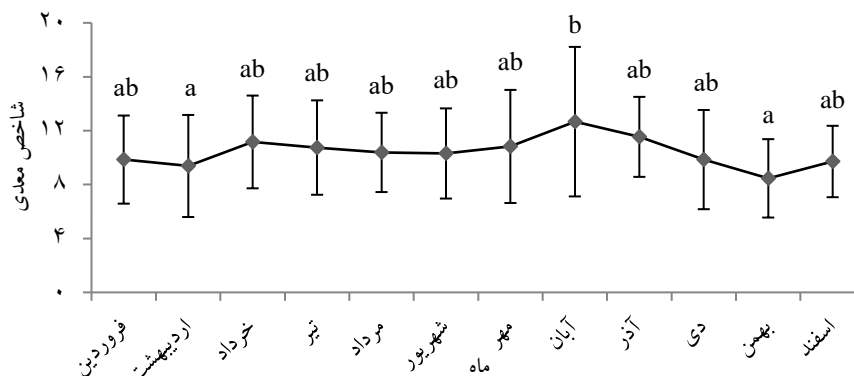
شکل ۱: توزیع فراوانی و دامنه طولی نمونه‌های قزل آلابی رنگین کمان رودخانه بهشت آباد چهارمحل و بختیاری در سال ۱۳۹۲



شکل ۲: فراوانی سنی ماهیان قزل آلابی رنگین کمان رودخانه بهشت آباد چهارمحل و بختیاری در سال ۱۳۹۲

شاخص معدی این ماهی نشان داد که شدت تغذیه در طول سال دارای نوسان کمی بود. مقادیر محاسبه شده برای این شاخص در برخی از ماه‌های سال از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0.05$). بیشینه آن ۱۲/۶۷ درصد در آبان و کمینه آن در اردیبهشت و بهمن مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری با مقدار آبان بود (شکل ۳). مقایسه شاخص معدی

ماهیان در طول ماه‌های مختلف سال به صورت جداگانه برای نر و ماده تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$) و بیشترین شدت تغذیه برای نر در مرداد و خرداد و برای ماده در آبان بود. اما، مقایسه این شاخص بین دو جنس تفاوت معنی‌داری در طول سال نشان نداد ($p > 0/05$) (شکل ۳). در مجموع ۴۵ نوع طعمه متعلق به ۱۰ رده در دستگاه گوارش این گونه شناسایی شد. گروه‌های شناسایی شده شامل کرم‌های حلقوی (کم‌تاران و زالوها)، کرم‌های پهن (تیره‌گران)، بندپایان (سخت‌پوستان، حشرات و عنکبوتیان)، نرم‌تنان (دوکفه‌ای‌ها، شکم‌پایان)، مرجان‌های آب شیرین و ماهیان استخوانی بود. از میان این ذرات، راسته مرجان‌ها و عنکبوتیان فقط در دو معده یافت شد. در معده‌های مورد بررسی سنگریزه و قطعات گیاهی نیز یافت شد ولی به عنوان ذره غذایی در نظر گرفته نشد. اکثر مواد غذایی تا قبل از رسیدن به روده (در داخل مری و معده) کاملاً سالم به نظر می‌رسید. میانگین طول نسبی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان $0/84 \pm 0/09$ محاسبه شد که کمترین آن $0/59$ و بیشترین آن $1/12$ بود. ذرات غذایی در معده، براساس شاخص عددی به ترتیب شامل Gasteropoda (۴۷/۹۴)، Crustacea (۲۶/۴۶)، Insecta (۲۲/۴۷)، Teleostei (۱/۱۴)، Oligocheata (۰/۹۸)، Hirudinea (۰/۶۷)، Turbellaria (۰/۱۶)، Lamellibranchiata (۰/۱)، Cnidaria (۰/۰۲) و Archanida (۰/۰۱) بود. بین گروه‌های غذایی، در طول سال اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$).



شکل ۳: تغییرات ماهیانه شاخص معدی قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲. خطوط عمودی: انحراف معیار.

آزادماهیان عموماً غیرانتخابی شکار می‌کنند و به عنوان ماهیان فرصت طلب مطرح هستند (Fochetti *et al.*, 2008). بر اساس نتایج حاصل از شاخص معدی و تهی بودن، به نظر می‌رسد شدت تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان در رودخانه بهشت‌آباد در بیشتر ایام سال دارای نوسان کمی است. کمترین میزان شاخص تهی بودن در پاییز و بیشترین آن در بهار بود. تغذیه مداوم و پیوسته در گونه‌های ماهیان ممکن است مرتبط با شرایط محیطی مطلوب و طولانی مدت باشد که منجر به تغذیه یک گونه در طول سال می‌شود. دلایل مختلفی برای کاهش شدت تغذیه در گونه‌های ماهیان در برخی از زمان‌ها وجود دارد که از جمله می‌توان به کاهش امکان دسترسی به غذا اشاره کرد (Casadevall *et al.*, 1994). مقایسه شدت تغذیه بین نر و ماده تفاوت آماری را در طول سال نشان نداد، اما مقایسه این شاخص در طول ماه‌های مختلف سال تفاوت نشان داد. در جنس ماده شدت تغذیه در

آبان بالا بود؛ در حالی که، این شاخص برای جنس نر در مرداد بیشتر بود. در مطالعه‌ی (Abdoli & Mirdar, 2013)، شاخص تهی بودن قزل‌آلای رنگین‌کمان ۷/۶۳ بدست آمد که با نتایج حاصل از این مطالعه در توافق می‌باشد.

در مطالعه‌ی (Oscoz *et al.*, 2005) در یکی از رودخانه‌های اسپانیا، نیز شاخص تهی بودن برای همین ماهی ۷/۱۴ درصد محاسبه گردید. میزان شاخص تهی بودن معده برای بچه‌های تازه بازگشته (Post-smolt) به دریا، برای این ماهی، در ماه اول فرار از کارگاه پرورش ماهی (ژوئن) ۱۳ درصد و در دو ماه بعد از فرار، صفر گزارش شد. این در حالی است که این مقدار برای ماهیان بالغ فراری در ماه مارس ۳۹ درصد و در ماه‌های بعدی بین صفر تا ۲۰ درصد متغیر بود. این مطالعه نشان داد که بچه ماهیان به آسانی خود را به طعمه‌های طبیعی عادت می‌دهند و تغذیه برای آنها نسبت به بالغین در شرایط طبیعی راحت‌تر است. این در حالی است که بالغین بعد از طی چند ماه این مهارت را بدست می‌آورند (Rikardsen & Sandring, 2006). در مطالعه (Erguden *et al.*, 2010)، شاخص تهی بودن در ماه می بالاترین میزان را داشت که با مطالعه حاضر تفاوت اساسی دارد. اصولاً، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یک ماهی پرخور است و متحمل گرسنگی نمی‌شود. البته در برخی موارد اختلافاتی وجود دارد که از جمله دلایل آن می‌توان به اقلیم، شرایط اکولوژیک و اختلافات درون گونه‌ای اشاره نمود. بالا بودن شاخص تهی بودن در بهار و مخصوصاً در اردیبهشت را می‌توان به سیلابی بودن و بارندگی شدید در زمان نمونه‌برداری مربوط دانست. این مسأله همچنین می‌تواند به مدت زمان فرار و یا سن ماهی ربط داشته باشد (Rikardsen & Sandring, 2006). بالا بودن این شدت تغذیه در آبان ماه را می‌توان به شرایط مناسب محیطی، دمای آب، مناسب بودن رژیم نوری، رها سازی آب‌های مورد استفاده در کشاورزی، مناسب شدن دبی آب و نیاز ماهی جهت تأمین و اختصاص انرژی بیشتر برای توسعه گنادها قبل از تخم‌ریزی مربوط دانست؛ در حالی که، پایین بودن این شاخص در اردیبهشت و بهمن ماه می‌تواند به زمان تخم‌ریزی، سرد بودن دمای آب و دبی بالای آب، به همراه سیلابی بودن رودخانه، مربوط باشد. تأثیر درجه حرارت آب، نیاز متابولیکی بدن ماهی و در دسترس بودن طعمه بر فعالیت‌های تغذیه‌ای ماهیان در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است. در زمستان، ماهی یک استراتژی با کمترین هزینه را اتخاذ می‌کند؛ در حالی که، در تابستان، زمانی که انرژی مورد نیاز برای سوخت و ساز و رشد بدن به بالاترین سطح می‌رسد، ماهی مصرف انرژی خالص خود را به حداکثر می‌رساند (Kara & Alp, 2005).

شاخص فرکانس حضور

براساس مقادیر بدست آمده از شاخص فرکانس حضور، قزل‌آلای رنگین‌کمان، Crustacea، Gasteropoda و Insecta را به عنوان غذای ترجیحی، Teleostei، Hirudinea و Oligocheata را به عنوان غذای ثانویه و Lamellibranchiata، Turbellaria، Archanida و Cnidaria را به عنوان غذای تصادفی مصرف می‌کند. بیشترین ذرات غذایی یافت شده در معده‌های مورد آزمایش بر اساس درصد شاخص اهمیت نسبی مربوط به Gasteropoda (۴۳/۳)، Crustacea (۲۹/۶)، Insecta (۱۶/۳)، Teleostei (۱۰/۴)،

Hirudinea (۰/۱۹)، Oligocheata (۰/۱۲)، Lamellibranchiata (۰/۰۵)، Archanida (۰/۰۰۲) و Coeleonterata (۰/۰۰۱) بود (جدول ۲).

از رده کم‌تاران، Lumbricidae دارای بیشترین فراوانی و حضور در معده‌ها در طول یکسال بود (%F=۹/۰۱، %N=۰/۵). از زالوها، Erpobdellidae دارای بیشترین حضور و فراوانی (%F=۱۵/۷۷، %N=۰/۶۱)؛ از کرم‌های پهن، Planariidae (%N=۰/۱۶)، Gammaridae (%F=۶/۷۶، %N=۲۶/۴۶)؛ از سخت‌پوستان، Chironomidae (%F=۸۶/۱۹، %N=۶/۶۱)؛ از حشرات، Sphaeriidae (%F=۴۲/۲۵، %N=۰/۰۱)؛ از عنکبوتیان، Arachnida (%F=۱/۱۲، %N=۰/۰۱)؛ از دوکفه‌ای‌ها، Lymnaeidae (%F=۷۴/۶۴، %N=۴۷/۹۴)؛ از مرجان‌ها، Hydra (%F=۰/۸۴، %N=۰/۰۲) و از ماهیان استخوانی، Cyprinodontidae (%F=۲۲/۵۳، %N=۰/۶۲) بود. همچنین، تمامی اقلام غذایی مذکور دارای بیشترین درصد اهمیت نسبی نیز بودند، فقط در گروه ماهیان استخوانی، ذره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیشترین درصد اهمیت نسبی را داشت.

تغذیه و جست‌جو برای غذا از جمله عواملی هستند که پراکنش، مهاجرت و رشد ماهیان را تنظیم می‌کنند و یا حداقل آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. ماهیان می‌توانند رفتار خود را بر اساس قابلیت دسترسی به غذا تغییر دهند. روش‌های متعددی برای تخمین ترکیب غذا بصورت کمی، در ماهیان شناخته شده است که از بین آنها فراوانی و حضور ذرات غذایی مختلف از مرسوم‌ترین روش‌ها می‌باشند (Oscoz *et al.*, 2005). حضور Crustacea, Gastropod, Insecta و Teleostei در Hirudinea سفره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد مشهود بود. بر اساس شاخص فرکانس حضور طعمه، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Crustacea, Gasteropoda و Insecta را به عنوان غذای ترجیحی، Teleostei, Hirudinea و Oligocheata را به عنوان غذای ثانویه و Turbellaria, Lamellibranchiata, Archanida و Cnidaria را به عنوان غذای تصادفی مصرف می‌کند. در مطالعه Kido *et al.*, (1999) روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هاوایی، بیشترین حضور مربوط Algae, Trichoptera, Mollusca, Odonata و Isopoda بود. در مطالعه Rikardsen & Sandring (2006)، بیشترین حضور در گروه post-smolt را Crustacea و Insecta، با ۷۴ درصد و ماهی با ۱۵ درصد در ماه اول بعد از فرار از کارگاه پرورش ی به خود اختصاص دادند. همچنین در این زمان، مواد غیرقابل هضم ۳۳ درصد حضور را به خود اختصاص دادند. در حالی که در معده بالغین مواد غیرقابل هضم در ماه اول بعد از فرار ۹۳ درصد فراوانی و ۶۲ تا ۹۰ درصد وزن کل محتویات را به خود اختصاص داد اما به مرور زمان و در ماه‌های بعدی بیشترین فراوانی در معده را ماهی تشکیل داد. (Oscoz *et al.*, 2005) غذای اصلی این ماهی را در رودخانه اوردرا اسپانیا شامل دوبالان خشکی‌زی و لارو و شفیره Chironomidae تشخیص داد. در مطالعه (Erguden *et al.*, 2010) Chironomidae بیشترین درصد اهمیت نسبی و Gasteropoda, Decapoda و Formacidae مشترکاً کمترین اهمیت را داشتند. براساس مطالعات Shafaeepour & Gorji (2004) در رودخانه بشار، سیاه‌ماهی و Hydropsychidae غذای اصلی و در رودخانه خرمناز Amphinemura, Amphipoda, Tipula, Hydropsychidae و سوسک‌های آبی‌زی غذای اصلی این ماهی بودند.

این در حالی است که بیشترین حضور محتوای دستگاه گوارش این ماهی در رودخانه بشار به ترتیب شامل سیاه‌ماهی، Hydropsychidae، پشه و مورچه، خرچنگ، لارو Tipula از دوبلان و کرم خاکی، و در رودخانه خرمناز به ترتیب شامل Plecoptera، Amphipoda، Hydropsychidae، Diptera، Ephemeroptera، Elmidae، Cordulegasteridae، Trichoptera، مورچه و پشه و دیگر حشرات نامشخص گزارش شده است. همچنین در مطالعات مشابه در رودخانه پارک ملی گلستان توسط (Abdoli & Mirdar 2013) غذای اصلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Trichoptera، Ephemeroptera، Diptera و Gammaridae تشخیص داده شد، که بیشترین فراوانی و حضور مربوط به Ephemeroptera، Gammaridae و Trichoptera بود. لازم به ذکر است که فراوانی حشرات خشکی‌زی بیشتر از Trichoptera بود. در مطالعه حاضر، ۴۵ ذره غذایی مختلف در معده ماهی‌ها شناسایی شد که مطابقت بالایی را با مطالعه فوق از نظر تعداد طعمه خورده شده دارد؛ ولی، چون تعدادی از ذرات غذایی فقط در تعداد معدودی از معده‌ها یافت شد و یا مربوط به یک ماه یا فصل خاص بود در ۱۰ گروه عمده غذایی تجمیع شدند. بیشتر ذرات غذایی یاد شده جزو همین گروه‌های غذایی بودند و اختلافات، مربوط به اولویت در فراوانی، حضور و درصد اهمیت نسبی می‌باشد. بطوری که از زالوها، Erpobdellidae دارای بیشترین حضور و فراوانی؛ از سخت‌پوستان، Gammaridae؛ از حشرات، Chironomidae؛ از شکم‌پایان، Lymnaeidae و از ماهیان استخوانی، Cyprinodontidae بیشترین حضور و فراوانی را داشتند. لازم به ذکر است که در معده بسیاری از نمونه‌ها قطعات چوب، سنگ و حتی تکه‌های گوشت با منشأ حیوانات خشکی نیز یافت شد، ولی به دلیل نداشتن معیاری برای شمارش، در رژیم غذایی محاسبه نشدند. یافت شدن سنگ و قطعات گیاهی در معده آزادماهیان شاید به دلیل تشابه شکل با پلت مصنوعی و عادت غذا خوردن آنها در اسارت باشد و یا ممکن است به همراه سایر ذرات غذایی چسبیده به بستر و گیاهان باشد (Rikardsen & Sandring, 2006).

مقایسه تغییرات فصلی و ماهیانه گروه‌های غذایی

بررسی تغییرات فصلی گروه‌های غذایی نشان داد که Crustacea، Hirudinea، Insecta، Gastropoda، Teleostei و Lamellibranchiata در تمام طول سال توسط این گونه مورد مصرف قرار گرفت. بیشترین حضور فصلی مربوط به Crustacea در تابستان ($F=90/12\%$) و بیشترین فراوانی مربوط به Gastropoda در فصل پاییز ($N=55/33\%$) بود. Oligochaeta فقط در بهار و زمستان مشاهده شد؛ هرچند، بیشترین حضور و فراوانی مربوط به آن در بهار بدست آمد. Arachnidae در بهار و پاییز مشاهده شد؛ که آن‌هم در بهار بیشترین حضور و فراوانی را دارا بود. Coeleonterata فقط در فصل بهار مشاهده شد. بیشترین حضور و فراوانی Hirudinea در بهار و کمترین آن در پاییز بود.

بیشترین حضور و فراوانی Platyhelminthes در بهار بود و در زمستان مشاهده نشد. برای Crustacea بیشترین حضور در تابستان، بیشترین فراوانی در زمستان و کمترین حضور و فراوانی در بهار مشاهده شد. بیشترین حضور و فراوانی Insecta در

بهار و کمترین حضور و فراوانی آنها به ترتیب در پاییز و زمستان بود. بیشترین حضور و فراوانی Lamellibranchiata در زمستان و کمترین حضور و فراوانی به ترتیب در بهار و پاییز مشاهده شد. Gastropoda بیشترین و کمترین حضور را به ترتیب در تابستان و بهار و بیشترین و کمترین فراوانی را به ترتیب در پاییز و زمستان دارا بود. برای Teleostei بیشترین فراوانی و حضور در معده‌های آزمایش شده مربوط به تابستان، و کمترین مربوط به بهار بود. شکل ۴ تغییرات فصلی گروه‌های غذایی را بر اساس شاخص فرکانس حضور و شاخص عددی مواد غذایی نشان می‌دهد.

از بین گروه‌های غذایی، بر اساس درصد اهمیت نسبی، در بهار Crustacea (۳۲/۲)، Insecta (۲۹/۷) و Gastropoda (۲۸/۵) دارای بیشترین اهمیت بودند. در تابستان و پاییز Crustacea، Gastropoda و Teleostei از اهمیت بیشتری برخوردار بودند. در زمستان Crustacea (۴۳/۸)، Gastropoda (۳۵/۱) و Insecta (۱۵/۸) دارای اهمیت نسبی بیشتری بودند (شکل ۴). بر اساس آزمون آماری، فراوانی (%N) و حضور (%F) گروه‌های غذایی عمده به صورت جداگانه، تفاوت فصلی مشخصی را نشان داد ($p < 0.05$). همچنین مقایسه فراوانی و حضور با همدیگر در هر فصل بصورت جداگانه، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0.05$). Gammaridae و Lymnaeidae، در فصل بهار، تابستان و پاییز به ترتیب دارای بیشترین حضور و فراوانی بودند. همچنین در فصل زمستان Gammaridae بیشترین حضور و فراوانی را دارا بود (جدول ۳).

جدول ۲: ترکیب جیره غذایی، شاخص فرکانس حضور و شاخص عددی هر ماده غذایی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد.

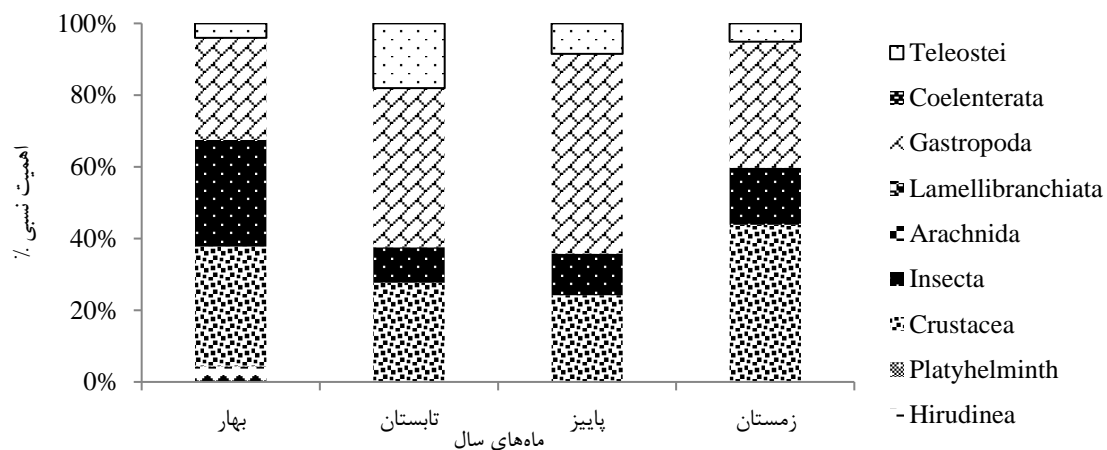
ماده غذایی	%N	%F
Oligochaeta	۰/۹۸	۱۱/۵۴
Lumbricidae	۰/۵	۹/۰۱
Lumbriculidae	۰/۳۵	۷/۸۸
Tubificidae	۰/۰۶	۳/۰۹
Naididae	۰/۰۳	۱/۹۷
Haplotaxidae	۰/۰۲	۱/۴
Hirudinea	۰/۶۷	۱۶/۶۱
Erpobdellidae	۰/۶۱	۱۵/۷۷
Piscicolidae	۰/۰۵	۲/۵۳
Platyhelminthes	۰/۱۶	۶/۷۶
Planariidae	۰/۱۶	۶/۷۶
Crustacea	۲۶/۴۶	۸۶/۱۹
Gammaridae	۲۶/۴۶	۸۶/۱۹
Insecta	۲۲/۴۷	۷۳/۲۳
Corixidae	۰/۲۶	۱۱/۸۳
Hydrometridae	۰/۰۶	۳/۹۴
Gerridae	۰/۱۴	۷/۳۲
Veliidae	۰/۰۸	۵/۰۷
Gyrinidae	۰/۱	۵/۳۵
Haliplidae	۰/۰۶	۴/۲۲
Dytiscidae	۰/۴۲	۱۴/۰۸
Helmidae	۰/۳	۸/۱۷
Nemouridae	۲/۱	۲۹/۵۸
Perlidae	۱/۶	۲۶/۴۸
Caenidae	۱/۱	۲۵/۶۳
Ephemeraeidae	۰/۵۳	۱۴/۹۳
Ephemereidae	۰/۵۷	۱۸/۰۳

۱۷/۷۴	۰/۶۴	Ecdyonuridae
۱۶/۰۵	۰/۴۶	Leptophelebiidae
۲۷/۰۴	۱/۳۴	Baetidae
۴۲/۲۵	۶/۶۱	Chironomidae
۱۱/۸۳	۰/۲۶	Tipolidae
۲۳/۳۸	۱/۹۹	Simuliidae
۶/۷۶	۰/۱۲	Tabanidae
۶/۲	۰/۱۷	Anthomyiidae
۱۲/۱۱	۰/۴۱	Hydropsychidae
۸/۱۷	۰/۱۷	Rhyacophilidae
۳/۹۴	۰/۰۹	Philopotamidae
۲۰/۵۶	۲/۲	Zygoptera
۵/۰۷	۰/۱۳	Gomphidae
۱۱/۵۵	۰/۳۱	Cordulagasteridae
۷/۸۹	۰/۲	Other insect
۱/۱۲	۰/۰۱	Arachnida
۱/۱۲	۰/۰۱	Arachnida
۴/۲۲	۰/۱	Lamellibranchiata
۴/۲۲	۰/۱	Sphaeriidae
۷۴/۶۴	۴۷/۹۴	Gastropoda
۷۴/۶۴	۴۷/۹۴	Lymnaeidae
۰/۲۸	۰/۰۱	Valvatidae
۰/۸۴	۰/۰۲	Coelenterata
۰/۸۴	۰/۰۲	Hydra
۲۹/۲۹	۱/۱۴	Teleostei
۱۳/۸	۰/۴۳	Salmonidae
۵/۶۳	۰/۱	Cyprinidae
۲۲/۵۳	۰/۶۲	Cyprinodontidae

جدول ۳: تغییرات فصلی شاخص فرکانس حضور (%F) و شاخص عددی (%N) گروه‌های غذایی مصرف شده توسط قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲. بخش‌های ضخیم شده رده‌ها، تعداد و فراوانی کل آنها می‌باشد.

ماده غذایی	بهار		تابستان		پاییز		زمستان	
	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N
Oligochaeta	۳/۲	۴۳/۰۱	۱/۲۳	۰/۰۹
Lumbricidae	۱/۶۷	۳۴/۴
Lumbriculidae	۱/۱۷	۳۰/۱
Tubificidae	۰/۲۱	۱۱/۸۲
Naididae	۰/۰۹	۷/۵۲
Haplotaxidae	۰/۰۴	۴/۳	۱/۲۳	۰/۰۹
Hirudinea	۱/۶۵	۴۳/۰۱	۰/۷	۱۹/۷۵	۱	۰/۰۲	۲/۴۶	۰/۰۷
Erpobdellidae	۱/۴۷	۳۹/۷۸	۰/۷	۱۹/۷۵	۱	۰/۰۲	۲/۴۶	۰/۰۷
Piscicolidae	۰/۱۷	۹/۶۷
Platyhelminthes	۰/۲۸	۱۱/۸۲	۰/۱۳	۴/۹۳	۹	۰/۱۵	.	.
Planariidae	۰/۲۸	۱۱/۸۲	۰/۱۳	۴/۹۳	۹	۰/۱۵	.	.
Crustacea	۲۰/۷۴	۸۱/۷۲	۲۸/۴۱	۹۰/۱۲	۸۹	۲۲/۷۸	۸۳/۹۵	۴۴/۴۲
Gammaridae	۲۰/۷۴	۸۱/۷۲	۲۸/۴۱	۹۰/۱۲	۸۹	۲۲/۷۸	۸۳/۹۵	۴۴/۴۲
Insecta	۳۲/۱۴	۸۱/۷۲	۱۴/۴۱	۷۲/۸۳	۶۷	۲۰/۴	۷۱/۶	۱۹/۲۱
Corixidae	۰/۱۵	۱۳/۹۷	۰/۰۷	۳/۷	۱۷	۰/۴۴	۱۱/۱۱	۰/۴
Hydrometridae	۰/۰۶	۵/۳۷	۰/۱۲	۴/۹۳	۵	۰/۰۶	.	.
Gerridae	۰/۲۶	۱۹/۳۵	۰/۰۷	۳/۷	۵	۰/۱۲	.	.
Veliidae	۰/۱۵	۱۱/۸۲	۰/۰۴	۳/۷	۴	۰/۰۸	.	.
Gyrinidae	۰/۲۶	۱۶/۱۲	۰/۰۷	۳/۷	۱	۰/۰۱	.	.
Halipidae	۰/۱۵	۱۳/۹۷	۰/۰۳	۱/۲۳	۱	۰/۰۲	.	.
Dytiscidae	۰/۴۳	۲۵/۸	۰/۲۴	۷/۴	۱۱	۰/۵	۱۱/۱۱	۰/۵۲
Helmidae	۰/۴۲	۲۰/۴۳	۰/۰۶	۱/۲۳	۶	۰/۳۸	۳/۷	۰/۲۱
Nemouridae	۳/۱۷	۴۸/۳۸	۲/۳۷	۴۰/۷۴	۲۰	۱/۵	۸/۶۴	۰/۷۳
Perlidae	۲/۶۱	۴۷/۳۱	۱/۳۳	۲۸/۳۹	۲۱	۱/۳	۷/۴	۰/۵۲

۸/۶	۰/۹	۱۶	۰/۷۸	۱۸/۵۱	۰/۶۵	۵۶/۹۸	۱/۸۶	Caenidae
۳/۷	۰/۲۸	۸	۰/۲۷	۹/۸۷	۰/۲۴	۳۶/۵۵	۱/۱۲	Ephemeraeidae
۱/۲۳	۰/۰۲	۱۰	۰/۳	۲۲/۲۲	۰/۹۱	۳۷/۶۳	۰/۸۷	Ephemereididae
۳/۷	۰/۱۴	۱۱	۰/۵۱	۱۴/۸۱	۰/۲۷	۳۹/۷۸	۱/۲۷	Ecdyonuridae
۳/۷	۰/۲۱	۱۰	۰/۳۴	۸/۶۴	۰/۲۷	۳۹/۷۸	۰/۸۶	Leptophelebiidae
۱۱/۱۱	۰/۷۸	۱۵	۰/۷۴	۲۲/۲۲	۱/۰۵	۵۸/۰۶	۲/۴۸	Baetidae
۲۹/۶۲	۴/۲۸	۳۷	۷/۷۹	۳۰/۸۶	۲/۸۷	۶۸/۸۱	۹/۱	Chironomidae
۸/۶۴	۰/۳۳	۴	۰/۰۹	۸/۶۴	۰/۱۶	۲۵/۸	۰/۴۷	Tipolidae
۱۱/۱۱	۰/۹	۱۱	۰/۹۳	۱۶/۰۴	۱/۰۶	۵۳/۷۶	۴/۳۵	Simuliidae
۳/۷	۰/۱۹	۳	۰/۰۵	۶/۱۷	۰/۱	۱۳/۹۷	۰/۱۶	Tabanidae
.	.	۵	۰/۲۶	۱۱/۱۱	۰/۲۱	۸/۶	۰/۱۳	Anthomyiidae
۷/۴	۰/۵۹	۸	۰/۲	۱۲/۳۴	۰/۷۷	۲۰/۴۳	۰/۳۱	Hydropsychidae
۴/۹۳	۰/۳۵	۳	۰/۰۶	۹/۸۷	۰/۲۱	۱۵/۰۵	۰/۱۸	Rhyacophilidae
۱/۲۳	۰/۰۷	۱	۰/۰۴	۱/۲۳	۰/۰۴	۱۱/۸۲	۰/۱۹	Philopotamidae
۴۴/۴۴	۷/۴۶	۲۸	۳/۱۳	.	.	۹/۶۷	۰/۳۴	Zygoptera
.	.	۲	۰/۰۳	۱۸/۵۱	۰/۵۳	۱/۰۷	۰/۰۱	Gomphidae
۲/۴۶	۰/۰۷	۱۲	۰/۲۷	۹/۸۷	۰/۴۱	۲۰/۴۳	۰/۳۹	Cordulagasteridae
۲/۴۶	۰/۱۹	۶	۰/۱۷	۴/۹۳	۰/۱۵	۱۷/۲	۰/۲۶	Other insect
.	.	۲	۰/۰۲	.	.	۲/۱۵	۰/۰۳	Arachnida
.	.	۲	۰/۰۲	.	.	۲/۱۵	۰/۰۳	Arachnida
۸/۶۴	۰/۴۵	۶	۰/۰۷	۱/۲۳	۰/۰۳	۱/۰۷	۰/۰۲	Lamellibranchiata
۸/۶۴	۰/۴۵	۶	۰/۰۷	۱/۲۳	۰/۰۳	۱/۰۷	۰/۰۲	Sphaeriidae
۷۲/۸۳	۳۴/۴۸	۸۳	۵۵/۳۳	۸۳/۹۵	۵۴/۵۴	۵۹/۱۳	۴۱/۲۵	Gastropoda
۷۲/۸۳	۳۴/۴۸	۸۳	۵۵/۳۱	۸۳/۹۵	۵۴/۵۴	۵۹/۱۳	۴۱/۲۵	Lymnaeidae
.	.	۱	۰/۰۲	Valvatidae
.	۳/۲۲	۰/۰۷	Coelenterata
.	۳/۲۲	۰/۰۷	Hydra
۲۵/۹۲	۱/۲۶	۳۳	۱/۲۱	۳۳/۳۳	۱/۷۶	۲۴/۷۳	۰/۵۷	Teleostei
۶/۱۷	۰/۲۱	۱۵	۰/۳۵	۲۵/۹۲	۱/۰۳	۸/۶	۰/۱۶	Salmonidae
۱/۲۳	۰/۰۴	۸	۰/۱۴	۱۱/۱۱	۰/۱۸	۲/۱۵	۰/۰۲	Cyprinidae
۲۳/۴۵	۰/۹۹	۲۳	۰/۷۲	۲۰/۹۸	۰/۵۴	۲۲/۵۸	۰/۳۸	Cyprinodontidae



شکل ۴: تغییرات فصلی درصد اهمیت نسبی گروه‌های غذایی مصرف شده توسط قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد.

بررسی تغییرات ماهیانه گروه‌های غذایی مصرف شده توسط ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که Crustacea، Insecta، Gastropoda و Teleostei در تمامی ماه‌های سال توسط این گونه مورد مصرف قرار می‌گیرد. از این بین، Oligochaeta فقط در ماه‌های بهار و بهمن، Arachnida در خرداد، مهر و آبان و Coelenterata در اردیبهشت و خرداد مشاهده شدند و بیشترین فراوانی حضور را در اردیبهشت داشتند. بیشترین حضور و فراوانی Oligochaeta در فروردین بود. بیشترین حضور Hirudinea در فروردین

و بیشترین فراوانی آن در اردیبهشت بود؛ در حالی که، در آبان، آذر و بهمن این شاخص ها صفر بودند. بیشترین حضور *Platyhelminthes* در مهر و بیشترین فراوانی آن در اردیبهشت بود. بیشترین حضور و فراوانی *Crustacea* به ترتیب در شهریور و اسفند و کمترین این شاخص‌ها در اردیبهشت و مهر مشاهده شد. *Insecta* در آبان بیشترین حضور و در اردیبهشت بیشترین فراوانی را دارا بود؛ در حالی که، در آذر دارای کمترین حضور و فراوانی بود. *Arachnida* در خرداد و *Lamellibranchiata* دارای بیشترین حضور و فراوانی بود. بیشترین حضور و فراوانی *Gastropoda* در شهریور و کمترین این شاخص‌ها در اردیبهشت بود. بیشترین حضور و فراوانی *Teleostei* به ترتیب در آذر و مرداد و کمترین حضور و فراوانی آن نیز در اردیبهشت و فروردین بود. بر اساس درصد اهمیت نسبی گروه‌های غذایی، *Crustacea* در ماه‌های فروردین، تیر، مرداد، دی، بهمن و اسفند به ترتیب با ۴۶/۵، ۳۵/۵، ۳۲/۵، ۳۷/۹، ۵۱/۵ و ۴۸/۳ درصد دارای بیشترین درصد اهمیت نسبی بود. *Insecta* فقط در اردیبهشت با ۵۴/۰۲ درصد دارای بیشترین درصد اهمیت نسبی بود. *Gastropoda* در خرداد، شهریور، مهر، آبان و آذر به ترتیب با ۷۱/۱، ۶۸/۹، ۳۵/۶ و ۵۸/۷ درصد بیشترین درصد اهمیت نسبی را دارا بودند.

مقایسه ترکیب جیره غذایی در نر و ماده

بررسی ترکیب جیره غذایی جنس نر و ماده نشان داد که حضور و فراوانی *Insecta*، *Platyhelminthes*، *Hirudinea*، *Arachnida* و *Coelelenterata* در جنس نر نسبت به جنس ماده بیشتر بود؛ هرچند، این تفاوت بر اساس فراوانی (%N) و فرکانس حضور (%F) گروه‌های غذایی بین نرها و ماده‌ها معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). شاخص حضور *Oligochaeta*، *Crustacea* و *Gastropoda* در نر در مقایسه با ماده بیشتر بود؛ در حالی که، فراوانی آنها در ماده بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری بین دو جنس مشاهده نشد ($p > 0.05$). تفاوت حضور و فراوانی *Lamellibranchiata* بین دو جنس از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). به علاوه، تفاوت حضور *Teleostei* در دو جنس از لحاظ آماری اختلاف نداشتند ($p > 0.05$). در جنس نر و ماده بر اساس شاخص فرکانس حضور و فراوانی، تفاوت آماری بین گروه‌های غذایی مشاهده نشد ($p > 0.05$). در نر، *Gastropoda* (۳۸/۰۱)، *Crustacea* (۲۷/۱)، *Insecta* (۲۱/۲) و *Teleostei* (۱۳/۱) بیشترین درصد اهمیت نسبی را دارا بودند. همچنین در ماده، *Gastropoda* (۴۸/۸)، *Crustacea* (۲۸/۵)، *Teleostei* (۱۱/۹) و *Insecta* (۱۱/۳۴) از اهمیت نسبی بیشتری برخوردار بودند. *Gammaridae* و *Lymnaeidae* دارای بیشترین فراوانی و فرکانس حضور در هر دو جنس بودند (جدول ۴).

جدول ۴: تغییرات شاخص فرکانس حضور (%F) و شاخص عددی (%N) گروه‌های غذایی مصرف شده توسط قزل‌آلای

رنگین کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲.

جنس ماده		جنس نر		ماده غذایی
%F	%N	%F	%N	
۱۰/۵۸	۱/۰۳	۱۲/۴	۰/۶۸	Oligochaeta
۸/۲۳	۰/۵۳	۹/۳	۰/۳۸	Lumbricidae
۸/۲۳	۰/۳۵	۶/۲	۰/۲۳	Lumbriculidae

۳/۵۲	۰/۰۵	۱/۵۵	۰/۰۳	Tubificidae
۲/۹۴	۰/۰۴	۰/۷۷	۰/۰۱	Naididae
۱/۷۶	۰/۰۳	۰/۷۷	۰/۰۱	Haplotaxidae
۱۵/۸۸	۰/۰۶	۱۹/۳۷	۰/۸۷	Hirudinea
۱۵/۲۹	۰/۵۶	۱۸/۶	۰/۸	Erpobdellidae
۲/۳۵	۰/۰۳	۳/۱	۰/۰۶	Piscicolidae
۴/۷	۰/۰۹	۱۰/۰۷	۰/۲۸	Platyhelminthes
۴/۷	۰/۰۹	۱۰/۰۷	۰/۲۸	Planariidae
۸۱/۷۶	۲۷/۰۱	۸۸/۳۷	۲۴/۵۷	Crustacea
۸۱/۷۶	۲۷/۰۱	۸۸/۳۷	۲۴/۵۷	Gammaridae
۶۷/۰۵	۱۵/۸۴	۷۸/۲۹	۲۸/۴۳	Insecta
۹/۴۱	۰/۱۹	۱۷/۸۲	۰/۴	Corixidae
۳/۵۲	۰/۰۵	۳/۸۷	۰/۰۶	Hydrometridae
۸/۲۳	۰/۱۲	۷/۷۵	۰/۱۶	Gerridae
۴/۱۱	۰/۰۶	۷/۷۵	۰/۱۳	Veliidae
۵/۸۸	۰/۰۹	۴/۶۵	۰/۱۱	Gyrinidae
۳/۵۲	۰/۰۴	۶/۲	۰/۰۹	Haliplidae
۱۰/۵۸	۰/۲۶	۱۷/۸۲	۰/۴۲	Dytiscidae
۳/۵۲	۰/۰۹	۱۵/۵	۰/۶۴	Helmidae
۲۱/۱۷	۱/۱۳	۳۵/۶۵	۲/۹۲	Nemouridae
۲۰/۵۸	۰/۸۱	۳۲/۵۵	۲/۶۱	Perlidae
۱۹/۴۱	۰/۸۱	۳۱/۷۸	۱/۳۴	Caenidae
۹/۴۱	۰/۳۲	۲۰/۹۳	۰/۷۴	Ephemeridae
۱۰/۵۸	۰/۳۲	۲۳/۲۵	۰/۸	Ephemerellidae
۱۵/۲۹	۰/۵	۲۲/۴۸	۰/۷۷	Ecdyonuridae
۱۲/۹۴	۰/۲۶	۲۰/۱۵	۰/۶۲	Leptophelebiidae
۱۷/۶۴	۰/۸۷	۳۴/۸۸	۱/۷۵	Baetidae
۳۴/۱۱	۴/۵۶	۴۴/۱۸	۷/۷	Chironomidae
۱۱/۱۷	۰/۱۷	۱۳/۹۵	۰/۳۱	Tipolidae
۱۷/۰۵	۱/۱۱	۲۷/۱۳	۲/۸۳	Simuliidae
۵/۸۸	۰/۰۹	۷/۷۵	۰/۱۴	Tabanidae
۵/۸۸	۰/۱۳	۶/۹۷	۰/۲	Anthomyiidae
۱۵/۲۹	۰/۴۹	۱۰/۰۷	۰/۳۸	Hydropsychidae
۷/۰۵	۰/۱۸	۸/۵۲	۰/۱	Rhyacophilidae
۴/۱۱	۰/۰۷	۳/۱	۰/۰۷	Philopotamidae
۲۸/۲۳	۲/۶۴	۱۴/۷۲	۲/۰۲	Zygoptera
۲/۹۴	۰/۰۷	۶/۹۷	۰/۲۲	Gomphidae
۱۰	۰/۲۲	۱۴/۷۲	۰/۴۶	Cordulagasteridae
۵/۲۹	۰/۱۳	۱۱/۶۲	۰/۲۹	Other insect
۱/۱۷	۰/۰۲	۱/۵۵	۰/۰۲	Arachnida
۱/۱۷	۰/۰۲	۱/۵۵	۰/۰۲	Arachnida
۶/۴۷	۰/۱۲	۲/۳۲	۰/۰۷	Lamellibranchiata
۶/۴۷	۰/۱۲	۲/۳۲	۰/۰۷	Sphaeriidae
۷۲/۹۴	۵۳/۹۶	۷۵/۹۶	۴۳/۷	Gastropoda
۷۲/۹۴	۵۳/۹۶	۷۵/۹۶	۴۳/۶۸	Lymnaeidae
.	.	۰/۷۷	۰/۰۲	Valvatidae
۰/۵۸	۰/۰۱	۰/۷۷	۰/۰۳	Coelenterata
۰/۵۸	۰/۰۱	۰/۷۷	۰/۰۳	Hydra
۳۵/۸۸	۱/۲۹	۲۹/۴۵	۱/۳۲	Teleostei
۱۴/۱۱	۰/۴۳	۱۷/۸۲	۰/۵۷	Salmonidae
۳/۵۲	۰/۰۴	۱۰/۰۷	۰/۲	Cyprinidae
۲۸/۲۳	۰/۸۱	۲۲/۴۸	۰/۵۴	Cyprinodontidae

ترکیب جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در دو جنس نر و ماده به صورت فصلی دارای تغییراتی بود. Oligochaeta، در جنس

نر فقط در بهار و در جنس ماده در بهار و زمستان در معده‌های مورد آزمایش مشاهده شد؛ هر چند که، در ماده بیشترین حضور

و فراوانی را در بهار دارا بود. Hirudinea، در نر در بهار و تابستان و در ماده به غیر از پاییز در سایر فصول مشاهده شد. Crustacea، در نر و ماده در زمستان یافت نشد؛ ولی، در جنس نر از حضور و فراوانی بیشتری برخوردار بود. Crustacea، Insecta، Gastropoda و Teleostei در تمامی فصول در هر دو جنس مشاهده شد. Insecta و Crustacea بیشترین حضور و فراوانی را در نر دارا بودند؛ اما، Gastropoda بیشترین حضور را در نر و بیشترین فراوانی را در ماده دارا بود. این در حالی است که بیشترین حضور و فراوانی Teleostei در معده نرها و ماده‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). (جدول ۵ و ۶)

جدول ۵: تغییرات فصلی ترکیب جیره غذایی نر قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲

ماده غذایی	بهار		تابستان		پاییز		زمستان	
	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F
Oligochaeta	۲/۱۱	۴۴/۴۴
Hirudinea	۲/۰۲	۴۷/۲۲	۰/۸۱	۲۲/۵۸
Platyhelminthes	۰/۵۵	۱۹/۴۴	۰/۱۴	۵/۷۱	۰/۱۹	۱۰/۲۵	.	.
Crustacea	۲۳/۴۳	۹۱/۶۶	۲۹/۱۸	۹۱/۴۲	۱۷/۹۱	۸۹/۷۴	۴۷/۱۶	۷۳/۶۸
Insecta	۳۷/۹۴	۸۸/۸۸	۱۹/۳۹	۸۲/۸۵	۲۸/۲	۶۹/۲۳	۱۹/۲۵	۶۸/۴۲
Arachnida	۰/۰۲	۲/۷۷	.	.	۰/۰۲	۲/۵۶	.	.
Lamellibranchiata	۰/۰۵	۲/۷۷	.	.	۰/۰۵	۲/۵۶	۰/۵۹	۵/۲۶
Gastropoda	۳۳/۰۶	۶۶/۶۶	۴۸/۱۱	۸۵/۷۱	۵۲/۴۲	۸۴/۶۱	۳۱/۹۴	۵۷/۸۹
Coelenterata	۰/۰۸	۲/۷۷
Teleostei	۰/۶۷	۲۵	۲/۳۴	۳۷/۱۴	۱/۱۸	۳۳/۳۳	۱/۰۴	۱۵/۷۸

جدول ۶: تغییرات فصلی ترکیب جیره غذایی ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲

ماده غذایی	بهار		تابستان		پاییز		زمستان	
	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F
Oligochaeta	۳/۵۷	۴۳/۵۸	۰/۱۲	۱/۸۵
Hirudinea	۱/۵۳	۴۳/۵۸	۰/۷۱	۲۲/۸۵	.	.	۰/۰۹	۳/۷
Platyhelminthes	۰/۱۶	۱۰/۲۵	۰/۰۶	۲/۸۵	۰/۱۱	۷/۱۴	.	.
Crustacea	۱۶/۳۵	۷۱/۷۹	۲۵/۷۶	۸۵/۷۱	۲۴/۶	۸۳/۳۳	۴۵/۶۷	۸۵/۱۸
Insecta	۲۶/۴	۷۴/۳۵	۸/۱۴	۶۲/۸۵	۹/۲۷	۵۹/۵۲	۱۸/۶۵	۷۰/۳۷
Arachnida	۰/۰۴	۲/۵۶	.	.	۰/۰۲	۲/۳۸	.	.
Lamellibranchiata	.	.	۰/۰۶	۲/۸۵	۰/۱۱	۱۱/۹	۰/۳۷	۹/۲۵
Gastropoda	۵۱/۲۷	۵۸/۹۷	۶۳/۷	۷۷/۱۴	۶۴/۲	۸۰/۹۵	۳۳/۶۴	۷۴/۰۷
Coelenterata	۰/۰۲	۲/۵۶
Teleostei	۰/۶۱	۳۰/۷۶	۱/۵۴	۴۰	۱/۶۶	۴۰/۴۷	۱/۴۳	۳۳/۳۳

مقایسه عادات غذایی گروه‌های مختلف طولی

بررسی عادات غذایی گروه‌های مختلف طولی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که ماهیان با اندازه بزرگتر از ۳۵/۵ سانتی‌متر عمدتاً از Gastropoda تغذیه کردند؛ در صورتی که، Crustacea و Teleostei با فراوانی کمتر در جیره غذایی این دسته قرار داشتند. Oligochaeta، Hirudinea، Platyhelminthes، Crustacea، Insecta، Gastropoda و Teleostei در معده‌های تمامی گروه‌های طولی مشاهده شدند. بر اساس شاخص حضور، Oligochaeta بیشترین حضور را در گروه طولی $< 20/6$ و سپس در گروه

طولی ۲۵/۶-۳۰/۵ سانتی‌متر و کمترین حضور را در گروه طولی ۳۰/۶-۳۵/۵ داشت. بیشترین حضور *Hirudinea* در گروه طولی ۳۰/۲۵-۵/۶ و کمترین آن در گروه طولی ۳۵/۶-۴۰/۵ سانتی‌متر بود. برای *Platyhelminthes* بیشترین حضور، در گروه طولی ۲۵/۲۰-۵/۶ و کمترین آن در گروه ۳۵/۵-۳۰/۶ سانتی‌متر بود. بیشترین حضور *Crustacea* در گروه طولی < ۲۰/۶ سانتی‌متر و کمترین آن در گروه ۳۰/۵-۲۵/۶ بود. حضور این گروه غذایی در بین ماهیان با گروه‌های طولی متفاوت، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). بیشترین حضور *Insecta* در گروه طولی < ۲۰/۶ و کمترین آن در گروه ۳۵/۵-۳۰/۶ سانتی‌متر بود و از لحاظ آماری در بین گروه‌های طولی متفاوت، تفاوت معنی‌دار بود ($p < 0.05$). *Arachnida* در ماهیان کوچک‌تر از ۲۵/۶ سانتی‌متر مشاهده شد و بیشترین حضور را در گروه طولی ۲۵/۵-۲۰/۶ دارا بود. *Lamellibranchiata* در ماهیان با گروه طولی ۴۰/۳۵-۵/۶ سانتی‌متر، که بزرگ‌ترین گروه طولی بود، حضور نداشت و بیشترین آن در گروه ۲۵/۵-۲۰/۶ سانتی‌متر بود. حضور *Gastropoda* در گروه‌های طولی متفاوت، از لحاظ آماری تفاوت نداشت ($p > 0.05$). *Coelenterata* در دو گروه طولی < ۲۰/۶ و ۳۰/۲۵-۵/۶ سانتی‌متر حضور داشت. *Teleostei* در تمام گروه‌های طولی حضور داشت و در معده ماهیان با طول بیشتر از ۳۰/۶ سانتی‌متر حضور آن پررنگ‌تر بود؛ بیشترین حضور آن در ماهیان با اندازه ۴۰/۵-۳۵/۶ سانتی‌متری بود ($p < 0.05$).

جدول ۷: تغییرات در شاخص فرکانس حضور (%F) و شاخص عددی (%N) هر ماده غذایی مصرف شده توسط گروه‌های مختلف طولی قزل‌آلای رنگین‌کمان رودخانه بهشت‌آباد چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۲.

ماده غذایی	۲۰/۶ <		۲۰/۲۵-۵/۶		۲۵/۳۰-۶/۵		۳۰/۳۵-۶/۵		۳۵/۴۰-۶/۵	
	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N	%F	%N
Oligochaeta	۱/۳۹	۲۱/۰۵	۰/۸۵	۷/۱۴	۱/۳۱	۱۰/۷۱	۰/۱	۵/۸۸	۱۰/۷۴	۶/۲۵
Lumbricidae	۰/۶۲	۱۳/۶۸	۰/۵۲	۶/۳۴	۰/۶۵	۹/۵۲	۰/۰۷	۵/۸۸	۰/۲۷	۶/۲۵
Lumbriculidae	۰/۵۹	۱۲/۶۳	۰/۲۸	۶/۳۴	۰/۳۸	۸/۳۳	.	.	۰/۴۶	۶/۲۵
Tubificidae	۰/۱۳	۴/۲۱	۰/۰۲	۲/۳۸	۰/۰۸	۴/۷۶
Naididae	۰/۰۱	۱/۰۵	۰/۰۲	۲/۳۸	۰/۰۷	۲/۳۸
Haplotaxidae	۰/۰۲	۲/۱	.	.	۰/۱	۳/۵۷	۰/۰۲	۲/۹۴	.	.
Hirudinea	۰/۶۲	۱۵/۷۸	۰/۷۴	۱۷/۴۶	۰/۸۵	۱۷/۸۵	۰/۳۵	۱۷/۶۴	۰/۵۵	۶/۲۵
Erpobdellidae	۰/۵۹	۱۴/۷۳	۰/۶۶	۱۶/۶۶	۰/۷۴	۱۶/۶۶	۰/۳۵	۱۷/۶۴	۰/۵۵	۶/۲۵
Piscicolidae	۰/۰۲	۱/۰۵	۰/۰۷	۳/۱۷	۰/۱	۴/۷۶
Platyhelminthes	۰/۰۸	۵/۲۶	۰/۲۳	۱۰/۳۱	۰/۲۱	۴/۷۶	۰/۰۷	۲/۹۴	۰/۱۸	۶/۲۵
Planariidae	۰/۰۸	۵/۲۶	۰/۲۳	۱۰/۳۱	۰/۲۱	۴/۷۶	۰/۰۷	۲/۹۴	۰/۱۸	۶/۲۵
Crustacea	۲۴/۲۷	۹۴/۷۳	۲۸/۵۳	۸۵/۷۱	۲۷/۱۲	۷۵	۱۹/۶۷	۹۱/۱۷	۴۳/۲۹	۸۷/۵
Gammaridae	۲۴/۲۷	۹۴/۷۳	۲۸/۵۳	۸۵/۷۱	۲۷/۱۲	۷۵	۱۹/۶۷	۹۱/۱۷	۴۳/۲۹	۸۷/۵
Insecta	۳۷/۵۲	۸۶/۳۱	۱۸/۴۴	۷۲/۲۲	۱۹/۷۶	۶۵/۴۷	۹/۹۳	۵۸/۸۲	۱۲/۶۶	۷۵
Corixidae	۰/۲۸	۱۲/۶۳	۰/۳۱	۱۳/۴۹	۰/۳۳	۱۴/۲۸	۰/۰۷	۲/۹۴	.	.
Hydrometridae	۰/۱۷	۱۰/۵۲	۰/۳۶	۲/۳۸	.	.	۰/۰۵	۲/۹۴	.	.
Gerridae	۰/۱۷	۹/۴۷	۰/۱۳	۷/۹۳	۰/۲۱	۸/۳۳
Veliidae	۰/۱۷	۱۰/۵۲	۰/۰۳	۳/۱۷	۰/۱۲	۴/۷۶
Gyrinidae	۰/۰۹	۷/۳۶	۰/۰۳	۳/۱۷	۰/۱۵	۴/۷۶	۰/۱۲	۵/۸۸	۰/۳۷	۱۲/۵
Halipidae	۰/۱۱	۸/۴۲	۰/۰۳	۲/۳۸	۰/۰۸	۴/۷۶
Dytiscidae	۰/۶۸	۲۱/۰۵	۰/۴۵	۱۵/۸۷	۰/۳	۹/۵۲	.	.	۰/۴۶	۱۲/۵
Helmidae	۰/۴۷	۱۶/۸۴	۰/۲۴	۴/۷۶	۰/۱۴	۴/۷۶	۰/۰۵	۲/۹۴	۱/۳	۱۲/۵
Nemouridae	۴/۰۳	۴۲/۱	۱/۴۹	۲۷/۷۷	۱/۲۳	۲۰/۲۳	۱/۵	۳۲/۳۵	۰/۵۵	۱۲/۵
Perlidae	۳/۲۵	۳۷/۸۹	۰/۹	۲۵/۳۹	۱/۰۴	۱۹/۰۴	۱/۲۷	۲۶/۴۷	۰/۴۶	۶/۲۵
Caenidae	۱/۶۳	۳۸/۹۴	۱/۰۸	۳۰/۱۵	۱/۱۵	۱۶/۶۶	۰/۲۷	۵/۸۸	.	.
Ephemeridae	۰/۹۷	۲۶/۳۱	۰/۳۲	۱۳/۴۹	۰/۵۴	۹/۵۲	۰/۳	۸/۸۲	.	.
Ephemerellidae	۱/۰۴	۳۰/۵۲	۰/۵	۱۸/۲۵	۰/۲۴	۹/۵۲	۰/۴	۱۱/۷۶	.	.
Ecdyonuridae	۰/۹۹	۲۴/۲۱	۰/۵۸	۱۹/۰۴	۰/۵۱	۱۰/۷۱	۰/۴	۲۰/۵۸	.	.
Leptophelebiidae	۰/۹۹	۲۴/۲۱	۰/۳۷	۱۷/۴۶	۰/۲۳	۱۰/۷۱	۰/۰۷	۵/۸۸	۰/۱۸	۶/۲۵

.	.	۱۷/۶۴	۰/۵	۱۷/۸۵	۱/۳۹	۲۶/۹۸	۱/۲۹	۴۳/۱۵	۱/۹۷	Baetidae
۱۸/۷۵	۱/۷۶	۲۳/۵۲	۱/۶۵	۲۸/۵۷	۴/۱۷	۳۶/۵	۴/۸۴	۷۲/۶۳	۱۳/۸۸	Chironomidae
۶/۲۵	۰/۲۷	۱۱/۷۶	۰/۱۷	۱۴/۲۸	۰/۲۴	۱۰/۳۱	۰/۲۱	۱۲/۶۳	۰/۳۶	Tipolidae
.	.	۲۳/۵۲	۱/۲۲	۱۵/۴۷	۱/۶۶	۱۸/۲۵	۱/۳۹	۴۱/۰۵	۳/۷	Simuliidae
۱۸/۷۵	۰/۶۵	۲/۹۴	۰/۰۵	۷/۱۴	۰/۱۲	۵/۵۵	۰/۰۹	۷/۳۶	۰/۱۱	Tabanidae
.	.	۲۰/۵۸	۰/۳	۵/۹۵	۰/۱۲	۳/۱۷	۰/۰۸	۶/۳۱	۰/۲۹	Anthomyiidae
۳۷/۵	۲/۷	۸/۸۲	۰/۳	۱۳/۰۹	۰/۶	۷/۹۳	۰/۱۷	۱۳/۶۸	۰/۳۷	Hydropsychidae
۱۲/۵	۰/۵۵	.	.	۴/۷۶	۰/۱	۸/۷۳	۰/۱۹	۱۲/۶۳	۰/۲۲	Rhyacophilidae
.	.	۵/۸۸	۰/۰۵	۷/۱۴	۰/۱۷	۰/۷۹	۰/۰۲	۵/۲۶	۰/۱۶	Philopotamidae
۱۲/۵	۱/۳۹	۵/۸۸	۰/۴۵	۳۲/۱۴	۴/۳۹	۲۷/۷۷	۳	۷/۳۶	۰/۵۶	Zygoptera
۱۲/۵	۰/۶۵	۵/۸۸	۰/۳	۳/۵۷	۰/۱	۳/۹۶	۰/۰۴	۶/۳۱	۰/۱۱	Gomphidae
۱۲/۵	۰/۷۴	۸/۵۲	۰/۳	۸/۳۳	۰/۲۳	۱۱/۹	۰/۲۹	۱۴/۷۳	۰/۳۳	Cordulagasteridae
۱۲/۵	۰/۵۵	۵/۸۸	۰/۱	۲/۳۸	۰/۰۷	۶/۳۴	۰/۲	۱۴/۷۳	۰/۲۷	Other insect
.	۱/۵۸	۰/۰۱	۲/۱	۰/۰۳	Arachnida
.	۱/۵۸	۰/۰۱	۲/۱	۰/۰۳	Arachnida
.	.	۲/۹۴	۰/۰۵	۱۰/۷۱	۰/۳	۳/۱۷	۰/۰۸	۱/۰۵	۰/۰۲	Lamellibranchiata
.	.	۲/۹۴	۰/۰۵	۱۰/۷۱	۰/۳	۳/۱۷	۰/۰۸	۱/۰۵	۰/۰۲	Sphaeriidae
۶۸/۷۵	۳۳/۲۴	۷۹/۴۱	۶۷/۶	۶۹/۰۴	۴۹/۳۷	۷۶/۹۸	۵۰/۲۴	۷۵/۷۸	۳۵/۹۳	Gastropoda
۶۸/۷۵	۳۳/۲۴	۷۹/۴۱	۶۷/۶	۶۹/۰۴	۴۹/۳۷	۷۶/۹۸	۵۰/۲۳	۷۵/۷۸	۳۵/۹۳	Lymnaeidae
.	۰/۷۹	۰/۰۱	.	.	Valvatidae
.	.	.	.	۱/۱۹	۰/۰۱	.	.	۲/۱	۰/۰۷	Coelenterata
.	.	.	.	۱/۱۹	۰/۰۱	.	.	۲/۱	۰/۰۷	Hydra
۸۱/۲۵	۹/۳۱	۶۷/۶۴	۲/۲	۳۲/۱۴	۱/۰۴	۳۰/۹۵	۰/۸۴	۲/۱	۰/۰۲	Teleostei
۶۸/۷۵	۴/۵۶	۵۵/۸۸	۱/۳	۹/۵۲	۰/۲۱	۸/۷۳	۰/۱۲	.	.	Salmonidae
۴۳/۷۵	۱/۲۱	۲۳/۵۲	۰/۳	.	.	۳/۹۶	۰/۰۴	.	.	Cyprinidae
۶۲/۵	۳/۵۳	۳۸/۲۳	۰/۶	۲۸/۵۷	۰/۸۳	۲۴/۶	۰/۶۶	۲/۱	۰/۰۲	Cyprinodontidae

از لحاظ فراوانی، Oligochaeta در ماهیان با اندازه $< 20/6$ سانتی متر بیشترین فراوانی را داشت. بیشترین فراوانی

Hirudinea در ماهیان با گروه طولی $25/6-30/5$ سانتی متر مشاهده شد. Platyhelminthes در ماهیان با گروه طولی $20/6-35/5$

بیشترین فراوانی را داشت. Crustacea بیشترین فراوانی را در ماهیان گروه طولی $35/6-40/5$ سانتی متر داشت. Insecta بیشترین

فراوانی را در ماهیان با اندازه $< 20/6$ سانتی متر داشت. Gastropoda بیشترین فراوانی را در گروه طولی $30/6-35/5$ سانتی متر

داشت. Teleostei در ماهیان با اندازه طولی $35/6-40/5$ سانتی متر بیشترین فراوانی را داشت ($p < 0/05$). در بقیه گروه‌های غذایی

تفاوت آماری از لحاظ مصرف گروه‌های غذایی بین نمونه‌ها با طول‌های متفاوت مشاهده نشد ($p > 0/05$).

تمامی ماهیان تمایل به تغذیه از Gammaridae داشتند؛ از این رو، این گروه غذایی بیشترین حضور را در بین ذرات

غذایی داشت (جدول ۷). بعد از Gammaridae، در ماهیان با طول کمتر از $25/5$ سانتی متر به ترتیب Lymnaeidae و

Chironomidae بیشترین حضور را داشتند. در ماهیان $25/6-30/5$ سانتی متری، بیشترین حضور مربوط به Lymnaeidae و

Zygoptera بود. در ماهیان با گروه طولی $30/6-35/5$ سانتی متر، بیشترین حضور را Lymnaeidae، ماهی قزل آلا و آفانیوس

داشتند. در ماهیان با گروه طولی $35/6-40/5$ سانتی متر، بیشترین حضور را Lymnaeidae و قزل آلا با شاخص برابر و سپس

ماهیان خانواده Cyprinidae و Cyprinodontidae داشتند؛ که نشان می‌دهد، اندازه طعمه‌های مورد استفاده با افزایش اندازه

ماهی قزل آلا رنگین کمان افزایش یافته است.

با توجه به مقدار میانگین به دست آمده از طول نسبی روده و همچنین مواد غذایی موجود در معده، می‌توان با قاطعیت

این گونه را یک گونه گوشتخوار دانست (Biswas, 1993). همچنین، به نظر می‌رسد که این ماهی یک گونه یوری‌فاگوس باشد زیرا از طیف وسیعی از مواد غذایی تغذیه می‌کند. این عادت غذایی در تمامی مطالعات مربوط به آزادماهیان به صراحت عنوان شده است (Shafaeepour & Gorji, 2004; Abdoli & Mirdar, 2013). تغییرات فصلی در جیره غذایی یک گونه، مرتبط با تغییر در زیستگاه یا فراوانی فصلی اقلام غذایی است. ممکن است دما با دیگر عوامل غیر زیستی ترکیب شده و منجر به تغییر در قابلیت دسترسی به گروه‌های غذایی مختلف در طول سال گردد (Worobec, 1984; Soofiani *et al.*, 2006). همچنین، برخی محققین تفاوت‌های فصلی در فراوانی و حضور گروه‌های غذایی در معده نمونه‌های مورد بررسی را مرتبط با تاریخچه زندگی و اکولوژی طعمه‌ها می‌دانند؛ مثلاً، چنانچه پدیده تفریح آنها همزمان با نمونه‌برداری‌های مربوط به چنین مطالعاتی باشد، تعداد کمتری از لاروهای آنها به عنوان طعمه وجود خواهند داشت (Bock *et al.*, 2010; Ghanbarzadeh *et al.*, 2014). همچنین، نوسانات فصلی در تراکم گروه‌های غذایی می‌تواند ناشی از نوسانات تولیدمثلی در آنها، تحت تأثیر شرایط محیطی، دسترسی به غذا و کیفیت آن، باشد (Bochert, 1996; Keivany *et al.*, 2014; Keivany & Daneshvar, 2016).

در این مطالعه حضور و فراوانی بعضی از گروه‌های غذایی مصرف شده تحت تأثیر ماه و فصل بودند: Oligochaeta فقط در بهار و زمستان؛ Arachnidae در بهار و پاییز؛ Coelelenterata فقط در فصل بهار و Platyhelminthes به غیر از زمستان، در تمام فصل‌ها در معده‌های مورد آزمایش مشاهده شد. اما گروه‌های غذایی دیگر در تمام فصول سال در ترکیب جیره غذایی ماهی حضور داشتند. در مطالعه حاضر، بر اساس تغییرات فصلی، بیشترین حضور و فراوانی سالیانه به ترتیب مربوط به Crustacea در فصل تابستان و Gasteropoda در پاییز بود. همچنین، Insecta بیشترین حضور و فراوانی خود را در بهار داشت؛ در حالی که، کمترین حضور را در پاییز و کمترین فراوانی را در زمستان دارا بود. کم بودن فراوانی و حضور در فصول سرد سال را می‌توان به علت بلوغ و خارج شدن حشرات از محیط آب دانست (Salavatian *et al.*, 2011). در مطالعه حاضر، گرچه بیشترین حضور و فراوانی حشرات در فصل بهار بود، اما در بقیه فصول نیز درصد بالایی را به خود اختصاص دادند. بیشترین حضور و فراوانی Teleostei در تابستان و کمترین میزان آن در بهار بود. حضور و فراوانی زیاد در تابستان را می‌توان به علت کم بودن دبی آب و شکار شدن راحت‌تر آنها دانست. بیشترین اهمیت نسبی گروه‌های غذایی در بهار مربوط به Crustacea، Insecta و Gasteropoda؛ در تابستان و پاییز Gasteropoda، Crustacea و Teleostei و در زمستان Crustacea، Gasteropoda و Insecta بودند.

این نتایج بیانگر اهمیت این موجودات در سفره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در رودخانه بهشت‌آباد بود. اگرچه Teleostei در شاخص فراوانی، مقدار پایینی را به خود اختصاص داد اما به علت وزن قابل توجه آن از اهمیت بالایی در جیره غذایی برخوردار بود. در مطالعه Rikardsen & Sandring (2006)، در ماه ژوئن Insecta و Crustacea بیشترین حضور و وزن را در معده‌های ماهیان Post-smolt داشتند. Insecta در ۷۵٪ معده ماهیان بالغ، در جولای و اوت مشاهده شد. Shafaeepour & Gorji (2004)، Ephemeroptera را فراوان‌ترین ذره در کل ماه‌های نمونه برداری دانستند و کمبود آن در برخی از ماه‌های سال، مخصوصاً اواخر

بهار و تابستان، را به خاطر بلوغ و خروج حشرات از آب و همچنین تمایل غذایی متفاوت قزل‌آلای رنگین‌کمان در ماه‌های مختلف بیان کردند.

بررسی عادات غذایی گروه‌های مختلف طولی قزل‌آلای رنگین‌کمان در رودخانه بهشت‌آباد نشان داد ماهیان با اندازه بزرگ (بزرگ‌تر از ۳۵/۵ سانتی‌متر) عمدتاً از Gastropoda تغذیه کردند و Teleostei و Crustacea نیز با فراوانی کمتر در جیره غذایی این دسته قرار داشتند؛ ولی، تمامی ماهیان تمایل به تغذیه از Gammaridae را داشتند. Hirudinea, Oligochaeta, Crustacea, Platyhelminthes, Insecta, و Gastropoda در معده‌های تمامی گروه‌های طولی مشاهده شدند. لازم به ذکر است که گروه Teleostei در تمامی گروه‌های طولی مورد بررسی مشاهده شد ولی در گروه طولی کمتر از ۲۰/۶ سانتی‌متر فقط در معده دو قطعه ماهی مشاهده شد که اندازه طولی آنها با اندازه بیان شده در مطالعه ذکر شده مطابقت داشت. بعد از Gammaridae، در ماهیان با طول کمتر از ۲۵/۵ سانتی‌متر به ترتیب Lymnaeidae و Chironomidae بیشترین حضور را داشتند. در ماهیان ۲۵/۶-۳۰/۵ سانتی‌متر بیشترین حضور مربوط به Lymnaeidae و Zygoptera بود. در ماهیان با گروه طولی ۳۰/۶-۳۵/۵ سانتی‌متر، بیشترین حضور را Lymnaeidae، قزل‌آلا و ماهیان Cyprinodontidae داشتند. در ماهیان با گروه طولی ۳۵/۶-۴۰/۵ سانتی‌متر، بیشترین حضور را Lymnaeidae و قزل‌آلا با شاخص برابر و سپس ماهیان Cyprinodontidae و Cyprinidae داشتند؛ که نشان می‌دهد، اندازه طعمه‌های مورد استفاده با افزایش اندازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌یابد. همچنین، اختلافات موجود بین مطالعات احتمالاً مربوط به تفاوت در دامنه گروه‌های طولی، اختلاف در ساعات و روز نمونه‌برداری، تفاوت در اقلیم و ابزار نمونه‌برداری است. اگر تعداد زیادی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک فضای محدود وجود داشته باشد رفتار هم‌جنس خواری خواهند داشت (Kido *et al.*, 1999). در قزل‌آلای بزرگ مصرف بی‌مهرگان خشکی بالاتر است؛ که نشان می‌دهد، بطور عمده از بی‌مهرگان شناور تغذیه می‌کنند (Oscoz *et al.*, 2005). تفاوت در نوع رژیم غذایی بین کلاس‌های سنی می‌تواند رقابت غذایی را کاهش دهد و تا حدودی به جداسازی زیستگاه کمک کند. در هر دو جنس نر و ماده، Gastropoda, Crustacea, Insecta و Teleostei بیشترین درصد اهمیت نسبی را دارا بودند. بنابراین، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، یک ماهی پرخور گوشت‌خوار با دامنه وسیعی از جانوران غذایی است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای مهندس مسعود صیامی و خانم مهندس سمانه‌السادات مرتضوی جهت همکاری در نمونه‌برداری تشکر و قدردانی می‌نماییم. از آقای دکتر سعید اسدالله، مسئول آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، نیز به خاطر کمک در کارهای آزمایشگاهی، سپاسگزاری می‌شود. هزینه‌های مالی اجرای این پژوهش توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

منابع

- Abdoli, A. and Mirdar, J. (2013) Study of food habits and preference of the exotic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) in Madarsoo stream, Golestan National Park. *Journal of Fisheries*, 66(2): 173-184.
- Angradi, T.R. and Griffith, J.S. (1990) Diel feeding chronology and diet selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Henry's Fork of the Snake River, Idaho. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 47(1): 199-209.
- Arismendi, I., Soto, D., Penaluna, B., Jara, C., Leal, C. and León-Muñoz, J.O.R.G.E. (2009) Aquaculture, non-native salmonid invasions and associated declines of native fishes in Northern Patagonian lakes. *Freshwater Biology*, 54(5): 1135-1147.
- Biswas, S.P. (1993) *Manual of methods in fish biology*, South Asian Publishers. 157p.
- Bochert, R. (1996) Variation in reproduction status, larval occurrence and recruitment in an estuarine population of *Marenzelleria viridis*. *Ophelia*, 45(2): 127-142.
- Bock, L.R., Goforth, R.R., Stefanavage, T. and SepuIveda, M. (2010) Diet of shovelnose sturgeon in the Middle Wabash River, Indiana (USA). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 309-315.
- Casadevall, M., Matallanas, J. and Bartoli, T. (1994) Feeding habits of *Ophichthus rufusn* (Anguilliformes, Ophichthidae) in the western Mediterranean. *Cybiurn*, 18: 431-440.
- Cocan, D., Zăhan, M., Mireșan, V., Constantinescu, R., Răducu, C., Neghela, B. and Sărmaș, I. (2010) Studies on some productive and reproductive performance in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*) at four years of age, from Fiad-Telcișor Salmonids complex, Bistrița-Năsăud County. *Scientific Papers on Animal Sciences and Biotechnology*, 43(2): 19-23.
- Desai, V.R. (1970) Studies on the fishery and biology of *Tor tor* (Hamilton) from river Narmada. *Journal of Inland Fisheries Society of India*, 2: 101-112.
- Elliott, J.M., Humpesch, U.H. and Macan, T.T. (1988) *Larvae of the British Ephemeroptera: a key with ecological notes*. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 49. 135 Pp.
- Erguden, S.A., Goksu, M.Z.L. and Çelikkol, Ç. (2010) Spring feeding habits by escaped cage rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in the Seyhan Dam Lake (Adana/Turkey). *Journal of Applied Biological Sciences*, 4(3): 7-10.
- Fochetti, R., Argano, R. and Tierno De Figueroa, J.M. (2008) Feeding ecology of various age-classes of brown trout in River Nera, Central Italy. *Belgian Journal of Zoology*, 138(2): 128-131.
- Ghanbarzadeh, M., Soofiani, N.M., Keivany, Y. and Motlagh, S.A.T. (2014) Feeding habits of the king soldier bream, *Argyrops spinifer* (Perciformes: Sparidae), in the northern Persian Gulf. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(3): 485-489.
- Horn, M.H. and Ojeda, F.P. (1999) Herbivory. Pages 197-222 in Horn, M.H., Martin, K.L.M., Chotkowski, M.A., eds. *Intertidal fishes: life in two worlds*: Academic Press, San Diego.
- Hyslop, E.J. (1980) Stomach content analysis- a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*,

17: 411-429.

- Kara, C. and Alp, A. (2005) Feeding habits and diet composition of brown trout (*Salmo trutta*) in the upper streams of River Ceyhan and River Euphrates in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(2): 417-428.
- Keivany, Y., Abaszadeh, A. and Soofiani, N.M. (2014) A study on some growth parameters and feeding characteristics of the Lizardfish, *Saurida tumbil*, from the Iranian Persian Gulf coast. *Journal of Marine Science and Technology*, 13(3): 51-60.
- Keivany, Y. and Daneshvar, E. (2016) Contribution to the knowledge of the feeding and growth biology of the Iranian cichlid, *Iranocichla hormuzensis*. *Zoology and Ecology*, 26 (2): 104-109.
- Keivany, Y., Nasri, M., Abbasi, K. and Abdoli, A. (2016) Atlas of inland water fishes of Iran. Iran Department of Environment Press. 218 p.
- Kido, M.H., Heacock, D.E. and Asquith, A. (1999) Alien rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Salmoniformes: Salmonidae) diet in Hawaiian streams. *Pacific Science*, 53(3): 242-251.
- Kitano, S. (2004) Ecological impacts of rainbow, brown and brook trout in Japanese inland waters. *Global Environmental Research*, 8(1): 41-50.
- Molineri, C. (2008) Impact of rainbow trout on aquatic invertebrate communities in subtropical mountain streams of northwest Argentina. *Ecology Australia*, 18(1): 101-117.
- Oscoz, J., Leunda, P.M., Campos, F., Escala, M.C., García-Fresca, C. and Miranda, R. (2005) Spring diet composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), in the Urederra River (Spain). *International Journal of Limnology*, 41(1): 27-34.
- Pescador, M.L., Andrew, K.R. and Barton, A.R. (2000) A guide to the stoneflies (Plecoptera) of Florida. Department of Environmental Protection, Division of Water Resource Management Tallahassee Pp. 94.
- Pescador, M.L., Andrew, K.R. and Steven, C.H. (2004) Identification manual for the caddisfly (Trichoptera) larvae of Florida. Department of Environmental Protection, Division of Water Resource Management Tallahassee Pp. 136.
- Pescador, M.L. and Richard, B.A. (2004) Guide to the mayfly (Ephemeroptera) nymphes of Florida. Department of Environmental Protection, Division of Water Resource Management Tallahassee Pp. 115.
- Rikardsen, A.H. and Sandring, S. (2006) Diet and size-selective feeding by escaped hatchery rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Marine Sciences*, 63(3): 460-465.
- Salavatian, M., Gholiev, Z., Aliev, A. and Abassi, K. (2011) Feeding behavior of brown trout, *Salmo trutta fario*, during spawning season in four rivers of Lar National Park, Iran. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 9(2): 223-233.
- Shafaeepour, A. and Gorgi, A. (2004) Feeding regimes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Khorramnaz and Beshar rivers of Yasuj. *Journal of Marine Science and Technology*, 3(4): 37-44.
- Simon, K.S. and Townsend, C.R. (2003) Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organisation, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater Biology*, 48(6): 982-994.

- Soofiani, N.M., Keivany, Y. and Shoostari, A.M. (2006) Contribution to the biology of the lizardfish, *Saurida tumbil* (Teleostei: Aulopiformes), from the Persian Gulf. *Zoology in the Middle East*, 38: 49-56.
- Worobec, M.N. (1984) Field estimates of the daily ration of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) in the southern New England salt marsh. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 77: 183-196.
- Yanez-Arancibia, A., Curiel-Gomez, J. and Yafiez, V. (1976) Prospeccion biologicay ecologica del bagre marino *Galeichthys caerulescens* (Gunther) en el sistema lagunar costero de Guerrero, Mexico (Pisces: Ariidae). *Centro Cienc del Mar y Limnol Univ Nal Autón México*, 3(1): 125-180.

Feeding habits of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Beheshtabad River of Chaharmahal & Bakhtiari Province

M. Aalipour¹, Y. Keivany^{2*}, E. Ebrahimi³

Received: 2017.5.29

Accepted: 2017.12.17

Abstract

Some nutritional characteristics of rainbow were examined in 355 specimens collected from Beheshtabad River. Total length of females and males ranged from 17.1-40.2 cm ($26.05 \pm 4.54SD$) and from 15.5-40.3 cm (24.9 ± 5.93), respectively. Empty stomachs were about 39 (11%) of the total stomachs examined, and were not significantly different ($P > 0.05$) throughout the year. The diet was composed of 45 different prey taxa, belonging to 10 main classes. The most important prey items were Annelida, Platyhelminthes, Arthropoda, Mollusca, Coelenterata and Teleostei. Crustacea, Insecta, Gastropoda and Teleostei were the most important prey items throughout the year. Gender did not appear to have any significant effects on the diet composition and on the main prey items consumed by the fish. Fish size showed significant effects on diet composition and the average size of prey increased with increasing fish size. In general, the rainbow trout could be considered a carnivorous fish, feeding on a wide range of prey items.

Keyword: Diet, Feeding, Salmonidae

1-MSc Graduate, Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran.

2-Associate Professor, Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan

*(Corresponding Author: Keivany@cc.iut.ac.ir)

3-Associate Professor, Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

(*Corresponding Author: Keivany@cc.iut.ac.ir)

بهینه سازی رشد و تولید آنزیم کاتالاز در باکتری *Kocuria sp.* ASB 107 در محیط

کشت های اقتصادی

عزت عسگرانی^{۱*}، الهام گودینی^۲، جمشید فولادی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰

چکیده

کاتالاز آنزیمی با توانایی تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن است. کاتالاز در صنایع مختلف به خصوص صنعت نساجی مورد توجه قرار گرفته است. در صنعت نساجی H_2O_2 به عنوان سفیدکننده استفاده می شود. این فرآیند در pH بالا انجام می شود. بنابراین کاتالاز قلیایی جهت احیای H_2O_2 بسیار مناسب است. باکتری *Kocuria sp.* ASB 107 دارای مقدار زیادی کاتالاز قلیایی است. در این مطالعه برای دستیابی به بیشترین میزان رشد باکتری و تولید کاتالاز از محیط کشت های ارزان قیمت نظیر ملاس چغندر قند، نیشکر و آب پنیر استفاده شد. منحنی رشد رسم شد و در اواخر فاز لگاریتمی، محصول تخمیر سانتریفیوژ و فعالیت آنزیمی با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر بررسی شد. برای تعیین میزان رشد باکتری از وزن بیوماس خشک استفاده شد. بالاترین فعالیت آنزیم ($2136/25 U/mL$) و رشد باکتریایی ($5/19 g/L$) با استفاده از ملاس چغندر قند (۱ درصد) و عصاره مخمر ($2/5$ درصد) حاصل شد. همچنین با ۴ درصد آب پنیر به عنوان منبع کربن فعالیت کاتالازی و رشد به ترتیب به میزان $3032/5 U/mL$ و $6/16 g/L$ مشاهده شد. نتایج پژوهش نشان داد ملاس چغندر قند و نیشکر و آب پنیر سوبستراهای ارزان و مناسبی جهت تولید آنزیم و رشد سلول هستند و منبع نیتروژن غیرآلی اوره مناسب نیست.

واژه های کلیدی: آب پنیر، بهینه سازی، کاتالاز، ملاس، *Kocuria sp.* ASB 107

مقدمه

کاتالاز آنزیمی است که قادر است H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل کند (Soung et al., 2000). در پروسه های صنعتی، باکتری ها در معرض تنش های اکسیداتیو قرار می گیرند، بنابراین علاوه بر مکانیسم های ترمیم، توانایی تولید آنزیم های آنتی اکسیداتیو نظیر کاتالاز یک فاکتور مهم مقاومت در آن ها محسوب می شود (Rochat et al., 2006). امروزه آنزیم کاتالاز به دلیل

۱-دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

* نویسنده مسئول: (asgarani@alzahra.ac.ir)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

کاربردهای بالقوه‌اش در صنایع مختلف به خصوص صنعت نساجی مورد توجه قرار گرفته است. در این صنعت از H_2O_2 به عنوان عامل سفیدکننده استفاده می‌شود.

افزودن مواد شیمیایی نظیر سدیم بیوسولفیت یا هیدروسولفیت جهت احیای H_2O_2 منجر به ایجاد غلظت بالا و نامطلوب نمک در فرآیند می‌شود. یک جایگزین مناسب برای احیای H_2O_2 استفاده از آنزیم کاتالاز است. از آنجایی که H_2O_2 تحت شرایط قلیایی فعال تر است، فرآیند سفید کردن نیز در pH بالا، بهتر انجام می‌شود (Hua *et al.*, 2007)، بنابراین کاتالاز قلیایی جذابیت زیادی در این صنعت دارد.

باکتری *Kocuria sp.* ASB 107 از چشمه آب سیاه رامسر جداسازی شده است و شناسایی میکروبیولوژیکی و مولکولی آن انجام گرفته است. این باکتری مقاومت نسبتاً بالایی در برابر اشعه گاما و UV دارد. سد آنتی اکسیدانی در این باکتری شامل آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز است (Asgarani *et al.*, 2012) و این آنزیم در pH های قلیایی فعال تر می‌باشد.

کاهش زمان رسیدن به محصول مطلوب و استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت، تولید آنزیم را در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه و اقتصادی می‌سازد. منبع کربن از اجزای اصلی و هزینه‌بر محیط کشت است. از این رو در میکروبیولوژی صنعتی منابع کربن ارزان قیمت مانند ملاس، آب پنیر، گلیسرول، پساب‌های سولفیتی و... مورد استفاده قرار می‌گیرند.

ملاس محصول نهایی صنایع قند است و خلوص آن به اندازه‌ای کاهش یافته که ادامه کریستالیزاسیون قند از آن غیراقتصادی است. امروزه چند نوع ملاس شناخته شده و به هر ماده غذایی که دارای بیش از ۴۳ درصد قند باشد ملاس گفته می‌شود. انواع ملاس شامل ملاس نیشکر، ملاس چغندر قند، ملاس مرکبات، ملاس نشاسته و... دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی هستند. ترکیب ملاس توسط فاکتورهایی مانند نوع خاک، دما، رطوبت، فصل تولید، واریته گیاه و... تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بنابراین تفاوت‌های قابل توجهی در محتوای شیمیایی، طعم، رنگ، ویسکوزیته و محتوای کلی قند در انواع ملاس وجود دارد. کربوهیدرات‌ها و قندها بخش مهم ترکیبات ملاس را تشکیل می‌دهند، از این رو می‌توانند به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار بگیرند (Aruldoss *et al.*, 2014)

آب پنیر محصول جانبی صنایع لبنی است که دارای ۴-۵ درصد لاکتوز، ۱-۰/۸ درصد پروتئین، و مقادیر کمتری اسیدهای آلی، نمک‌ها و ویتامین‌هاست. دفع آب پنیر به دلیل BOD (نیاز بیوشیمیایی به اکسیژن جهت تجزیه مواد آلی) بالا و مسأله زیست محیطی نیازمند پالایش است که امری وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشد. به همین دلیل و همچنین به علت محتوای بالای لاکتوز، آب پنیر به عنوان سوبسترای مناسب برای انواع تخمیر قابل استفاده است (Savvides *et al.*, 2012).

هدف از پژوهش حاضر دستیابی به بیشترین میزان رشد و تولید آنزیم کاتالاز در باکتری *Kocuria sp.* ASB 107 با استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت نظیر ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر و آب پنیر است.

مواد و روش‌ها

سویه و محیط کشت

باکتری مورد استفاده *Kocuria* sp. ASB 107 است که محیط کشت معمول آن محیط TSA (Tryptic Soy Agar) می‌باشد و در بانک ذخایر میکروبی آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی دانشگاه الزهرا (س) تهران نگهداری می‌شود. محیط کشت اقتصادی از ملاس چغندر قند (1, 2, 3, 4 % v/v)، عصاره مخمر (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 % w/v)، آمونیوم سولفات (0.05 % w/v)، NaCl (1.5 % w/v) تهیه شد.

برای جلوگیری از واکنش میلارد بین عامل آلدئیدی قند موجود در ملاس و پروتئین‌های موجود در محیط کشت مانند عصاره مخمر، ملاس به طور جداگانه استریل شده و پس از سرد شدن به محیط کشت افزوده می‌شود (Dehghan *et al.*, 2013).

به منظور بررسی تأثیر سایر منابع کربن ارزان قیمت بر میزان رشد باکتری و تولید آنزیم کاتالاز، ملاس نیشکر و آب پنیر با گرادیان غلظتی مشابه جایگزین ملاس چغندر قند گردید. در غلظت بهینه منبع کربن، گرادیان غلظتی عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن اصلی بررسی شد. همچنین تأثیر اوره به جای عصاره مخمر بر رشد و تولید آنزیم ارزیابی شد.

رسم منحنی رشد باکتری

به منظور رسم منحنی رشد، باکتری در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت TSB کشت داده شد. سپس در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰°C و ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۲ ساعت گرماگذاری شد. در مرحله بعد میزان ۵ درصد (v/v) از مایه تلقیح (پیش کشت) در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اصلی تلقیح شد و ضمن گرماگذاری هر ۲ ساعت نمونه برداری صورت گرفت و OD₆₀₀ نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بهینه سازی منبع کربن و اندازه گیری میزان رشد و فعالیت کاتالازی

جهت بررسی تأثیر میزان و نوع منبع کربن بر رشد باکتری و فعالیت کاتالازی، محیط کشت‌هایی با ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر و آب پنیر به عنوان منبع کربن اصلی با گرادیان غلظتی (1, 2, 3, 4 % v/v) تهیه شد. در هر محیط کشت پس از رسیدن باکتری به اوایل فاز سکون، سانتریفیوژ (8000 rpm, 4°C, 15 min) انجام شد و به منظور حذف ترکیبات محیط کشت، زیست توده سلولی ۵ مرتبه توسط سرم فیزیولوژی (NaCl 0.9 %) شستشو داده شد. برای تعیین میزان رشد باکتری، زیست توده سلولی در فور ۶۵°C به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

به منظور بررسی فعالیت کاتالازی در محیط کشت‌های مذکور، پس از رسیدن باکتری به اواخر فاز لگاریتمی، سانتریفیوژ انجام شده و زیست توده سلولی ۵ مرتبه توسط بافر فسفات (pH: ۷، ۵۰ میلی مولار) شستشو داده شد. سپس جهت استخراج آنزیم درون سلولی، زیست توده سلولی توسط لیزوزیم تیمار و سانتریفیوژ مجدد انجام شد و محلول رو شناور حاوی آنزیم کاتالاز جهت سنجش فعالیت آنزیمی جمع آوری گردید.

فعالیت کاتالازی با روش اسپکتروفتومتری با بررسی کاهش جذب نوری ناشی از تجزیه H_2O_2 (۳۵ میلی مولار) در حضور بافر فسفات توسط کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجش شد. در این روش یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیمی که ۱ میکرو مول H_2O_2 را در شرایط آزمایش (دما $25^{\circ}C$ و pH: ۷) به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند تعریف می‌شود (Zeng et al., 2010).

$$\text{Unit} = (\Delta OD_{240}/43.6 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}) \times 10^6$$

بهینه سازی منبع نیتروژن

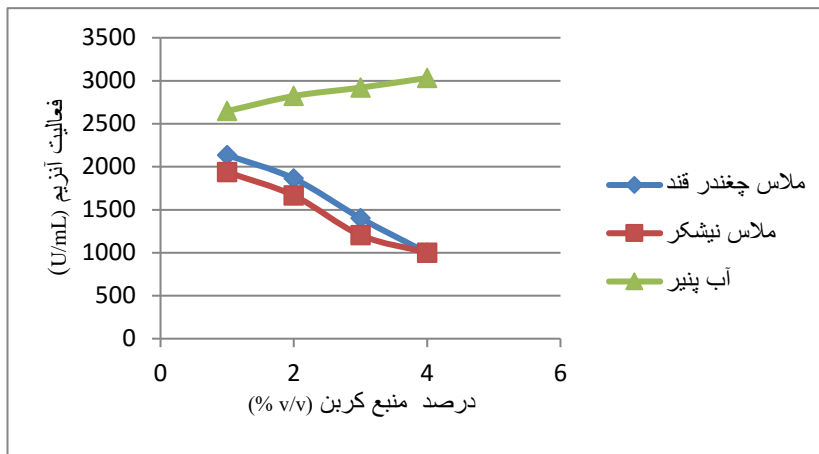
پس از انتخاب میزان بهینه منبع کربن، عصاره مخمر و اوره با گرادیان غلظتی (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 % w/v) به عنوان منبع نیتروژن اصلی استفاده و میزان رشد باکتری و فعالیت کاتالازی بررسی گردید.

تأثیر H_2O_2 بر افزایش تولید آنزیم کاتالاز

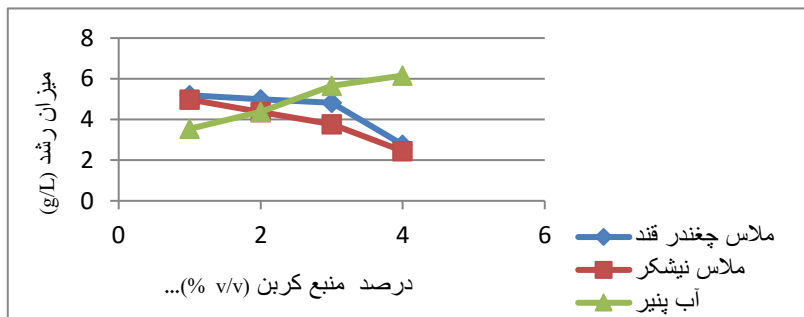
به منظور بررسی تأثیر تنش‌های اکسیداتیو نظیر H_2O_2 بر افزایش فعالیت آنزیم در اواخر فاز لگاریتمی رشد باکتری، H_2O_2 با رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار به محیط کشت تلقیح شد و فعالیت کاتالازی با مقدار پایه مقایسه گردید.

نتایج و بحث

بررسی میزان رشد و فعالیت آنزیمی باکتری در محیط کشت‌های با نوع و میزان متفاوت از منبع کربن نشان داد با ۱ درصد ملاس چغندر قند و ملاس نیشکر و ۴ درصد آب پنیر در محیط کشت نتایج مناسبی به دست می‌آید (شکل ۱ و ۲).



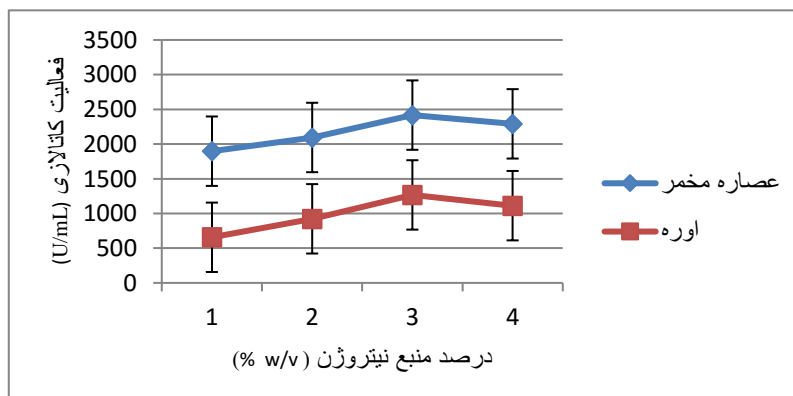
شکل ۱: بررسی فعالیت آنزیمی با استفاده از منابع کربن مختلف



شکل ۲: بررسی میزان رشد باکتری با استفاده از منابع کربن مختلف

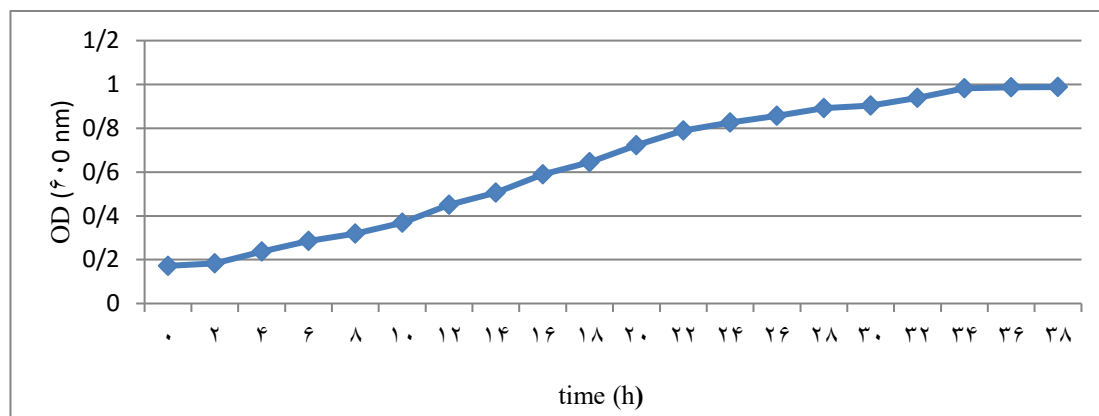
با در نظر گرفتن ملاس چغندر قند با غلظت ۱ درصد به عنوان یک منبع کربن مناسب، بهینه سازی منابع نیتروژن نیز

انجام شد و نتایج نشان داد که عصاره مخمر به میزان ۲/۵ درصد نسبت به اوره بر رشد و تولید آنزیم مؤثرتر می باشد (شکل ۳).

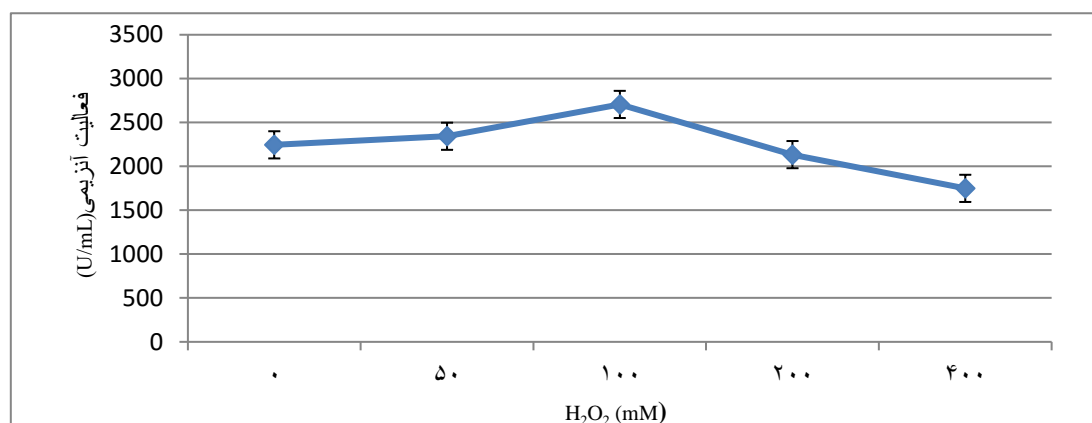


شکل ۳: بررسی میزان رشد باکتری با استفاده از منابع کربن

با در نظر گرفتن میزان بهینه منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت، با توجه به منحنی رشد باکتری (شکل ۴) در اواخر فاز لگاریتمی رشد، تحریک فعالیت کاتالازی آنزیم توسط غلظت‌های متفاوت H_2O_2 انجام شد و نتایج نشان داد که ۱۰۰ میلی مولار H_2O_2 نسبت به سایر غلظت‌ها به میزان بیشتری فعالیت آنزیمی را تحریک می‌کند (شکل ۵).



شکل ۴: منحنی رشد باکتری



شکل ۵: تأثیر غلظت‌های متفاوت H_2O_2 بر فعالیت کاتالازی در محیط کشت حاوی ۱ درصد ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن اصلی و ۲/۵ درصد عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن اصلی

بیشترین فعالیت کاتالازی این باکتری در دمای $30^{\circ}C$ ، pH: ۹ و هوادهی ۱۵۰ دور بر دقیقه دیده می‌شود.

در صنایع نساجی بیش از ۱۰۰ لیتر آب برای پردازش هر یک کیلوگرم پارچه استفاده می‌شود. در مرحله رنگ‌بری H_2O_2 به کار برده می‌شود و حذف H_2O_2 های اضافی پس از این مرحله ضروری است تا در مراحل بعدی پردازش پارچه تداخل ایجاد نشود. بخش زیادی از آب مصرفی در این صنعت صرف حذف H_2O_2 های اضافی باقی‌مانده از مرحله رنگ‌بری می‌شود که این امر مستلزم صرف هزینه و زمان زیادی است (Amorim et al., 2002). برای رفع این مشکل و نیز کاهش مصرف آب می‌توان از کاتالاز جهت حذف H_2O_2 استفاده کرد. کاتالاز تولید شده در باکتری *Kocuria sp.* ASB 107 که دارای بیشترین فعالیت در pH قلیایی است در این صنعت می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

Shi و همکارانش در سال ۲۰۰۸ تولید میزان زیادی کاتالاز قلیایی در باکتری *Bacillus subtilis* را گزارش کردند که

این باکتری در محیط کشت حاوی نشاسته، عصاره مخمر و پلی پپتون قادر به تولید ۳۵۰۰ U/mL آنزیم می‌باشد.

در پژوهش حاضر سعی شده است با دید کاهش هزینه‌های تولید آنزیم کاتالاز با استفاده از پسماندهای صنعتی ارزان قیمت در جهت تولید اقتصادی و به صرفه‌ی این آنزیم گام اولیه برداشته شود. بنابراین از ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر و آب پنیر به منابع کربن ارزان قیمت استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان تولید آنزیم کاتالاز در باکتری *Kocuria* ASB107 در محیط کشت حاوی ملاس چغندر قند (۲۱۳۶/۲۵ U/mL)، ملاس نیشکر (۱۹۳۷/۵ U/mL)، آب پنیر (۳۰۳۲/۵ U/mL) می‌باشد. بنابراین استفاده از منابع کربن ارزان قیمت جهت تولید آنزیم کاتالاز در مقایسه با سایر پژوهش‌هایی که از منابع کربن پرهزینه استفاده شده است معقول‌تر به نظر می‌رسد. در این شرایط باکتری *Kocuria* ASB107 توان تولید مقدار مناسب آنزیم کاتالاز را داراست که تا حدود زیادی قابل مقایسه با تولید کاتالاز قلیایی در *Bacillus subtilis* می‌باشد.

از سوی دیگر استفاده از آب پنیر به دلیل ارزان بودن و همچنین حل مشکلات دفع پساب به عنوان سوبسترای تولید آنزیم کاتالاز می‌تواند بسیار مناسب باشد. البته منابع نیتروژن همراه قند از جمله پروتئین‌های آب پنیر می‌تواند اثرات نامطلوبی تحمیل کرده و به عنوان فاکتور محدود کننده عمل کند که این امر به دلیل ممانعت از ایجاد نسبت کافی C/N می‌باشد. همچنین اساساً منابع نیتروژن غیر آلی نظیر اوره برای سنتز کاتالاز و رشد سلول مناسب نمی‌باشند (Hua et al., 2007).

در پژوهش‌های بسیاری استفاده از ملاس و آب پنیر به عنوان سوبستراهای ارزان قیمت برای تولید آنزیم‌ها، اسیدهای آمینه، اتانول و ... گزارش شده است. Xiao و همکارانش در سال ۲۰۰۷ تولید استوئین را در *B. subtilis* CICC 10025 در محیط کشت حاوی ملاس بهینه کردند. shikha و همکارانش در سال ۲۰۰۷ تولید آنزیم پروتئاز قلیایی (۲۸۵ U/mL) را در *Bacillus pantotheneticus* با استفاده از ملاس به عنوان منبع کربن گزارش کردند. Silva و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از آب پنیر به عنوان تنها منبع کربن برای تولید زانتان از *Xanthomonas campestris* استفاده کردند و گزارش کردند که تولید زانتان از آب پنیر بازده بالاتری نسبت به گلوکز به عنوان منبع کربن نشان داده است.

افزودن H_2O_2 به عنوان استرس اکسیداتیو جهت افزایش تولید کاتالاز استفاده می‌شود. البته با این کار رشد سلولی به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. از این رو غلظت های کم H_2O_2 جهت تحریک فعالیت آنزیم استفاده می‌شود (Yan et al., 2007).

H_2O_2 یکی از گونه های اکسیژن فعال (ROS) است که با ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل می‌تواند آسیب‌های جدی به بیومولکول‌ها از جمله لیپیدها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک وارد کند. Capua و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت H_2O_2 بر فعالیت کاتالازی چهار سویه *Acinetobacter* مقاوم به پرتو پرداختند که با استفاده از ۲/۵ میلی مولار H_2O_2 اثر افزایشی بر فعالیت کاتالازی گزارش شد.

در پژوهش حاضر نیز مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار H_2O_2 به عنوان استرس اکسیداتیو به محیط کشت‌های باکتری اضافه شد. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیمی ($2704/128$ U/mL) با ۱۰۰ میلی مولار H_2O_2 مشاهده می‌شود ($567/878$ U/mL) افزایش فعالیت آنزیمی در مقایسه با حالت قبل از القا توسط H_2O_2 . افزودن ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار H_2O_2 منجر به کاهش فعالیت کاتالازی نسبت به شاهد می‌شود. و این نشان می‌دهد که میزان H_2O_2 وارد شده به سلول بیش از توانایی سلول برای تجزیه آن‌هاست. لذا افزودن H_2O_2 بیش از ۱۰۰ میلی مولار می‌تواند سبب آسیب به سلول و کاهش فعالیت آنزیمی باکتری شود.

نتیجه گیری کلی

باکتری *Kocuria* ASB107 بصورت بالقوه توانایی تولید مقدار زیادی آنزیم کاتالاز را دارد. پژوهش‌ها نشان داده است که آنزیم تولیدی توسط این باکتری در محیط‌های قلیایی فعالیت بالایی دارد. چنین آنزیم‌هایی از نظر صنعتی حائز اهمیت هستند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد *Kocuria* ASB107 می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی برای تولید کاتالاز قلیایی در محیط کشت‌های اقتصادی معرفی شود.

منابع

- Amorim, A.M., Gasques, M.G., Andreus, J. and Scharf, M. (2002) The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabric. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 74: 433-436.
- Aruldoss, V. and Kalachelvan, P.T. (2014) Production of catalase by solid state fermentation using different agro and fruit peel wastes as substrates. *Journal of Modern Biotechnology*, 3: 8 – 13.
- Asgarani, E., Soudi, M.R., Borzooee, F. and Dabbagh, R. (2012) Radio- resistance in psychrotrophic *Kocuria* sp. ASB 107 isolated from Ab-e-Siah radioactive spring. *Journal of Environmental Radioactivity*, 113: 171-176.
- Capua, CD., Bortolotti, A., Farías, M. and Cortez, N. (2011) UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wet lands display high catalase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 317: 181-189.
- Dehghan, M., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S. and Fooladi, J. (2013) Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. *Iranian Journal of Microbiology*, 5: 285-292.
- Hua, Z., Yan, G., Du, G. and Chen, J. (2007) Study and improvement of the conditions for production of a novel alkali stable catalase. *Biotechnology Journal*, 2: 326–333.
- Rochat, T., Gratadoux, J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P. and Guchte, M. (2006) Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H_2O_2 and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:5143.
- Savvides, A.L., Katsifas, E.A., Hatzinikolaou, D., Karagouni, D.A. (2012) Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2759–2764.
- Schultz, D. and Kishony, R. (2013) Optimization and control in bacterial Lag phase. *BMC Biology*, 11: 120.

- Shi, X., Feng, M., Zhao, Y., Guo, X. and Zhou, P. (2008) Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretary catalase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 30:181–186.
- Shikha, R., Sharan, A. and Darmwal, N. (2007) Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource Technology*, 98: 881-885.
- Silva, M., Fornari, R.C. and Mazutti, M.A. (2009) Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food and Engineering*, 90: 119-123.
- Soung, N.K. and Lee, Y.N. (2000) Iso-catalase Profiles of *Deinococcus* spp. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 412- 416.
- Xiao, Z.J., Liu, J.Y. and Qin, P. (2007) Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 61-68.
- Zeng, H.W., Cai, Y.J., Liao, X.R., Qian, S.L., Zhang, F. and Zhang, D.B. (2010) Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. *Annals of Microbiology*, 60:701–708.
- Zeng, H.W., Cai, Y.J., Liao, X.R., Zhang, F., Li, Y.L., Zeng, X.K. and Zhang, D.B. (2011) *Serratia marcescens* SYBC08 catalase isolated from sludge containing hydrogen peroxide shows increased catalase production by regulation of carbon metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 11: 37–43.

Optimization of growth and catalase production in *Kocuria* sp. ASB 107 in economic medium

E.Asgarani^{1*}, E. Godini², J.Fooladi³

Received: 2018.4.7

Accepted: 2019.1.30

Abstract

Catalase is an enzyme capable of catalyzing the alteration of H₂O₂ to O₂ and H₂O. It has acquired importance due to its application in the textile industries. In the textile industry, H₂O₂ is used as a bleach. This process is performed at high pH. Therefore, alkaline catalase is very suitable for H₂O₂ reduction. *Kocuria* ASB107 has a lot of alkaline catalase. In order to achieve the highest rate of bacterial growth and catalase production, sugar cane molasses, sugar beet molasses and whey were used as cheap carbon sources. Growth curves were plotted and at the late logarithmic phase, fermentation product was harvested. Catalase activity was measured spectrophotometrically by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm affected by the decomposition of hydrogen peroxide. Bacterial growth was also estimated from the weight of dry biomass. The highest biomass (5.19 g/L) and catalase activity (2136.25 U/mL) were found in medium consisted 1% molasses and 2.5 % yeast extract. In addition with the 4% whey as a carbon source, catalase activity and growth were 3032.5 U/mL and 6.16 g/L respectively. The results showed molasses and whey are suitable and inexpensive substrate. On the other hand inorganic nitrogen sources such as urea are not suitable for the production of catalase and cell growth.

Key words: Catalase, *Kocuria* ASB107, Molasses, Optimization, Whey

1-Associate Professor of Biotechnology department, Faculty of biological Sciences, Alzahra University, Tehran 2-M.Sc in microbiology, Faculty of biological Sciences, Alzahra University, Tehran 3-Assistant Professor of Biotechnology department, Faculty of biological Sciences, Alzahra University, Tehran

* (Corresponding author: asgarani@gmail.com)

اثر آب مغناطیده بر روی اندام های رویشی و روزنه گیاه عدس (*Lens culinaris* L.)

نفیسه عظیمی^{۱*}، احمد مجد^۲، فائزه فنانی^۳، صدیقه اربابیان^۴، طاهر نژادستاری^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۳۰

چکیده

به منظور بررسی اثر آب مغناطیده بر اندام های رویشی و تعداد روزنه، بذرهاى عدس در دو گروه، در یک زمین آزمایشی کشت شدند. یک گروه با آب معمولی و دیگری با آب مغناطیده آبیاری شدند. برای بررسی ساختار تشریحی و روزنه به ترتیب از روش های متداول سلول - بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. نتایج نشان دادند در گیاهان تیمار، مریستم رویشی حجیم تر و کشیده تر شده، همچنین در این گیاهان افزایش فراوانی و تراکم عناصر چوب در ساقه، دمبرگ و ریشه و نیز افزایش قطر ریشه و وسعت استوانه مرکزی و کاهش وسعت ناحیه پوست و افزایش تراکم و فشردگی سلول های پارانشیم مزوفیل اسفنجی مشاهده شد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت، آب مغناطیده سبب بهبود ویژگی های رشد و در نتیجه کاهش دوره رشد عدس شد، که این موضوع در کاهش آب مصرفی برای آبیاری از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

واژه های کلیدی: آب مغناطیده، اندام های رویشی، روزنه، عدس.

مقدمه

راه کار استفاده از میدان مغناطیسی برای بهبود سختی آب به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک، در سال های اخیر مطرح شده است. با توجه به اهمیت آب برای سلول های گیاه، بررسی ویژگی های آبی که مورد استفاده سلول قرار می گیرد، می تواند به درک متابولیسم سلول که تحت میدان مغناطیسی قرار گرفته کمک کند. آب یک مولکول دیامغناطیس است و به سبب وجود پیوندهای هیدروژنی بین مولکول های خود می تواند تحت تأثیر میدان های الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی تغییر یابد (Montagnier et al., 2009 & 2011). عبور آب از میدان مغناطیسی با سرعت ثابت باعث مغناطیسی شدن آن می شود که به آن آب مغناطیده گفته می شود (Su et al., 2000). تغییرات ایجاد شده در آب مغناطیده، شامل تغییر در ویژگی های

۱- فارغ التحصیل دکتری، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

* نویسنده مسئول: nafiseazimi@yahoo.com

۲- استاد، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۳- دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس تهران

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

۵- دانشیار، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

اپتیک، ترمودینامیک و ویژگی‌های مکانیکی آن شامل چگالی، نیروی کشش سطحی، نقطه ذوب و انجماد و هدایت الکتریکی می‌باشد (Chang & Weng., 2006) (Amiri & Dadkhah, 2006) (Higashitani *et al.*, 1999). بسیاری از ویژگی‌های غیر معمول مولکول آب و نیز تأثیر پذیری آن از میدان مغناطیسی می‌تواند به باندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب نسبت داده شود (Mac Mahon., 2009). امروزه نظر بر این است که در حضور میدان‌های مغناطیسی، تعداد قابل توجهی از شبکه‌های چهارتایی مولکول‌های آب تشکیل می‌شود (Wang *et al.*, 2007).

در بین تمامی منابع لازم برای رشد و فعالیت گیاه، آب به عنوان محدودکننده‌ترین منبع برای کشاورزی محسوب می‌شود (Taiz & Zeiger, 2002). خشکسالی‌های اخیر و تقاضای شدید برای آب در کشاورزی فشار زیادی بر منابع آبی تحمیل کرده است. یکی از راه‌های کاهش کل آب مصرفی برای آبیاری، افزایش محصول تولیدی به ازای هر واحد آب مصرفی (عملکرد آب) است. یکی از این روش‌ها، عبور دادن آب قبل از آبیاری از یک میدان مغناطیسی است که می‌تواند عملکرد آب را افزایش دهد. میدان مغناطیسی احتمالاً با تأثیر بر آب و تغییر ویژگی‌های آن، راندمان مصرف آب را برای سیستم‌های گیاهی افزایش می‌دهد (Maheshwari & Grewal, 2009). نتایج مطالعات، افزایش محصول کتان، گندم، عدس و نخود را به ترتیب به میزان ۹ درصد، ۳۱ درصد، ۲۵ درصد و ۳۸/۵ درصد در گیاهان آبیاری شده با آب مغناطیده نشان دادند (Hozayn *et al.*, 2013). همچنین گزارشی مبنی بر افزایش ۱۲-۲۳ درصدی محصول برنج آبیاری شده با آب مغناطیده وجود دارد (Tian, 1989). محققین دیگری با مشاهده بهبود ویژگی‌های رشد گیاه ذرت و نیز افزایش محتوای فریتین و کلسیم و آهن در دانه گیاهان آبیاری شده با آب مغناطیده این روش را به عنوان راهکار مناسبی بدون اثر سوء بر سلامت انسان در جهت افزایش محصولات گیاهی و نیز غنی سازی محصولات زراعی معرفی کردند (Ghanati *et al.*, 2015).

عدس، با نام علمی *Lens culinaris* Medik. متعلق به خانواده باقلائیان (Fabaceae) می‌باشد. عدس دارای گل آذین خوشه‌ای با گل‌های دوجنس بنه کوتاه و پیاله مانند است. گل آذین دارای ۲ تا ۴ گل، گل‌ها کوچک با اندازه‌ی ۴ تا ۷ میلی متر، به رنگ سفید با لکه‌های آبی و صورتی بوده، هر گل دارای ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ، ۵ پرچم، مادگی یک برچه‌ای و دارای ۱-۳ تخمک می‌باشد. امروزه، عدس یکی از منابع مهم تأمین پروتئین در جیره غذایی انسان و دام، در کشورهای درحال توسعه و به‌ویژه کشورهای خاورمیانه است (Sarker *et al.*, 2003) و از جمله غلات با ارزش و غنی از آهن است. با فرض اینکه آب مغناطیده با تأثیر بر پدیده‌های رشد و نمو می‌تواند منجر به بهبود عملکرد گیاه عدس شود، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر آب مغناطیده بر ویژگی‌های اندام‌های رویشی و تعداد روزنه در گیاه عدس انجام شده است

مواد و روش ها

مواد گیاهی و تیمار

به منظور انجام پژوهش حاضر، بذرهای سالم گیاه عدس (نوع قرمز رنگ و ریز) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند و برای اعمال تیمار از دستگاه همزن یون مغناطیس متعلق به شرکت فناوری ایرانیان پژوهش نصیر(فاپن) استفاده شد. این پژوهش در ماههای شهریور تا اردیبهشت سالهای ۹۴-۹۳ انجام شد. بذرهای عدس ابتدا حدود ۲۴ ساعت در آب خیسانده شدند و در گلخانه‌ای به ابعاد 10×3 متر در دو گروه کاشته شدند. بطور تصادفی یکی از گروه‌ها با آب شهری بدون مغناطیده شدن و دیگری با آب مغناطیده (عبور داده شده از همزن یون مغناطیس) در فواصل ۶ روزه آبیاری شدند. دمای گلخانه 27 ± 1 درجه سانتی گراد بود و از نور طبیعی برای رشد گیاهان استفاده شد.

مطالعات میکروسکوپی

به منظور بررسی ساختار بافتی و مقایسه آن‌ها، ابتدا از بخش‌های ساقه، دمبرگ و ریشه گیاهان، قطعاتی در اندازه‌های ۱ سانتی متری جدا و در مخلوط الکل-گلیسرین به نسبت ۱:۳ به مدت حداقل یک هفته قرار داده شدند. برای تهیه برش‌های دستی از نمونه‌هایی که در الکل-گلیسرین قرار گرفته بودند، با استفاده از یک تیغ تیز برش‌های عرضی نیمه نازک تهیه شد. برش‌های تهیه شده بعد از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۰-۵ دقیقه، در محلول آب ژاول ۵ درصد و پس از دوبار شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در اسید استیک ۵ درصد قرار داده شدند تا محتویات سیتوپلاسمی تخلیه و شفاف سازی نمونه‌ها صورت گیرد. در انتها شستشو با آب مقطر مجدداً تکرار شد. برش‌های دستی با روش رنگ آمیزی مضاعف آبی متیل-کارمن زاجی رنگ آمیزی شد. بطوری‌که ابتدا به مدت ۲۰ ثانیه در رنگ آبی متیل قرار داده شدند و پس از شستشو با آب مقطر، ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در کارمن زاجی قرار گرفتند، سپس نمونه‌ها با آب مقطر شسته شدند. برای مطالعه ساختار بافتی و مقایسه بافت‌های مریستم رأس ساقه، رأس ریشه و برگ نمونه‌های موردنظر از هر دو گروه، در یک زمان برداشت شد و در محلول تثبیت کننده FAA (فرمالین: اسید: اتانول، ۱۷:۱:۲) تثبیت شدند. پس از ۱۴ ساعت تثبیت، برای خارج شدن محلول تثبیت کننده از نمونه‌ها به مدت ۵-۶ ساعت با آب جاری شستشو شده و سپس برای آبیگری از الکل‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد عبور داده شدند. مدت زمان هر مرحله ۱۰-۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها به ترتیب به محلول‌های ۲حجم الکل-۱حجم تولوئن، حجم‌های مساوی از الکل و تولوئن، ۱ حجم الکل-۲حجم تولوئن و تولوئن خالص انتقال داده شده تا تولوئن جایگزین الکل شود و در مرحله بعدی نمونه‌ها دوبار در حمام پارافین قرار گرفته تا پارافین جایگزین تولوئن شود و سپس نمونه‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شدند (Holleman & Wiberg, 1985) نمونه‌ها با میکروتوم دستی با ضخامت ۸ میکرومتر برش‌گیری شده و رنگ آمیزی مضاعف

هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت. عکس برداری از نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ نوری NikonYS100 دارای دوربین دیجیتال LAOMED iVu 3100 در بزرگ‌نمایی‌های مختلف انجام شد (Cheregani & Kouhkan, 2008).

آماده سازی نمونه برای تهیه‌ی ریزنگار میکروسکوپ الکترونی (SEM)

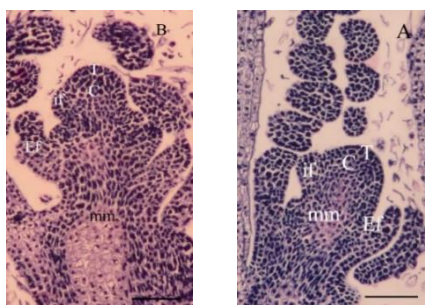
نمونه‌های مورد مطالعه پس از خشک شدن کامل، روی بخش فلزی مدوری با دقت چسبانده و سپس طلا به روش [Physical Vapor Deposition] P.V.D درون دستگاه مخصوص روی نمونه، نشانده شد. در این روش، مولکول‌های گاز آرگون سطح طلا را بمباران کرده و آن را یونیزه می‌کنند، مخلوطی از مولکول‌های گاز و یون‌های طلا با بار مثبت بر روی نمونه‌ی دارای بار منفی بطور فیزیکی می‌نشینند. لایه نشانده شده آنقدر نازک است (حدود ۱۰۰ آنگستروم) که تأثیری روی میکروساختار نخواهد داشت. سپس نمونه‌ها به جایگاه مخصوص در میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) منتقل و از ساختار سطحی آنها، ریز نگارهای الکترونی تهیه شد. برای مشاهده و عکس برداری فراساختار روزه‌ها از میکروسکوپ الکترونی مدل KYKY-EM3200 استفاده شد.

روش‌های محاسبه‌ی آماری

کلیه مشاهدات و آزمایشات با سه تکرار و حداقل با ۱۰ گیاه مستقل انجام شد و معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ با آزمون تی غیرجفتی مورد بررسی قرار گرفت.

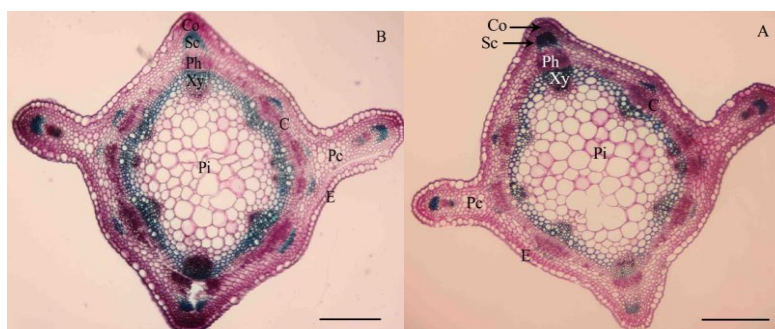
نتایج و بحث

تحقیقات اخیر، آب مغناطیده را به عنوان یک فاکتور فیزیکی معرفی کرده است که می‌تواند رشد و نمو گیاهان را تحریک کند و علاوه بر این، منجر به افزایش محصول در گیاهان شود (Ghanati & Payes, 2010) (Hozayn & Abdul Qados, 2010).
 2015 مقایسه مریستم رویشی رأس ساقه گیاه شاهد و تیمار نشان داد که مریستم رویشی گیاه تیمار حجیم‌تر و کشیده‌تر شده است که احتمالاً نشانه فعال‌تر شدن تقسیمات در این ناحیه است. مشاهده و بررسی تصاویر میکروسکوپی مریستم رویشی ساقه حاکی از حجیم شدن سلول‌های مریستم مغزی در نمونه‌های تیمار نسبت به شاهد بود. همچنین در نمونه تیمار نسبت به شاهد، تسریع در تشکیل سیستم آوندی نیز دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه ساختار تشریحی مریستم رویشی رأس ساقه گیاه عدس (A: شاهد ، B: تیمار)
T: پوسته؛ C: مغز؛ lf: بنیان برگگی؛ Ef: طرح اولیه برگگی؛ mm: مریستم مغزی (مقیاس معادل ۱۹۰ μm است).

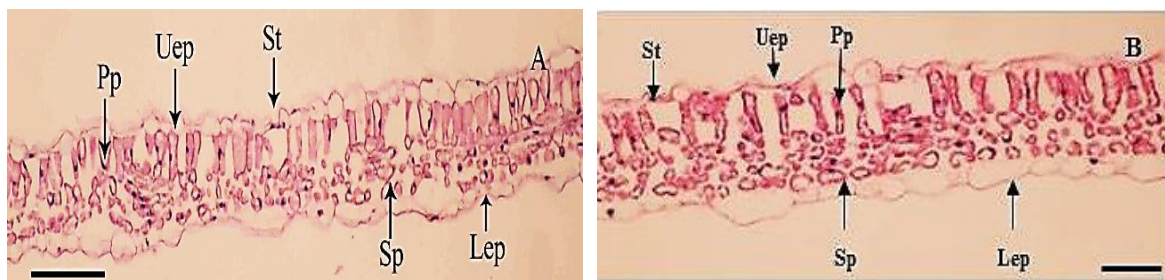
مطابق آنچه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، فراوانی و تراکم عناصر چوب در نمونه تیمار بیشتر از نمونه شاهد است. در زیر اپیدرم در گوشه‌های ساقه نیز تراکمی از سلول‌های کلانشیمی با دیواره سلولزی ضخیم دیده می‌شود که در نمونه تیمار نسبت به شاهد نوعی افزایش یا گسترش ردیف سلول‌های کلانشیمی مشاهده می‌شود.



شکل ۲: مقایسه ساختار تشریحی ساقه در گیاه عدس (A: شاهد ، B: تیمار)

E: اپیدرم، Co: کلانشیم ، Sc: اسکلرانسیم، Pc: پارانشیم پوست، Ph: فلوم، Xy: زایلم، Pi: پارانشیم مغز، C: کامبیوم (مقیاس معادل ۱۹۰ μm)

بررسی تصاویر میکروسکوپی از برش‌های میکروتومی برگ نشان داد که در برگ نمونه تیمار در مقایسه با شاهد، سلول‌های پارانشیم مزوفیل اسفنجی، تراکم و فشردگی بیشتری را نشان می‌دهند. سلول‌های پارانشیم نرده‌ای نیز باریک‌تر و کشیده‌تر شده و فضاهای خالی بین آن‌ها افزایش یافته است (شکل ۳). نتایج صفات قابل اندازه‌گیری بیان شده مربوط به ساقه و برگ در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۳: مقایسه ساختار تشریحی برگ در گیاه عدس (A : شاهد؛ B: تیمار)

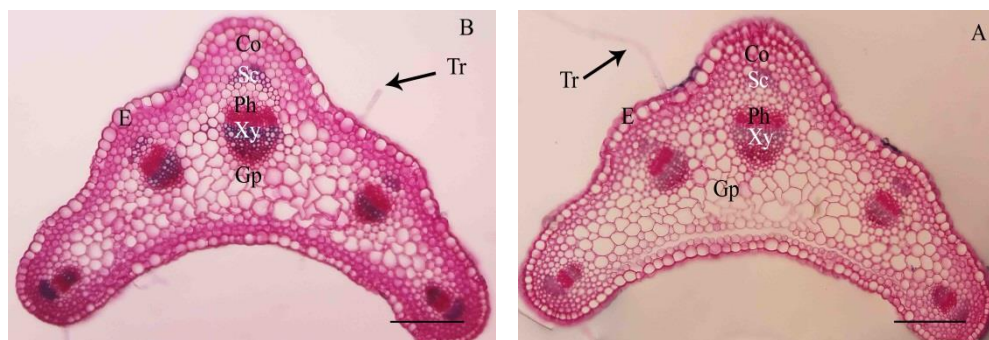
Uep: اپیدرم فوقانی؛ Pp: مزوفیل نردبانی؛ Sp: مزوفیل اسفنجی؛ Lep: اپیدرم تحتانی؛ St: روزنه (مقیاس معادل ۱۹۰ μm است).

جدول ۱: مقایسه نتایج تغییرات ساختاری تشریحی در ساقه و برگ عدس

طول مریستم ساقه (μm)	ضخامت ردیف سلول - های کلانشیمی ساقه (μm)	قطر عناصر چوب ساقه (μm)	تراکم سلول‌های پارانشیم مزوفیل اسفنجی برگ در $500 \mu\text{m}^2$	تراکم سلول‌های پارانشیم نرده‌بانی برگ در $500 \mu\text{m}^2$	قطر مریستم ساقه (μm)	
$b_{5\pm 30.0}$	$b_{1\pm 3.0}$	$a_{0.1\pm 1.0}$	$b_{1\pm 5.0}$	$a_{1\pm 1.5}$	$b_{5\pm 22.5}$	شاهد
$a_{5\pm 32.5}$	$a_{1\pm 3.5}$	$a_{0.1\pm 1.1}$	$a_{1\pm 5.5}$	$b_{1\pm 1.0}$	$a_{5\pm 24.0}$	تیمار

نتایج بصورت $X \pm SE$ در سه تکرار نشان داده شده است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

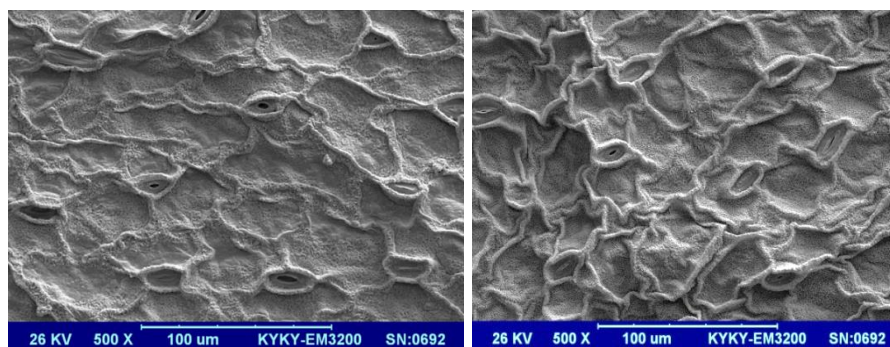
با بررسی برش‌های عرضی دمبرگ مشاهده شد که فراوانی و تراکم عناصر چوب در نمونه تیمار تا حدی بیشتر از نمونه شاهد است. همچنین ضخامت ردیف سلول‌های اسکلرانشیمی نیز در نمونه تیمار نسبت به نمونه شاهد بیشتر به نظر می‌رسد (شکل ۴)



شکل ۴: مقایسه ساختار تشریحی دمبرگ در گیاه عدس (A: شاهد ، B: تیمار)

E: اپیدرم، Co: کلانشیم، Sc: اسکلرانشیم، Ph: فلوم، Xy: زایلیم، Gp: پارانشیم زمینه‌ای، Tr: کرک (مقیاس معادل $190 \mu\text{m}$ است).

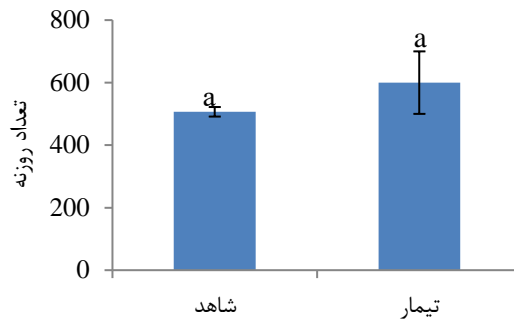
روزنه در عدس از نوع آنموسیتیک یا تیپ آلاله است که سلول‌های همراه از دیگر سلول‌های اپیدرمی غیر قابل تشخیص هستند. (شکل ۵). عدم وجود تفاوت در تراکم روزنه بین دو گروه گیاهی در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵: ریزنگار الکترونی از روزنه در سطح تحتانی برگ، گیاه شاهد (A) و تیمار (B).

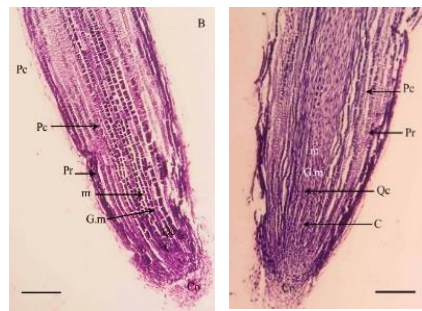
اندازه‌گیری تعداد روزنه در 5 mm^2 از سطح برگ نشان داد که تعداد روزنه‌های هوایی در برگ نمونه تیمار نسبت به

شاهد، تفاوت معنی‌داری ندارد (شکل ۶).



شکل ۶: مقایسه میانگین تعداد روزنه در گیاهان شاهد و تیمار. داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

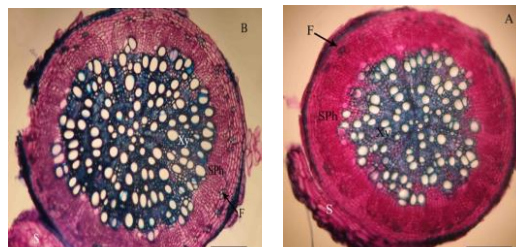
در بررسی برش‌های میکروتومی رأس ریشه، کاهش وسعت ناحیه پوست در نمونه‌ی تیمار نسبت به شاهد مشاهده شد که این موضوع، با برش‌های عرضی ریشه هم‌خوانی دارد. از سوی دیگر، تسریع تشکیل سیستم آوندی در رأس ریشه در نمونه تیمار نسبت به شاهد نیز قابل مشاهده است (شکل ۷).



شکل ۷: مقایسه ساختار تشریحی مریستم رأس ریشه گیاه عدس (A: شاهد؛ B: تیمار)

Co: کلاهک، C: کالیپتروژن، PT: پروتودرم، QC: منطقه آرام، G.m: مریستم زمینه‌ای، m: مغز، PC: پارانشیم پوست (مقیاس معادل ۱۹۰ μm است).

در نمونه تیمار، قطر ریشه نسبت به شاهد افزایش نشان داد. وسعت استوانه مرکزی در نمونه‌ی تیمار نسبت به شاهد افزایش یافته است. در استوانه مرکزی نیز، فراوانی عناصر چوبی در نمونه تیمار نسبت به شاهد افزایش نشان داد. از طرفی، وسعت منطقه پوست در نمونه شاهد از نمونه تیمار بیشتر است. در نمونه تیمار سلول‌های پارانشیم پوست فشرده‌تر و منظم‌تر هستند (شکل ۸). نتایج صفات قابل اندازه‌گیری بیان شده مربوط به دمبرگ و ریشه در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۸: مقایسه ساختار تشریحی ریشه در گیاه عدس (A: شاهد، B: تیمار)

S: چوب پنبه کاذب (سوبروئید)، Sph، آبکش ثانویه، F: فیبرهای آبکش اولیه، Xy: چوب (مقیاس معادل ۱۹۰ μm است).

جدول ۲: مقایسه نتایج تغییرات ساختاری تشریحی در دمبرگ و ریشه عدس

ضخامت ردیف سلول‌های اسکلرانشی می دمبرگ (μm)	قطر عناصر چوب دمبرگ (μm)	قطر عناصر ریشه (μm)	وسعت استوانه مرکزی ریشه (μm)	وسعت پوست ریشه (μm)	قطر ریشه (μm)
شاهد $b_{1\pm 25}$	$a_{0/1\pm 10}$	$a_{0/1\pm 12}$	$b_{5\pm 560}$	$a_{5\pm 190}$	$b_{10\pm 940}$
تیمار $a_{1\pm 30}$	$a_{0/1\pm 12}$	$a_{0/1\pm 15}$	$a_{5\pm 665}$	$b_{5\pm 160}$	$a_{10\pm 980}$

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

بطور کلی می‌توان گفت فراوانی چوب در برش‌های عرضی ساقه، ریشه و دمبرگ که در نتایج این مطالعه مشاهده شد، می‌تواند به علت افزایش سرعت رشد در گیاهان تیمار نسبت به شاهد و در نتیجه نیاز به سیستم آوندی گسترده‌تر برای جذب آب بیشتر و افزایش استحکام باشد. افزایش سرعت رشد در گیاهان آبیاری شده با آب مغناطیبه نسبت به گیاهان آبیاری شده با آب معمولی، می‌تواند به این دلیل باشد که وقتی گیاهان با آب معمولی آبیاری می‌شوند یک رسوب سفیدرنگ از بیکربنات و کربنات کلسیم در سطح خاک تشکیل می‌شود، برخی از این بیکربنات‌ها توسط نفوذ آب در خاک شسته شده و بر روی ریشه گیاهان رسوب می‌کنند در این حالت گیاهان دچار خفگی می‌شوند و برای فرار از این خفگی، ریشه‌های اضافی تولید می‌کنند. این فرایند منجر به کاهش رشد در گیاهان می‌شود. درحالی‌که گیاهان آبیاری شده با آب مغناطیبه براحتی نمک‌های معدنی را از خاک جذب می‌کنند و هیچ رسوبی در سطح خاک آنها تشکیل نمی‌شود. این امر می‌تواند منجر به افزایش سرعت رشد شود (Nasher, 2008). از سوی دیگر، اثر تحریکی مثبت آب مغناطیبه می‌تواند به علت افزایش متابولیسم و یا فعال شدن ژن‌های مربوطه در هسته سلول باشد که موجب تسریع جوانه‌زنی و افزایش سایر شاخص‌های رشدی گیاه می‌شود. همچنین گزارش‌هایی مبنی بر اثر قابل توجه القای متابولیسم یاخته‌ای و میتوز توسط آب مغناطیبه در لوبیا، عدس، و کتان داده شده است. (Fomicheva *et al.*, 1992, Belyavskaya, 2001) a & b)

نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر پژوهش‌ها در این حوزه مطابقت دارد. مطالعات دیگر نشان دادند، آبیاری بذر ذرت با آب مغناطیبه تأثیر بسزایی در نمو بخش هوایی در مراحل ابتدایی رشد داشته است (Aladjadjiyan, 2002)، همچنین افزایش محصول و محتوای قند خربزه آبیاری شده با آب مغناطیبه نیز گزارش شده است (Lin & Yotvat, 1990). افزایش معنی دار محصول و بهره‌وری آب در نخود و کرفس نیز گزارش شده است، مغناطیبه کردن آب بازیافتی و آب شور (حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نمک) عملکرد نخود و کرفس را به ترتیب ۱۲ و ۲۳ درصد و بهره‌وری آب را به ترتیب ۱۲ و ۴۲ درصد افزایش داد. (Maheshwari & Grewal, 2009) در مطالعه دیگری اثر مثبت آب مغناطیبه بر رشد گیاهان گندم و نوعی نخود (*Cicer orientalis L.*) گزارش شد. در این مطالعه تأثیر تحریکی آب مغناطیبه بر رشد، به افزایش پیگمان‌های فتوسنتزی و بیوسنتز پروتئین و تحریک کننده‌های رشد (اکسین) نسبت داده شد (Hozayn & Abdul Qados, 2010, a & b)

بهبود سرعت رشد گیاه عدس را شاید بتوان علاوه بر افزایش حلالیت آب و بهبود ویژگی های خاک به افزایش متابولیسم گیاهی (فتوسنتز و رنگیزه های فتوسنتزی) نسبت داد، بنابراین به نظر می رسد که آبیاری با آب مغناطیده در تسریع رشد گیاه عدس نقش داشته است. نتایج حاصل از پژوهش فوق با نتایج سایر محققین بر روی گیاه ذرت نیز همسویی دارد. (Fomicheva & Gavoroon, 1992, b).

نتیجه گیری کلی

به دلیل پیچیدگی سیستم های گیاهی و انعطاف پذیری هنرمندانه آن ها در مقابل تغییر عوامل محیطی، نمی توان در مورد سازوکار اثر آب مغناطیده بر یاخته های گیاهی، هنوز اظهار نظر قطعی کرد. اما به طور کلی می توان گفت که آب مغناطیده سبب بهبود رشد گیاه عدس و افزایش استحکام آن شد. این نتایج، محققین را امیدوار می سازد که بتوانند سرعت رشد گیاهان را بدون دستکاری ژنتیکی بالا ببرند. علاوه بر این، با کاهش دوره رشد گیاه، میزان نیاز به آبیاری کاهش یافته و به این ترتیب در مصرف آب صرفه جویی به عمل می آید.

منابع

- Aladadjjiyan, A. (2002) Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of Zea mays. *Journal of Central European Agriculture*, 3(2): 89 - 94.
- Amiri, M.C and Dadkhah, A.A. (2006) On reduction in the surface tension of water due to magnetic treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 278: 252-255.
- Belyavskaya, N.A. (2001) Ultrastructure and calcium balance in meristem cells of pea roots exposed to extremely low magnetic fields. *Advances in Space Research*, 28: 645-65
- Chang, K.T and Weng, C.I. (2006) The effect of an external magnetic field on the structure of liquid water using molecular dynamics simulation. *Journal of Applied Physics*, 100: 043917-043922.
- Cheregani, A and Kouhkan, F.(2008) Diesel Exhaust particles and allergenicity of pollen grain of *Lilium martagon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3):568-573.
- Fomicheva, V.M., Gavoroon, R.D. and Danilov, V.I. (1992) (a) Proliferative activity and cell reproduction in meristems of seedling roots of pea, flax and lentil under conditions of screening of geomagnetic field. *Biophysics*, 37: 645-648.
- Fomicheva, V.M., Gavoroon, R.D. and Danilov, V.I. (1992) (b) Dynamics of RNA and protein synthesis in the cell of the root meristems of the pea, lentil and flax. *Biophysics*, 37:649-656.
- Ghanati, F., Mohamadalikhani, S., Afzalzadeh, R. and Hajnorouzi, A. (2015) Change of growth pattern, metabolism, and quality and quantity of maize plants after irrigation with magnetically treated water. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 34(3): 211–215.
- Ghanati, F. and Payez, A.(2015) Iron biofortification and activation of antioxidant system of wheat by static magnetic field. *Iranina journal of science and technology, Transaction A, science*, 39(3):355-360.

- Higashitani, K., Oshitani, J. and Ohmura, N. (1999) Effects of magnetic field on water investigated with fluorescent probes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109: 167-173.
- Holleman, A.F. and Wiberg, E.(1985) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. de Gruyter, Springer. Pp 570, Berlin.
- Hozayn, M. and Abdul Qados, A.M.S.(2010) (a) Magnetic water application for improving wheat (*Triticum aestivum* L.) crop production. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4):677-682.
- Hozayn, M. and Abdul Qados, A.M.S. (2010) (b) Irrigation with magnetized water enhances growth, chemical constituent and yield of chickpea (*Cicer orietinum* L.). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1 (4): 671- 676.
- Hozayn, M., Abd El Monem, A.A. and Abderlaouf, R.E. (2013) Do Magnetic Water Affect Water Use Efficiency, Quality and Yield of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plant under arid regions conditions?. *Journal of Agronomy*, 12(1): 1-10.
- Lin, I. J., and Yotvat, J. (1990) Exposure of irrigation and drinking water to a magnetic field with controlled power and direction. *Journal of Magn Magn Mater*, 83: 525-526.
- Mac Mahon, C.(2009) Investigation of the quality of water treated by magnetic fields, University of southern queens land faculty of engineering and surveying, Undergraduate thesis.
- Maheshwari, B.L. and Grewal, H.S. (2009) Magnetic treatment of irrigation water: Its effects on vegetable crop yield and water productivity. *Agriculture water management*, 96: 1229-1236.
- Montagnier, L., Aissa, J., Ferris, S. and Montagnier, J.L. (2009) Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 1:81-90.
- Montagnier, L., Aissa, J., Del Giudice, E. and Lavallo, C. (2011) DNA waves and water. *Journal of Physics: Conference Series*, (306).
- Nasher, S.H. (2008) The effect of magnetic water on growth of chick-Pea seeds. *Engineering and Technology*, 26.
- Sarker, A., Eriskine, W. and Singh, M. (2003) Regression models for lentil seed and straw yield in near east. *Agricultural and forest meteorology*, 116:61-72.
- Su, N., Wu, Y. and Mar, C.Y.(2000) Effect of magnetic water on the engineering properties of concrete containing granulated blast-furnace slag. *Cement and Concrete Research*, 30: 599-605.
- Taiz, L. and Zeiger, E.(2002) *Plant physiology*, 3rd edition. Sinauer Associates. 690 Pp. Sunderland.
- Tian, W.X. (1989) Effect of magnetic water on seed germination, seedling growth and grain yield of rice. *Journal of Jilin Agricultural Union*, 4: 005.
- Wang, Q., Li, L., Chen, G. and Yang, Y.(2007) Effects of magnetic field on the solgel transition of methylcellulose in water. *Carbohydrate Polymer*, 70:345-349.

Effects of Magnetically - Treated Water on vegetative organs and stomata density of lentil (*Lens culinaris* L.)

N. Azimi^{1*}, A.Majd², F. Ghanati³, T .Nejadsattari⁴, and S. Arbabian⁵

Received: 2017.1.16
Accepted: 2018.11.11

Abstract

In order to evaluate the effect of magnetically treated water on vegetative organs and stomata, lentil seeds were cultured in green house and were irrigated either with tap water (control group), or magnetically treated water. Investigation of vegetative organs was performed by cell-histological methods. Scanning electronic microscope was used to observation of stomata structure. Magnetically treated water cause bulkier and more drawn vegetative meristem. Also abundance and density of xylem in stem, root and petiole were increased in treated plants. Root diameter and extent of the central cylinder were increased. Density of spongy parenchyma cells in leaf of treated plants was more than control plants, whereas in comparison with control ones, cortex extent of root apex was decreased in treated plant. In general magnetically treated water improved lentil growth characteristics, which is of particular importance in reducing water consumption for irrigation.

Keyword: Lentil, Magnetically treated water, Stomata, Vegetative organs.

1-Department of Plant Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran

*(Corresponding Author: nafiseazimi@yahoo.com)

2-Department of plant biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran

3-Department of plant biology, Tarbiat Modares University, Tehran- Iran

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

5-Department of plant biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran

ارزیابی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی-آبی و

متانولی پوست نارنج

مهسا مایلی^۱، حسین تاجیک^۲، تورج مهدی‌زاده^{۳*}، فاطمه اسماعیلی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

واکنش‌های اکسیداسیون با تولید رادیکال‌های آزاد، سلامت انسان را به خطر می‌اندازد و باعث کاهش کیفیت حسی و تغذیه‌ای غذا می‌شوند. از این رو، تلاش‌هایی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و موثر گیاهی صورت گرفته است. در این مطالعه، ارزیابی میزان فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره اتانولی-آبی و متانولی مربوط به پوست میوه نارنج و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان مصنوعی بوتیل هیدروکسی تولوئن صورت گرفت. میزان ترکیبات فنلی به روش فولین سیوکالتو بررسی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سه آزمون قدرت احیاکنندگی، مهار DPPH و ABTS ارزیابی شد. محتوای فنلی برای عصاره اتانولی و متانولی به ترتیب 50.96 ± 0.51 و 59.38 ± 0.82 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره، اندازه‌گیری شد. در آزمون درصد بازدارندگی رادیکال آزاد، عصاره‌ها اثر مهارتی قابل توجهی نشان دادند؛ ولی در آزمون ABTS، اثر عصاره متانولی بیشتر از اتانولی بود. یافته‌ها نشان می‌دهد که هر دو نوع عصاره، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً مناسبی هستند؛ به همین علت، می‌توانند به عنوان یک منبع بالقوه طبیعی در صنایع غذایی و داروئی پیشنهاد شوند.

واژه‌های کلیدی: اکسیداسیون، پوست میوه، عصاره طبیعی، فنل کل

مقدمه

تغییرات اکسیداتیو در مواد غذایی از طریق ایجاد ترکیباتی باعث کاهش طعم، کیفیت حسی و تغذیه‌ای مواد غذایی می‌شوند (Akoh, 2017). همچنین واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند. این رادیکال‌ها آغازگر واکنش‌های اکسیداسیون هستند که به آسیب یا مرگ سلول‌ها منجر می‌شوند (Kulshreshtha et al., 2011).

۱- کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* (نویسنده مسئول: t.mehdizadeh@urmia.ac.ir)

ص این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی نگارنده اول، به راهنمایی اساتید دکتر حسین تاجیک و دکتر تورج مهدی‌زاده بوده و در دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

ترکیبات ROS و RNS (Reactive oxygen species and reactive nitrogen species) به ترتیب گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن هستند که روند اکسایشی را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند. این گونه‌ها دو نقش سمی و مفید ایفا می‌کنند؛ به این صورت که، در سطوح پایین یا متوسط اثرات مفیدی بر روی پاسخ‌های سلولی و عملکرد سیستم ایمنی بدن دارند و در غلظت‌های بالا، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (Weidinger & Kozlov., 2015). استرس اکسیداتیو نقش عمده‌ای در توسعه بیماری‌های مزمن و تحلیل برنده مانند سرطان، آرتروز، پیری، اختلالات خود ایمنی، قلبی-عروقی و بیماری‌های عصبی ایفا می‌کند (Pacher *et al.*, 2007).

بدن انسان دارای چندین مکانیسم برای مقابله با استرس اکسیداتیو است؛ برای نمونه، می‌توان به تولید آنتی‌اکسیدان در بدن به‌طور طبیعی و یا دریافت آن از طریق غذاها و مکمل‌ها اشاره کرد (Valko *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006). آنتی‌اکسیدان‌ها همچنین، برای جلوگیری از تغییرات اکسیداتیو، به مواد غذایی اضافه می‌شوند. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌هایی که در حال حاضر استفاده می‌شوند مصنوعی هستند؛ از جمله، بوتیل هیدروکسی آنیزول و بوتیل هیدروکسی تولوئن که مطالعات سمی بودن آنها را نشان داده است (Ako, 2017). این یافته‌ها، علاقه‌ی مصرف‌کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را تقویت کرده است. به همین علت، مصرف این گونه مواد غذایی طبیعی نزد مصرف‌کنندگانی که معتقد هستند این مواد سالم‌تر، کم‌خطرتر و ایمن‌تر از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی هستند، اهمیت ویژه‌ای دارد (Raikos, 2017).

در طول روند آنگیری مرکبات، هزاران تن محصول فرعی تولید می‌گردد که عمدتاً برای تغذیه حیوانات استفاده می‌شود. این محصولات، به دلیل دارا بودن محتوای بالایی از فیبر، می‌توانند یک منبع غنی از فیبر در رژیم غذایی باشند (Lario *et al.*, 2006; Mandalari *et al.*, 2004). از طرفی، محصول جانبی مرکبات نه تنها به خاطر محتوای فیبر آن، بلکه به دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌تواند قابل توجه باشد (Kang *et al.*, 2006; Zia-ur-Rehman, 2006). این محصولات، دارای فیبر و ویتامین بالا؛ همچنین شامل سایر ترکیبات فعال زیستی مرتبط از قبیل فلاونوئیدها و ترپن‌ها هستند که خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی اعمال می‌کنند (Lario *et al.*, 2004). امروزه، روش‌های زیادی جهت ارزیابی تأثیر این آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد؛ مانند مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاکنندگی، ظرفیت جذب رادیکال‌های اکسیژن، روش رنگ‌بری بتاکاروتن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و غیره. در هر یک از روش‌های ذکرشده، اساس واکنش و نوع سوبسترای اکسید شونده متفاوت است. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر است از روش‌هایی استفاده کرد که شامل مجموعه‌ای از روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی باشند.

نارنج (*Citrus aurantium*) معمولاً با عنوان sour orange, orange bitter یا Seville orange شناخته می‌شود. این گونه، به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال مختلف مانند ترکیبات فنولیک، فلاونوئید، اسانس و ویتامین برای اهداف دارویی استفاده می‌شود.

قسمت‌هایی که اکثراً مصرف دارویی دارد شامل پوست، شکوفه و برگ‌های این گیاه است (Moraes *et al.*, 2009; Rouseff & Perez-Cacho, 2007).

مطالعات متعددی در مورد خواص و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پوست نارنج انجام شده است؛ از جمله، ترابلسی و همکاران (Trabelsi *et al.*, 2014) نشان دادند که عصاره متانولی پوست نارنج بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با اسانس دارد. نتایج ادریری و همکاران (Ouedrhiri *et al.*, 2015) نیز نشان داد که اسانس پوست، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به برگ دارد. سارو و همکاران (Sarrou *et al.*, 2013) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پوست، شکوفه و برگ‌های نارنج را مورد بررسی قرار دادند. آزمون DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) اسانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب در برگ‌های کهنه، شکوفه‌ها، برگ‌های تازه و سپس در پوست بیشتر بوده است. لاگا-بنامروچه و مدنی (Lagha-Benamrouche & Madani, 2013) نیز نشان دادند که در میان برگ و پوست مربوط به ۷ واریته از پرتقال، نارنج بالاترین ظرفیت را برای کاهش میزان اکسیداسیون لینولئیک اسید و بتاکاروتن دارد (۷۷ درصد). همچنین، در این مطالعه نارنج بالاترین فعالیت آنتی‌رادیکالی را نشان داد. تفاوت در خصوصیات عملکردی عصاره‌های گیاهی، مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، به دنبال استفاده از روش‌های مختلف استخراج و نوع حلال‌های مورد استفاده توسط محققین زیادی گزارش شده است. از آنجا که هیچ تحقیقی در ارتباط با تفاوت در عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از پوست نارنج با حلال‌های مختلف وجود ندارد، در این تحقیق به این موضوع پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، پتاسیم فری‌سیانید، آهن III کلرید و کلیه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق، با خلوص بالا، از شرکت مرک آلمان تهیه شد. معرف فولین سیوکالتو، اسید گالیک، ۲،۲-آزینو بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید و پرسولفات پتاسیم نیز از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌ها

نارنج، پس از خریداری از بازار محلی آمل، توسط گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه از نظر جنس و گونه به تائید رسید. برای تهیه عصاره، پوست نارنج در سایه خشک و سپس با آسیاب به ذرات ریز تبدیل و از الک با اندازه ۶۰ مش گذرانده شد. سپس ۲۰۰ گرم پوست نارنج به یک لیتر حلال متانول برای عصاره متانولی، و اتانول و آب به نسبت ۷۰ به ۳۰ برای عصاره اتانولی-آبی افزوده شد و مخلوط حاصل بعد از مخلوط کردن به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر، از فیلتر با کاغذ صافی معمولی

عبور داده شد؛ سپس، در دستگاه روتاری تحت خلأ قرار گرفت. عصاره حاصل درون پلیت ریخته شد و پس از تبخیر حلال در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های مختلف با ۲۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر فولین سیوکالتو مخلوط و بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن‌ها افزوده شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در تاریکی، جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد (Ordoñez *et al.*, 2006).

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH

در این روش، توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره‌های مختلف، از روی میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش DPPH در متانول، سنجیده می‌شود. ۲ میلی‌لیتر DPPH به ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفت. میزان جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با متانول جایگزین شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با فرمول زیر محاسبه شد (Akowuah *et al.*, 2005):

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac-As)/Ac \times 100$$

در این فرمول، Ac: میزان جذب کنترل و As: میزان جذب نمونه است.

ارزیابی قدرت احیاکنندگی (Reducing Power)

برای این منظور، یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با یک میلی‌لیتر بافر فسفات و یک میلی‌لیتر فروسیانید پتاسیم مخلوط شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی: حجمی) به نمونه‌ها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از مایع رویی نمونه‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک کلراید اضافه نموده و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (Yildirim *et al.*, 2001a).

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS ((2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))

این آزمون با استفاده از روش روبرتا و همکاران با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا محلول‌های پایه، شامل ABTS (۷ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) تهیه شد؛ در ادامه، محلول اصلی ABTS به وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شد. این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت به منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. سپس محلول تهیه شده با اتانول تا رسیدن جذب به $0.7 (\pm 0.2)$ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. 0.2 میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و BHT به ۲ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی ABTS اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی نمونه از طریق رابطه زیر محاسبه و در نهایت به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید گزارش گردید (Re et al., 1999).

$$I = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

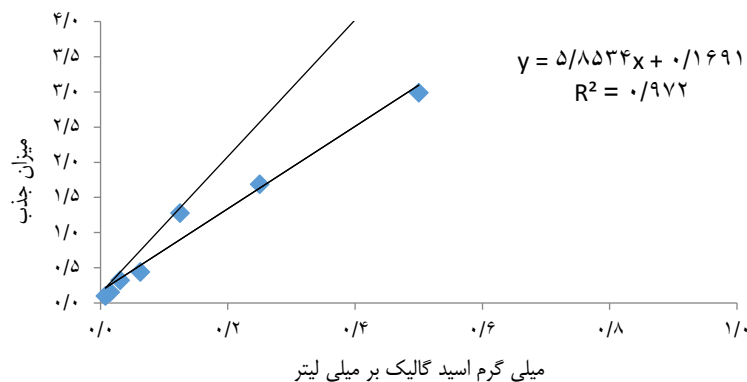
در این فرمول، A_{blank} میزان جذب نوری کنترل منفی و A_{sample} بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره است.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹، برای مقایسه معناداری میانگین‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه و تست دانکن، و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

جهت تعیین میزان فنل کل، منحنی استاندارد اسید گالیک رسم گردید (شکل شماره ۱). معادله حاصل از منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه محتوای فنل کل، به صورت $y = 5.7923x + 0.1696$ ($R^2 = 0.9816$) بود. بر اساس این معادله، محتوای فنل عصاره‌ها اندازه‌گیری شد.



شکل شماره ۱: منحنی استاندارد اسید گالیک

نتایج تعیین میزان فنل کل عصاره‌ها، به روش فولین سیوکالتو و رابطه آن با قدرت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در جدول شماره یک نشان داده شده است. نتایج آزمون اندازه‌گیری محتوای فنلی نشان می‌دهد که همبستگی معنا داری میان میزان ترکیبات فنلی کل و خواص آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. با توجه به جدول شماره یک عصاره اتانولی با بالاترین میزان ترکیبات فنلی دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره متانولی است. ترکیبات مشتق شده از گیاهان عمدتاً متابولیت‌های ثانویه هستند که اکثر آن‌ها فنل‌ها یا مشتقات فنل‌ها می‌باشند. این متابولیت‌ها اثرات مختلف از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Hayek *et al.*, 2013). میوه‌ها و سبزیجات غنی از متابولیت‌های ثانویه، مانند ترکیبات فنلی هستند که امروزه به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی طبیعی شناخته شده‌اند. علاوه بر این، ترکیبات فنلی دارای یک طیف گسترده از فعالیت‌های بیولوژیکی می‌باشند که از آن میان می‌توان به ضد جهش‌زایی، ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد آلرژی و همچنین توانایی تغییر بیان ژن اشاره کرد. ترکیبات فنلی نشان داده‌اند که دارای یک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس انتقال گروه‌های هیدروکسیل به رادیکال‌های آزاد هستند (Marinova *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2005). همان‌طور که گزارش شده است، یک رابطه معکوس بین مصرف رژیم غذایی غنی از آنتی‌اکسیدان و بروز تعدادی از بیماری‌ها در انسان وجود دارد (Zhang *et al.*, 2015; Rajendran *et al.*, 2014). در این بین، وجود حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج عصاره‌ها بر نوع ترکیبات موثره آن‌ها تاثیر گذار می‌باشد. از این رو، جهت استفاده کاربردی از عصاره‌های گیاهی بررسی این متغیر مهم می‌باشد.

از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی روش فولین سیوکالتو می‌باشد. اساس کار به این صورت است که ترکیبات فنلی، معرف فولین را در محیط قلیایی احیاء می‌کند و تشکیل کمپلکس ی‌آبی‌رنگ می‌دهد که حداکثر جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر می‌باشد (Nacz & Shahidi, 2004). در این مطالعه، مشخص شد که بین ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم و منطقی وجود دارد؛ طوری که، در مطالعات دیگر نیز این رابطه نشان داده شده است (Tawaha *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر، نشان داده می‌شود که میزان ترکیبات فنلی عصاره اتانولی-آبی به طور معنی داری بالاتر از عصاره متانولی می‌باشد. با توجه به اینکه اتانول نسبت به متانول سمیت چندانی ندارد، انتخاب بهتری برای استخراج عصاره‌های گیاهی خواهد بود.

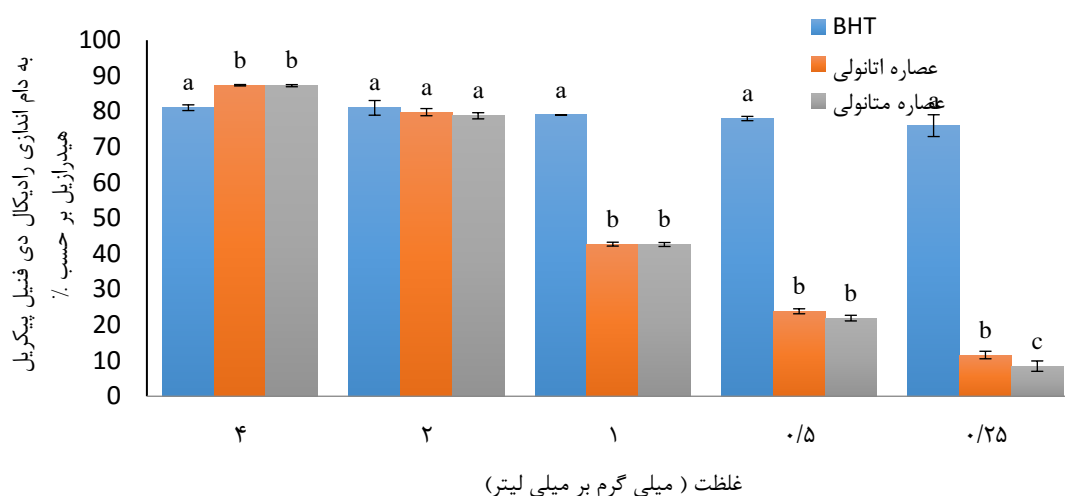
جدول ۱: مقایسه مقادیر فنل کل عصاره‌های متانولی و اتانولی نارنج و میزان همبستگی میان فنول کل و مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

سنجش آنتی‌اکسیدانی بروش DPPH		میلی گرم گالیک اسید / گرم عصاره	مقدار فنل کل عصاره اتانولی
R	مقدار (P)Sig		
۰/۸۴۳	۰/۰۳۶ **	^a ۵۹/۳۸ ± ۰/۸۲	مقدار فنل کل عصاره اتانولی
۰/۸۱۸	۰/۰۴۵ **	^b ۵۰/۹۶ ± ۰/۵۱	مقدار فنل کل عصاره متانولی

*حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0.05$) است که با آزمون واریانس یکطرفه و تست دانکن بدست آمده اند.
** همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

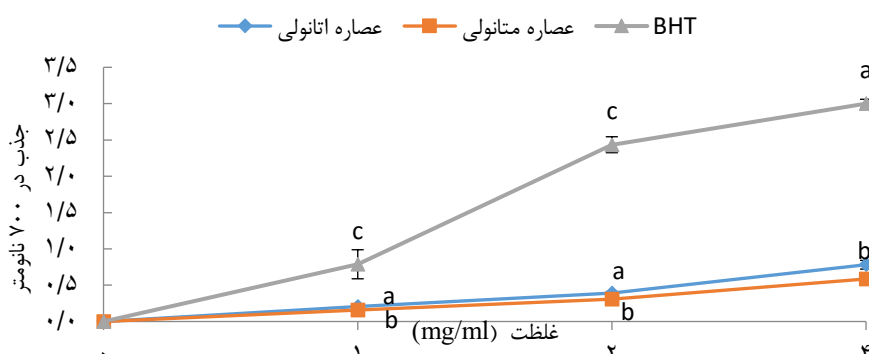
نتایج بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزایش مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره‌ها، وابسته به غلظت است. درحالی‌که این رابطه در نمونه شاهد صدق نمی‌کند و با افزایش غلظت، میزان توانایی جذب رادیکال‌های آزاد تفاوت چندانی نشان نمی‌دهد. همچنین بین عصاره‌ها به جز در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در جذب رادیکال‌های آزاد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p > 0.05$). عصاره‌ها بیشترین درصد بازدارندگی را در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهند. در غلظت‌های کمتر، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضدرادیکالی بالاتری نسبت به عصاره‌ها دارد، اما فعالیت ضدرادیکالی آن در غلظت‌های ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمتر از عصاره‌ها است. در آزمون بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش DPPH، توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲-و-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل به زرد روشن در متانول با روش اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار می‌گیرد (Burits & Bucar, 2000). تحقیقات مختلف گزارش کرده‌اند که مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به‌وسیله عصاره‌ها وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی بیشتر می‌شود (Kil et al., 2009; Manach et al., 2004; Shukla et al., 2009).

همچنین ارتباط نزدیکی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی عصاره‌ی به دست‌آمده از منابع مختلف طبیعی توسط بسیاری از محققان نشان داده شده است (Liu et al., 2007; Verzelloni et al., 2007). در تحقیق حاضر نیز این مورد به اثبات رسید و بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی همبستگی معنی‌داری وجود داشت. این امر، نشان‌دهنده تاثیر مستقیم ترکیبات فنولی در بروز قدرت آنتی‌اکسیدانی است. قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی را می‌توان به دلیل نقش مهم آن‌ها در جذب سطحی و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و خارج کردن اکسیژن یگانه از واکنش نسبت داد (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). همچنین گزارش شده است که حلال مورد استفاده در استخراج عصاره ممکن است در فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به محتوای فنلی دخیل باشد (Liu et al., 2007).



شکل ۲: میزان به دام اندازی رادیکال DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p \leq 0.05$).

نتایج تعیین قدرت احیاکنندگی عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT در شکل شماره سه نشان داده شده است. نتایج قدرت احیاکنندگی نشان می‌دهد که قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. در تمامی غلظت‌ها، قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیشتر از عصاره‌ها است و قدرت احیاکنندگی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره متانولی است. در آزمون قدرت احیاکنندگی، توانایی عصاره‌ها برای احیاء Fe^{3+} یا فری سیانید و تبدیل آن به Fe^{2+} یا فرس سنجیده می‌شود؛ به این صورت که، عوامل احیاکننده عصاره‌ها منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فرس می‌گردند. بسته به ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌ها، محلول زرد آزمایش به درجات مختلفی از رنگ سبز و آبی تبدیل می‌شود (Soares *et al.*, 2009). در مطالعه حاضر، ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها و مقدار توتال فنل آن‌ها وجود دارد؛ بنابراین، عصاره اتانولی با بیشترین میزان ترکیبات فنلی قدرت احیاکنندگی بیشتری نسبت به عصاره متانولی نشان می‌دهد. گزارش گا و کاویاراسانا نیز نتایج این تحقیق را تایید می‌کند (Ga & Kaviyarasana, 2011).



شکل ۳: میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌های نارنج در مقایسه با BHT. حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p \leq 0.05$).

نتایج ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS، برحسب درصد بازدارندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید، در جدول شماره ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که در تمامی غلظت‌ها درصد بازدارندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT از دو عصاره‌ی دیگر بیشتر است و بین آنها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq 0.05$). همچنین در تمامی غلظت‌ها به‌جز غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درصد بازدارندگی عصاره متانولی از عصاره اتانولی-آبی بیشتر است. همچنین درصد بازدارندگی رادیکال ABTS عصاره اتانولی به‌جز در غلظت ۰/۲۵، با افزایش غلظت افزایش می‌یابد ولی در عصاره متانولی از غلظت ۰/۲۵ تا ۴ با افزایش غلظت، درصد بازدارندگی افزایش می‌یابد درحالی‌که در آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تفاوت معنی‌داری در افزایش درصد بازدارندگی با افزایش غلظت مشاهده نمی‌شود. ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS، یکی از روش‌های مشهور تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب، محلول در چربی یا مواد ناخالص و عصاره‌های گیاهی است (Gliszczynska-Swigło, 2006).

این روش، بر اساس جذب رادیکال نسبتاً پایدار سبز آبی ABTS و تبدیل آن به یک محصول بی‌رنگ می‌باشد. شدت کاهش رنگ، نشان‌دهنده‌ی مقدار رادیکال ABTS است که به‌وسیله آنتی‌اکسیدان مهار شده است و میزان آن با دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه‌گیری می‌شود (Schaich *et al.*, 2015). این آزمون، برخلاف آزمون DPPH، نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی بیشتر از اتانولی-آبی است. تفاوت بین دو نتیجه را می‌توان با مکانیسم واکنش‌های درگیر توضیح داد؛ به این صورت که، واکنش رادیکال‌های ABTS شامل انتقال الکترون است و بسیار سریع‌تر از واکنش رادیکال DPPH انجام می‌شود که میزان بی‌رنگ شدن آن به توانایی دادن الکترون ترکیبات آزمون نسبت داده می‌شود (Naik *et al.*, 2006). از طرف دیگر قدرت کمتر اتانول در مقایسه با متانول را می‌توان به وجود رادیکال‌های اتیل در اتانول نسبت داد که طولانی‌تر از رادیکال‌های متیل در متانول بوده و باعث کاهش حلالیت مولکول‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود (Boeing *et al.*, 2014).

نتایج تحقیقات بنداود و همکاران (Bendaoud *et al.*, 2009)، همچنین ارکان و همکاران (Erkan *et al.*, 2008) با نتایج مطالعه حاضر منطبق است. مطالعات اخیر نشان داده است که محصولات جانبی صنایع آبرگیری مرکبات، منبعی از ترکیبات زیست فعال هستند زیرا پوست مرکبات منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس و ترکیبات فنلی است (Khan *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011).

جدول ۲: درصد بازدارندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید در غلظت‌های مختلف عصاره‌های نارنج و BHT

درصد بازدارندگی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک اسید (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
aA ۱۹/۲۸±۹/۱۱	aA ۰/۰۲±۰/۰۱	اتانولی
aA ۱۸/۸۷±۰/۲۱	aA ۰/۰۲±۰/۰۱	متانولی ۰/۲۵
bA ۹۳/۵۳±۲/۴۷	bA ۰/۱۹±۰/۰۲	BHT
aA ۲۵/۴۸±۰/۹۶	aA ۰/۰۳±۰/۰۱	اتانولی
bB ۴۱/۴۰±۱/۰۱	bB ۰/۰۷±۰/۰۱	متانولی ۰/۵
cA ۹۴/۶۶±۶/۳۹	cA ۰/۱۹±۰/۰۱	BHT
aB ۴۲/۰۸±۰/۱۱	aB ۰/۰۷±۰/۰۱	اتانولی
bC ۵۸/۵۹±۶/۸۵	bC ۰/۱۱±۰/۰۱	متانولی
cA ۹۵/۷۳±۵/۴۵	cA ۰/۱۹±۰/۰۲	BHT
aC ۵۸/۶۷±۶/۱۳	aC ۰/۱۱±۰/۰۱	اتانولی
bD ۸۴/۴۷±۴/۲۱	bD ۰/۱۷±۰/۰۳	متانولی ۲
cA ۹۸/۹۳±۲/۳۲	cA ۰/۲۰±۰/۰۲	BHT
aD ۹۵/۴۳±۰/۲۱	aD ۰/۱۹±۰/۰۲	اتانولی
aE ۹۸/۰۲±۲/۱	aE ۰/۲۰±۰/۰۳	متانولی ۴
aA ۱۰۰/۰±۰/۱	aA ۰/۲۰±۰/۰۴	BHT

در هرستون حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ برای عصاره‌های مختلف در غلظت یکسان می‌باشد. حروف بزرگ غیرمشابه نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های پوست نارنج به دلیل حضور پلی‌فنل‌هایی باشد که ممکن است با روشی شبیه ترکیبات احیاکننده عمل نماید؛ به این صورت که، با دادن الکترون و واکنش با الکترون‌های آزاد، آن‌ها را به ترکیباتی باثبات‌تر تبدیل نماید که خاتمه‌دهنده واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد باشد (Singh *et al.*, 2002). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، می‌توانند جدا شوند و به عنوان مکمل‌های غذایی برای به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی ناشی از اکسیداسیون استفاده شوند. به همین دلیل، تحقیق در مورد گیاهان مختلف غنی از آنتی‌اکسیدان از جنبه‌های مختلف، مهم است (Yildirim *et al.*, 2001b).

نتیجه‌گیری کلی

فرآوری محصولات کشاورزی منجر به تولید محصولات جانبی می‌شود که در برخی موارد حاوی ترکیبات فعال زیستی مانند پلی‌فنل‌ها هستند و دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، عصاره‌های پوست نارنج دارای سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است. در همه‌ی آزمون‌ها به جزء عصاره اتانولی با اختلاف کمی از عصاره متانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد. از طرفی، با انتخاب صحیح روش و حلال مناسب جهت

جداسازی ترکیبات موثره گیاهی، می‌توان به نحو مطلوب تری جهت استفاده در کاربردهای گوناگون از محصولات جانبی گیاهان و میوه‌ها بهره جست. این مطالعه، اولین گام در شناسایی و مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و متانولی پوست نارنج بوده است و می‌تواند با تحقیقات بیشتر، بر روی شناسایی ترکیبات و مولکول‌های موثر آن، کامل تر شده، به بررسی و تایید این اثرات در محیط *in vivo* منجر شود. همچنین لازم است تحقیقات بیشتر با استفاده از حلال‌های دیگر مانند اتیل استات، کلروفرم و ترکیب نسبت‌های مختلف با همدیگر و با کمک روش‌های جدیدتر عصاره‌گیری مانند مایکروویو، اولتراسوند و سیال فوق بحرانی صورت گیرد. در نتیجه با تحقیقات بیشتر، این عصاره‌ها می‌توانند به‌عنوان یک منبع غنی، در دسترس و بالقوه، از ترکیبات زیست‌فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع غذایی و داروئی بکار روند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود وظیفه می‌دانند که از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه که با حمایت مادی و معنوی خود در اجرای این تحقیق همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

- Akoh, C.C. (2017). Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd edn. CRC Press. 322 Pp. London.
- Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I. and Sadikun, A. (2005) The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 93: 311-317.
- Bendaoud, H., Bouajila, J., Rhouma, A., Savagnac, A. and Romdhane, M. (2009) GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 1292-1297.
- Boeing, J.S., Barizão, É.O., E Silva, B.C., Montanher, P.F., de Cinque Almeida, V. and Visentainer, J.V. (2014) Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8: 1-9.
- Burits, M. and Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14: 323-328.
- Chatterjee, M., Saluja, R., Kanneganti, S., Chinta, S. and Dikshit, M. (2006) Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 53: 84-93.
- Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76-82.
- Ga, J. and Kaviyarasana, V. (2011) Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. *Journal of Pharmacy Research*, 4: 3939-3942.

- Gliszczynska-Świągło, A. (2006) Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 96: 131-136.
- Hayek, S.A., Gyawali, R. and Ibrahim, S.A. (2013) Antimicrobial natural products. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*. 2: 91.
- He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G., Chen, B. and Yao, S. (2011) Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food chemistry*, 127: 880-885.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A. and Rahman, Z.A. (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip Fatimah (*Labisia pumila* Blume). *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 5238-5254.
- Kang, H., Chawla, S., JO, C., Kwon, J. and Byun, M. (2006) Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology*, 97: 614-620.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O. and Chemat, F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119: 851-858.
- Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.-M., Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D. and Lee, D. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*, 115: 1234-1239.
- Kulshreshtha, M., Goswami, M., Rao, C., Ashwlayan, V. and Yadav, S. (2011) Estimation of antioxidant potential of aqueous extract of *Ficus bengalensis* leaf on gastric ulcer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9: 122-6.
- Lagha-Benamrouche, S. and Madani, K. (2013) Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50: 723-730.
- Lario, Y., Sendra, E., Garcá, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J. and Pérez-Alvarez, J. (2004) Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 113-117.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., LV, X. and Yan, G. (2007) Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food chemistry*, 105: 548-554.
- Manach, C., scalbert, A., morand, C., rémésy, C. and jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R.B., Faulds, C.B. and Waldron, K.W. (2006) Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 197-203.
- Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40: 255-260.
- Moraes, T.M., Kushima, H., Moleiro, F.C., Santos, R.C., Rocha, L.R.M., Marques, M.O., Vilegas, W. and Hiruma-Lima, C.A. (2009) Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 180: 499-505.
- Naczki, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.

- Naik, G., Priyadarsini, K. and Mohan, H. (2006) Free radical scavenging reactions and phytochemical analysis of triphala, an ayurvedic formulation. *Current Science*, 90: 1100-5.
- Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. and Lsla, M.I. (2006) Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97: 452-458.
- Ouedrhiri, W., Bouhdid, S., Balouiri, M., Lalami, A., Moja, S., Chahdi, F. and Greche, H. (2015) Chemical composition of *Citrus aurantium L.* leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7: 78-84.
- Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87: 315-424.
- Raikos, V. (2017) Natural antioxidants for food applications: challenges and recent developments. *EC Nutrition*, 8: 33-34.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasiah, U. and Nishigaki, I. (2014) Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 436: 332-347.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-7.
- Rouseff, R. and Perez-Cacho, P.R. (2007) *Citrus flavour*. *Flavours and Fragrances*. 1st edn. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 117-134.
- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K. and Therios, I. (2013) Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium L.* growing in Greece. *Molecules*, 18: 10639-10647.
- Schaich, K.M., Tian, X. and Xie, J. (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14: 111-125.
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820-897.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K. and Shukla, S. (2009) In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2338-2343.
- Singh, R., Chidambara Murthy, K. and Jayaprakasha, G. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 81-86.
- Soares, A.A., De Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Da Costa, S.M.G. and Peralta, R.M. (2009) Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food chemistry*, 112: 775-781.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104: 1372-1378.
- Trabelsi, D., Ammar, A., Bouabdallah, F. and Zagrouba, F. (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and methanolic extracts of Tunisian *Citrus aurantium L.* *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8: 18-27.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40.

-
- Verzelloni, E., Tagliacruzchi, D. and Conte, A. (2007) Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 105: 564-571.
- Weidinger, A. and Kozlov, A.V. (2015) Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5: 472-484.
- Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. (2001a) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4083-4089.
- Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. (2001b) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4083-4089.
- Zhang, Y.J., Gan, R.Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A.N., Xu, D.P. and Li, H.B. (2015) Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*, 20: 21138-21156.
- Zia-ur-Rehman (2006) Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99: 450-454.

and antioxidant activity of sour orange (*Citrus aurantium*) hydroethanolic and methanolic peel extract

M. Mayeli¹, H. Tajik², T. Mehdizadeh^{3*}, F. Esmaeli¹

Received:2017.5.2

Accepted:2018.4.29

Abstract

Oxidation reactions endanger human health due to the production of free radicals. Additionally, by creating some compounds, reduce sensory and nutritional quality of food. Recently, more and more efforts are been made to find natural and effective herbal antioxidants. In this study, total phenolic and antioxidant activity of sour orange (*Citrus aurantium*) hydroethanolic and methanolic peel extract in compare with Butylated hydroxytoluene (BHT) as a standard antioxidant examined. Total phenolic content of hydro-ethanolic and methanolic peel extract was 59.38 ± 0.82 and 50.96 ± 0.51 mg Gallic acid/g extract, respectively. In testing percent of inhibition of free radicals (DPPH and ABTS), the extracts showed a significant inhibitory effect but there is a significant difference, between hydro-ethanolic and methanolic extract in ABTS test. Both extract also showed reducing effect. Our findings showed that orange peel extract had relatively good antioxidant activity in compare to standard antioxidant (BHT), so it has proposed as a potential source of natural antioxidants in food and pharmaceutical industries.

Keyword: Fruit peel, Natural extract, Oxidation, Total phenol

1- MSc in Food hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2-Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia, Iran

3-Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia, Iran

*(Corresponding Author: t.mehdizadeh@urmia.ac.ir)

جداسازی و شناسایی میکسوباکتر تولیدکننده Althiomycin و Myxothiazol از خاک

ایران

اعظم مرادی^۱، محمد یعقوبی اوینی^۱، غلامحسین ابراهیمی پور^{۱*}، علیرضا قاسم پور^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

میکسوباکترها در دسته باکتری‌های خاک قرار می‌گیرند که حرکت لغزشی دارند و اجسام زایشی ایجاد می‌کنند. جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ از خاک منطقه کوه‌رنگ چهارمحال و بختیاری جداسازی شد و فعالیت زیستی آن علیه پاتوژن‌های مختلف انسانی به روش رقت‌سازی در میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. جدایه ۱۱۸، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه باکتری‌های شاخص *E. coli* و *M. luteus* نشان داد و از این رو، مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی 16S rDNA باکتری نشان داد که این جدایه به گونه *M. fulvus* تعلق دارد. به علاوه، درخت فیلوژنی رابطه خویشاوندی این جدایه را با گونه *M. fulvus* تأیید کرد. به منظور بررسی فعالیت زیستی باکتری، استخراج حلالی محیط کشت انجام و عصاره متانولی حاصل به وسیله HPLC فراکسیون‌گیری و علیه پاتوژن‌های حساس تست شد. آنالیز طیف سنجی جرمی نشان دهنده حضور یون مولکولی آنتی‌بیوتیک‌های آلتیومایسین و میکسوتیازول در عصاره متانولی محیط کشت این جدایه بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، درخت فیلوژنی، طیف سنجی جرمی، فعالیت زیستی

مقدمه

در فرایند جستجو برای یافتن ترکیبات طبیعی مفید، غربالگری میکروارگانیسم‌هایی که تاکنون کمتر مطالعه شده‌اند، امکان یافتن متابولیت‌های جدید را افزایش می‌دهد. گزارشاتی موجود است که نشان می‌دهد میکسوباکترها تولیدکنندگان توانمند انواع زیادی از متابولیت‌های ثانویه زیست فعال ضدباکتریایی و ضدقارچی هستند (Weissman & Müller, 2010). تا امروز در حدود ۱۰۰ ساختار پایه و ۵۰۰ مشتق از میکسوباکترها توصیف شده است که بسیاری از آنها به طور خاص توسط این گروه میکروبی تولید می‌شوند (Weissman & Müller, 2010). این میکروارگانیسم‌ها منابع خوبی برای ترکیبات جدید هستند، اما در غربالگری‌های دارویی به خوبی مطالعه نشده‌اند؛ زیرا، جداسازی آنها فرایندی طولانی و خالص‌سازی و نگهداری آنها دشوار است. همچنین،

۱- گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: g-ebrahimi@sbu.ac.ir

۲- پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

سویه‌هایی که به تازگی جداسازی می‌شوند، باید چندین بار به محیط‌های مایع مناسب انتقال داده شوند تا یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت حاصل شود.

اگرچه این روش تنها روش موجود است، برخی سویه‌ها همچنان به صورت پوسته، کلاف و گلوله‌های غضروف مانند رشد می‌کنند (Reichenbach & Höfle, 1999) میکسوباکترها به شکل میله‌های گرم منفی هستند که نسبتاً دارای رشد کندی هستند و چرخه زندگی پیچیده‌ای دارند (Shimkets *et al.*, 2006). آنها از خاک، مدفوع گیاه‌خواران، مواد گیاهی در حال فساد و پوست درختان زنده و مرده جداسازی شده‌اند. چندین جنبه از مراحل جداسازی آنها منحصر به این گروه از باکتری‌هاست:

۱- حرکت به روش لغزیدن (Gliding) و رفتار اجتماعی: میکسوباکترها روی سطح آگار می‌لغزند و بیوفیلم شفاف، نازک و پیچیده‌ای ایجاد می‌کنند و با حرکات هماهنگ شده به واسطه سیگنال‌های بین سلولی به سمت مواد جذب‌کننده، مانند مدفوع خرگوش، حرکت می‌کنند (Dworkin, 1996).

۲- افتراق به میکسوسپورهای مقاومی که درون اجسام زایشی (Fruiting body) ایجاد می‌شوند. اجسام زایشی در هر گونه دارای شکل، رنگ و قوام خاصی است که یکی از ملاک‌های مهم شناسایی آنها می‌باشد (Shimkets *et al.*, 2006).

۳- شکار انواع باکتری و مخمر که هضم آنها با استفاده از آنزیم‌های لیزکننده خارج سلولی متنوع و آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌شود.

۴- بعضی از میکسوباکترها قادر به تجزیه سلولز هستند (Shimkets *et al.*, 2006).

میکسوباکترها به‌طور معمول در خاک‌های خنثی یا کمی قلیایی یافت می‌شوند. آنها از نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنگل‌های بارانی گرمسیری و از تندراهای قطبی، استپ‌ها، بیابان‌ها و باتلاق‌ها در سطح دریا و از ارتفاعات بالا جداسازی می‌شوند. با وجود این، دیده شده است که مناطق گرم و دارای فصول خشک از نظر تنوع میکسوباکترها غنی‌تر هستند (Dawid, 2000). ایران به لحاظ دارا بودن اقلیم زمستان گرم و مرطوب و تابستان خشک استپی مکان مناسبی برای میکسوباکترها به نظر می‌رسد، زیرا میکسوسپورها قادر به تحمل خشکی و دمای بالا هستند. در واقع، مطالعه انجام شده توسط داوید (Dawid, 2000) نشان دهنده میانگین بسیار بالای تعداد گونه‌ها بر نمونه خاک در ایران است؛ همچنین، این مطالعه نشان می‌دهد که طیف گونه‌ها در ایران بسیار گسترده است.

هدف از انجام نوشتار حاضر که اولین مورد از این گونه مطالعات در ایران است، بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه زیست

فعال در میکسوباکترهای بومی ایران است.

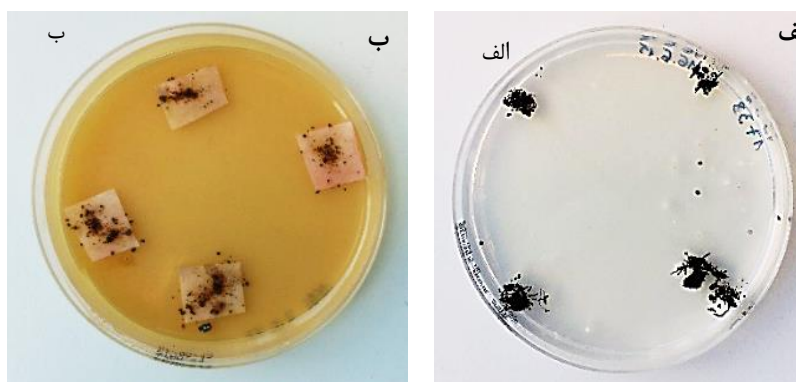
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

جدایه میکسوباکتر مورد بررسی از نمونه خاک تونل اول زاینده‌رود، واقع در شهرستان کوهرنگ استان چهارمحال و بختیاری، جداسازی شد. این نمونه در اواخر فصل بهار سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد.

جداسازی

کاهش آلودگی‌های قارچی، با خشک کردن کامل نمونه جمع‌آوری شده در تاریکی و در معرض هوا انجام گرفت. دو روش برای جداسازی میکسوباکترها از نمونه استفاده گردید. در روش اول، محیط کشت WAT آگار (Shimkets *et al.*, 2006) دارای سیکلوهگزامید ($100 \mu\text{g/ml}$) تهیه و باکتری *E. coli* به صورت متقاطع در وسط آن کشت داده شد. سپس یک نخود از نمونه کاملاً خشک شده به هر چهار انتهای خطوط کشت *E. coli* منتقل (شکل ۱ الف) و پلیت در دمای 30°C به مدت یک هفته گرماگذاری شد. سپس تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر زیر لوپ دوچشمی Olympus SZX12 مورد بررسی قرار گرفت. در روش دوم، محیط ST21 آگار (Shimkets *et al.*, 2006) دارای سیکلوهگزامید ($100 \mu\text{g/ml}$) تهیه و سلولز به عنوان منبع کربن به صورت چهار عدد کاغذ فیلتر استریل در ابعاد تقریباً 2×2 سانتی‌متر در چهار طرف پلیت قرار گرفت (شکل ۱ ب). به اندازه یک نخود از نمونه به مرکز کاغذهای فیلتر منتقل و پلیت به مدت یک هفته در دمای 30°C گرماگذاری و سپس تشکیل جسم زایشی و خزش میکسوباکتر بررسی شد.



شکل ۱: جداسازی میکسوباکتر جدایه ۱۱۸ در الف) محیط WAT آگار با کشت متقاطع *E. coli* و ب) ST21 آگار با کاغذ فیلتر

خالص‌سازی

خالص‌سازی در ابتدا با انتقال مستقیم رأس جسم زایشی جوان به محیط VY/2 آگار (Shimkets *et al.*, 2006) به وسیله سرنگ انسولین انجام شد و این انتقال چندین مرتبه صورت گرفت. سپس جسم زایشی از این محیط به چهار رأس کشت متقاطع *E. coli* زنده روی محیط WAT آگار انتقال یافت. این انتقال تا خالص‌سازی کامل چندین مرتبه تکرار گردید

نگهداری بلند مدت

جدایه در محیط کشت مایع Myxoviresin (Shimkets *et al.*, 2006) و به مدت ۱۲-۱۰ روز در ۱۶۰ rpm و ۳۰ °C کشت داده و از کشت مایع به دست آمده برای نگهداری بلند مدت در فریزر ۸۰ °C- استفاده شد.

شناسایی ورده بندی

مورفولوژی اجسام زایشی با استفاده از لوپ دوچشمی Olympus SZX12 و سلول‌های رویشی و میکسوسپورها با استفاده از میکروسکوپ بررسی شد. شناسایی مورفولوژیک بر اساس کلید شناسایی رایشناخ و دورکین انجام گرفت. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری با آزمون API ZYM[®] برای بررسی ۱۹ واکنش آنزیمی و تعیین پروفایل آنزیمی باکتری صورت گرفت. دمای بهینه رشد باکتری با کشت روی پلیت VY/2 آگار در سه دمای ۲۲، ۳۰ و ۴۴ °C تنظیم شد؛ گرماگذاری به مدت حداقل یک هفته انجام گرفت و مقایسه قطر رشد باکتری در سه دما صورت پذیرفت. برای تعیین pH بهینه، محیط VY/2 آگار با pH های پنج، شش، هفت، هشت و نه تهیه و جدایه روی آنها منتقل شد. گرماگذاری در دمای ۳۰ °C به مدت حداقل یک هفته انجام گرفت. سپس قطر رشد باکتری در پنج pH اندازه گیری و بهترین pH رشد تعیین گردید. ۱۳ پلیت VY/2 آگار حاوی ۱۳ نوع آنتی بیوتیک با غلظت ذکر شده در جدول ۱ برای تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری استفاده

جدول ۱: آنتی بیوتیک‌های استفاده شده در شناسایی و غلظت آنها

غلظت نهایی	آنتی بیوتیک
۵۰ µg/ml	پلی میسن ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	جنتامیسین ۱۰ mg/ml
۱۰ µg/ml	اکسی تتراسایکلین ۱۰ mg/ml
۱۰۰ µg/ml	آمپی سیلین ۱۰ mg/ml
۳۰ µg/ml	کلرامفنیکل ۹ mg/ml
۵۰ µg/ml	اسپکترومایسین ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	کانامایسین ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	سفالوسپورین ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	فوزیدیک اسید ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	باسیتراسین ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	تیواسترپتون ۱۰ mg/ml
۵۰ µg/ml	تری متوپریم ۱۰ mg/ml
۱۵۰ µg/ml	هیگرومایسین ۱۰ mg/ml

شد. باکتری به این پلیت‌های آنتی بیوتیک انتقال یافت و حداقل به مدت یک هفته در ۳۰ °C گرماگذاری شد. بعد از این مدت، رشد یا عدم رشد باکتری در حضور آنتی بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲: سیکل دمایی PCR

مرحله	زمان (min)	دما (°C)
واسرشت اولیه	۵	۹۵
۳۴ چرخه واسرشت	۰/۵	۹۴
اتصال پرایمر	۰/۵	۵۲
طویل سازی	۲	۷۲
طویل سازی نهایی	۱۰	۷۲

به منظور بررسی فیلوژنتیکی جدایه، استخراج DNA طبق پروتکل استاندارد باکتری‌های گرم منفی و با استفاده از کیت Invisorb Spin Plant Mini (Invitek, Germany) انجام گرفت. DNA جداسازی شده با واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال F27 و R1525 و برنامه دمایی جدول ۲ تکثیر یافت. در مرحله بعد محصول PCR با استفاده از کیت NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) خالص و توالی‌یابی با همان پرایمرها انجام شد. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SeqMan II نسخه شش به هم متصل شدند تا توالی کامل ژن حاصل شود؛ سپس، این توالی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی EzBioCloud مقایسه گردید. درخت فیلوژنی جدایه مورد مطالعه به وسیله نرم‌افزار MEGA نسخه شش به روش حداکثر شباهت (Maximum likelihood method) با ۱۰۰ بار همانندسازی و در مقایسه با توالی سویه‌های شاخص گونه‌های مختلف میکسوباکترها رسم شد. از *Hymenobacter kanoulensis* T-3 که یک غیرمیکسوباکتر حرکت‌کننده به روش خزش است، به عنوان خارج از گروه برای رسم درخت فیلوژنتیک استفاده شد.

غربالگری فعالیت ضد میکروبی

یک پیش‌کشت از جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ در محیط Myxoviresin تهیه و ۱۰ mL از آن به محیط کشت Myxoviresin حاوی دو درصد رزین XAD4 (Sigma, USA) تلقیح و به مدت ۱۲ روز در ۱۶۰ rpm و ۳۰ °C رشد داده شد. سپس رزین و توده‌های میکسوباکتر از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با آب دیونیزه، با ۷۰ mL استون استخراج گردید. عصاره استونی در ۴۰ °C با روتاری (Heidolph, Germany) خشک و ۱ mL متانول به آن اضافه شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره متانولی جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ با استفاده از روش رقت‌سازی در میکروپلیت ۹۶ چاهکی (Wiegand et al, 2008) علیه میکروارگانیسم‌های شاخص شامل *Escherichia coli* TolC، *Escherichia coli* (DSM 116)، *Staphylococcus aureus* (Newman)، *Candida albicans* (DSM 1665)، *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 19882)، *Bacillus subtilis* (DSM 10s)، *Micrococcus luteus* (DSM 1790)، *Chromobacterium violaceum* (DSM 30191) و *Pichia anomala* (DSM 10s) تعیین شد.

(DSM6766)، *Mycobacterium smegmatis* (ATCC700084) و *Mucor himalis* (DSM2656) از گروه کلکسیون سوپه میکروبی (MISG) مرکز هلم هولتز (HZI) در برانشوايگ آلمان مورد مطالعه قرار گرفت. از محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) برای باکتری‌های شاخص و محیط کشت MYC (Cazin et al., 1989) برای مخمر و قارچ شاخص استفاده شد. کدورت باکتری‌های آزمون در محیط کشت MHB ۰/۰۵ مک فارلند و کدورت قارچ و مخمرهای آزمون در محیط کشت MYC ۰/۰۱ مک فارلند بود. در صورتی که عصاره در رقت‌های بیشتر از یک هشتم روی هر کدام از میکروارگانیس‌ها ایجاد بازدارندگی می‌کرد، با HPLC و طیف سنجی جرمی مورد بررسی قرار می‌گرفت.

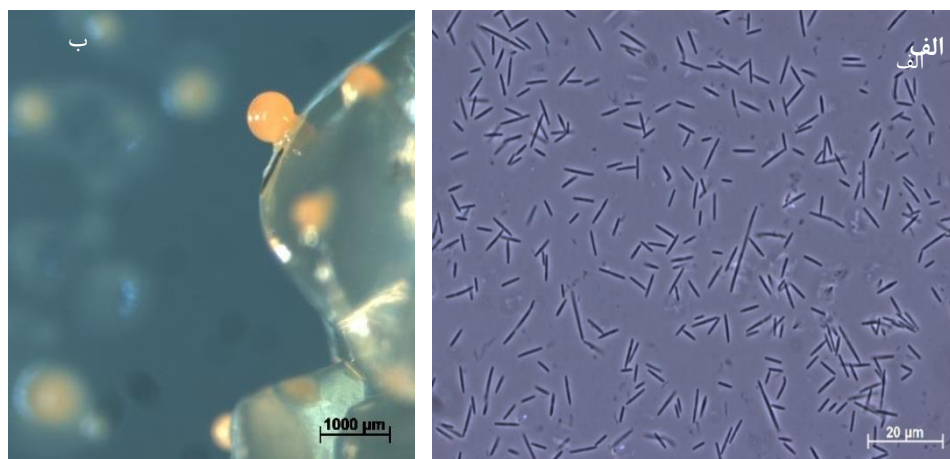
شناسایی متابولیت

عصاره متانولی به صورت اتوماتیک و در حجم پنج مایکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد. HPLC با دستگاه Agilent 1100 مجهز به ستون X-Bridge (Waters, Milford, USA) با ذرات $3/5 \mu\text{m}$ و ابعاد $2/1 \times 100 \text{ mm}$ و مجهز به یک آشکارساز DAD (۲۰۰-۴۰۰ nm)، با سیستم حلالی A شامل بافر آمونیوم استات ۰/۰۵ میلی‌مولار pH=۵ و B شامل استونیتریل و بافر آمونیوم استات ۰/۰۵ میلی‌مولار در شدت جریان ۰/۳ mL/min انجام یافت. فرکسیون‌گیری به روش برش زمانی هر ۳۰ ثانیه به صورت خودکار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای صورت گرفت. فراکسیون‌ها با دستگاه MiniVap (Porvair Sciences, UK) در جریان نیتروژن 40°C خشک و چاهک‌های پلیت با ۱۵۰ مایکرولیتر میکروارگانیس‌م شاخص حساس به این عصاره تلقیح شد. سپس از عصاره متانولی برای انجام LC/MS استفاده شد که شامل یک سیستم HPLC، Agilent 1200 مجهز به آشکارساز DAD (۲۰۰-۶۰۰ nm) در اتصال به یک اسپکترومتر جرمی maXis UHR-TOF (Bruker Daltonics, USA) بود. عصاره به وسیله یک ستون ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Milford, USA)، در ابعاد $2/1 \times 50 \text{ mm}$ و با ذرات $1/7 \mu\text{m}$ آنالیز گردید. شرایط کروماتوگرافی برای انجام LC/MS به این صورت بود: دمای محفظه ستون 40°C ، شدت جریان ۰/۶، حلال A (۰/۱ درصد فرمیک اسید)، حلال B (استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید)، شیب غلظت ۵ درصد B در دقیقه ۰/۵ تا ۹۵ درصد B در دقیقه ۱۰ و ثابت در ۹۵ درصد B تا دقیقه ۱۹/۵. یون‌سازی به روش ESI در حالت مثبت انجام شد و نتایج با نرم‌افزار Bruker Compass Data Analysis 4.2 مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات فعال بر اساس مقایسه نتایج LC/MS، طیف UV و زمان بازدارندگی در HPLC با پایگاه داده‌های Myxobase (HZI, Germany) شناسایی شدند.

نتایج و بحث

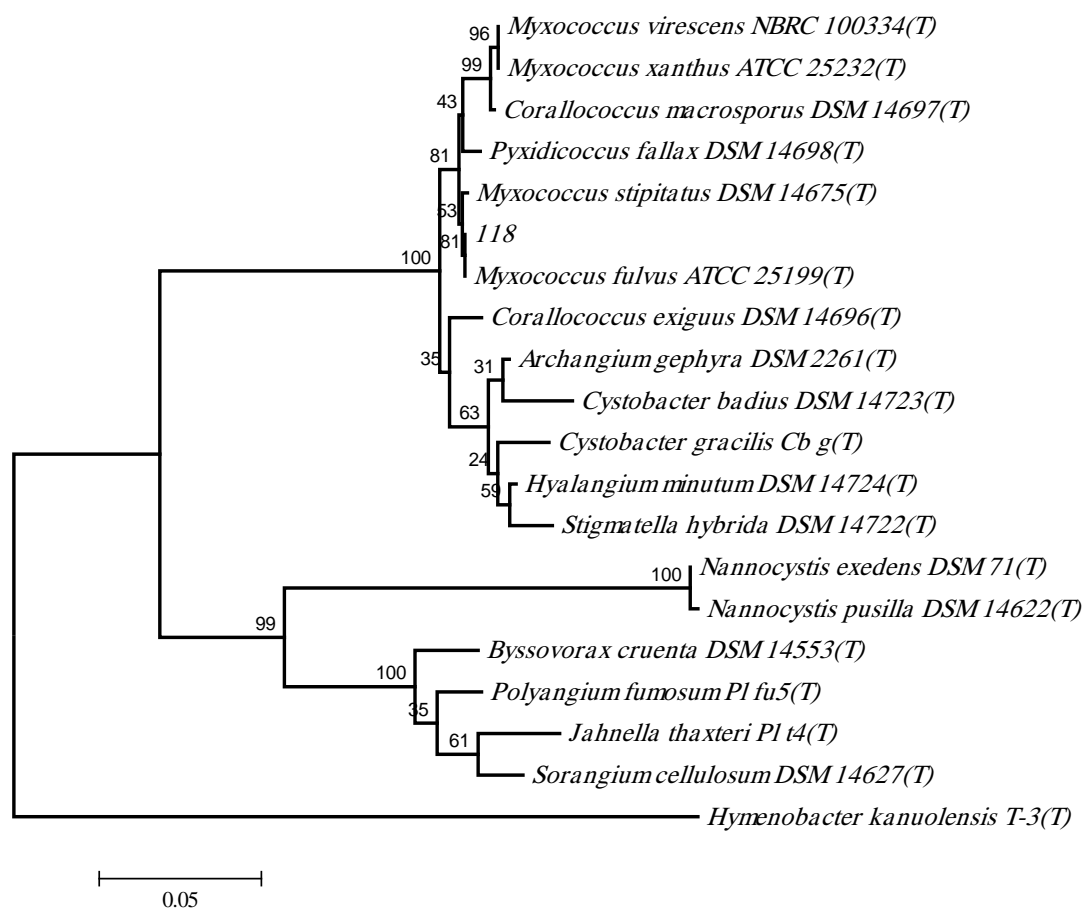
جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه ۱۱۸

جدایه ۱۱۸ از خاک به روش طعمه‌گذاری با کشت *E. coli* جداسازی و به روش انتقال مستقیم از فروتینگ بادی خالص‌سازی شد. این جدایه میکسوباکتر گرم منفی، هوازی و دارای سلول‌های میله‌ای کشیده با دو انتهای گرد بود و اجسام زایشی کروی و نارنجی رنگی تولید می‌کرد که شباهت آن با جنس *Myxococcus* را نشان می‌داد (شکل ۲). رشد جدایه ۱۱۸ در محدوده pH= ۹-۶ و بهینه pH= ۷ و محدوده دمایی °C ۲۰-۳۵ و بهینه °C ۳۰ مشاهده شد. خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه ۱۱۸ با ۴ گونه جنس *Myxococcus* در جدول ۳ مقایسه شده است. مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون API ZYM جدایه ۱۱۸ با گونه‌های *Myxococcus* (جدول ۳) نشان داد که مشخصات بیوشیمیایی جدایه با گونه *M. fulvus* منطبق است.



شکل ۲: جدایه ۱۱۸ الف) سلول‌های رویشی باریک و بلند با دو انتهای گرد و ب) جسم زایشی کروی، بزرگ، بدون پایه و منفرد که مشخصه جنس *Myxococcus* است.

مقاومت جدایه به آمپی‌سیلین، باسیتراسین، اسپکتینومایسین، سفالوسپورین، جنتامایسین، پلی‌مایسین، فوزیدیک اسید، تری‌متوپریل و هایگرومایسین و حساسیت آن به اکسی‌تتراسایکلین، کانامایسین، تیوسترپتون و کلرامفنیکل به همراه خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه ۱۱۸ نشان داد که این جدایه بر اساس کلید شناسایی رایشنباخ و دورکین به گونه *M. fulvus* تعلق دارد.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک سویه‌های شاخص برخی از گونه‌های میکسوباکتر و جدایه ۱۱۸ نشان‌دهنده شباهت آن با گونه *M. fulvus* است. سه زیر راسته میکسوباکترها در شکل به خوبی از یکدیگر جدا شده‌اند. اعداد در محل گره‌ها Bootstrap را نشان می‌دهد. مقیاس نشان‌دهنده میزان تفاوت در توالی گونه‌هاست.

آنالیز توالی 16S rDNA جدایه ۱۱۸ و آنالیز فیلوژنتیک آن

مقایسه توالی ۱۳۲۰ بازی 16S rDNA جدایه ۱۱۸ با توالی سویه‌های شاخص میکسوباکترها در پایگاه اطلاعاتی EzBioCloud نشان داد که این جدایه شباهت ۱۰۰ درصد با سویه *M. fulvus* ATCC 25199 داشت (شکل ۳). درخت فیلوژنتیک رسم شده به روش حداکثر شباهت در بین گونه‌های مختلف میکسوباکترها نیز تعلق این جدایه به گونه *M. fulvus* را تأیید می‌کند.

کشت مایع میکسوباکتر

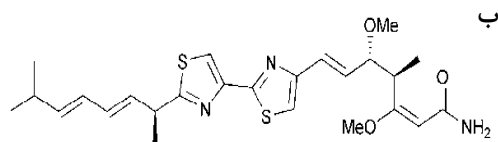
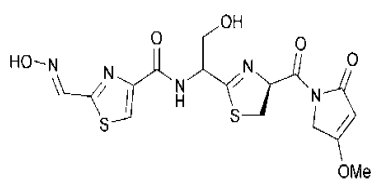
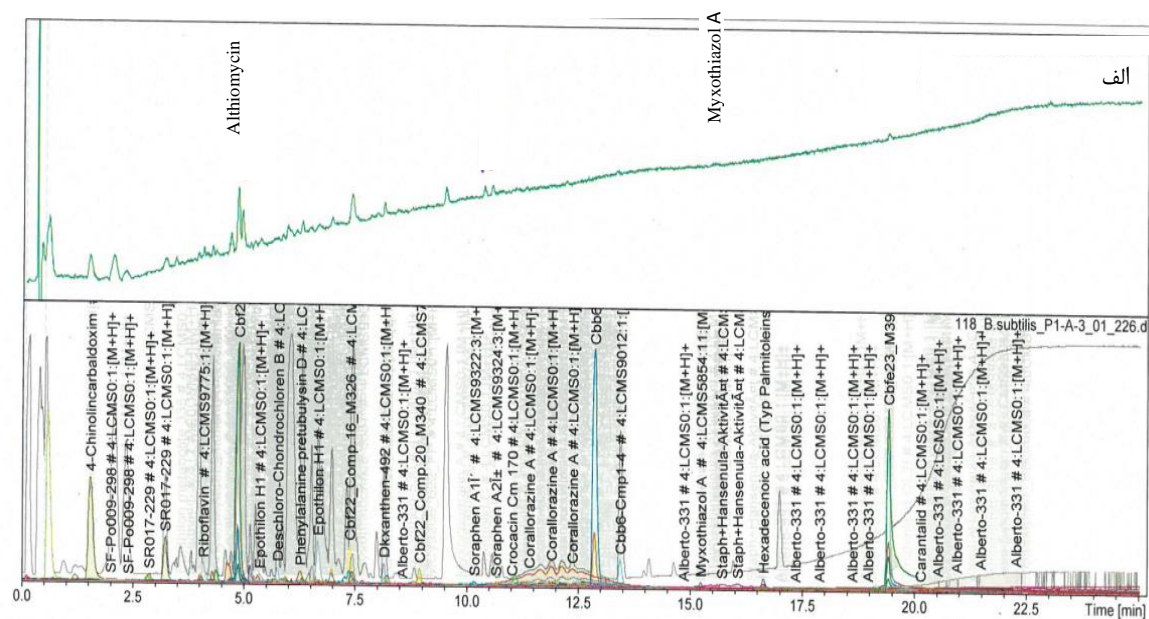
جدایه ۱۱۸ در محیط کشت مایع Myxoviresin به صورت توده‌ای و غیرهموزن رشد کرد و حتی با چندین بار انتقال در کشت مایع در طول چند ماه، کشت هموزن ایجاد نشد. از این رو برای ادامه بررسی از توده‌های باکتریایی استفاده شد.

فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات فعال زیستی جدایه ۱۱۸

نتایج حاصل نشان داد که عصاره متانولی جدایه ۱۱۸ (حاصل از محیط کشت Myxoviresin) قوی‌ترین فعالیت ضد میکروبی خود را علیه میکروارگانیسم‌های گرم منفی *E. coli* TolC تا رقت یک شانزدهم و گرم مثبت *M. luteus* تا رقت یک سی و دوم نشان می‌دهد. بنابراین عصاره با HPLC فراکسیون‌گیری و آزمون زیستی علیه این دو میکروارگانیسم انجام یافت. آزمون فعالیت ضدباکتریایی فراکسیون‌های HPLC نشان داد که فراکسیون‌های دقایق شش تا هشت دارای فعالیت زیستی بودند. بررسی LC/MS منجر به شناسایی دو پیک با فعالیت ضد میکروبی در دقایق ۵/۶۷ الی ۵/۹۱ و ۱۵/۲۴ تا ۱۵/۳۰ شد. پیک ابتدایی یون مولکولی $[M+Na]^+$ با m/z ۴۶۲/۰۵۱۱ و پیک دوم یون مولکولی $[M+H]^+$ با m/z ۴۸۸/۲۰۴۰ را نشان دادند (شکل ۴ الف). مقایسه نتایج به دست آمده از زمان بازداری و وزن مولکولی این پیک‌ها با پایگاه داده‌ها و به وسیله نرم‌افزار منجر به شناسایی این پیک‌ها به عنوان آلتیوماپسین و میکسوتیازول A شد (شکل ۴ ب).

فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات فعال زیستی جدایه ۱۱۸

نتایج حاصل نشان داد که عصاره متانولی جدایه ۱۱۸ (حاصل از محیط کشت Myxoviresin) قوی‌ترین فعالیت ضد میکروبی خود را علیه میکروارگانیسم‌های گرم منفی *E. coli* TolC تا رقت یک شانزدهم و گرم مثبت *M. luteus* تا رقت یک سی و دوم نشان می‌دهد. بنابراین عصاره با HPLC فراکسیون‌گیری و آزمون زیستی علیه این دو میکروارگانیسم انجام یافت. آزمون فعالیت ضدباکتریایی فراکسیون‌های HPLC نشان داد که فراکسیون‌های دقایق شش تا هشت دارای فعالیت زیستی بودند. بررسی LC/MS منجر به شناسایی دو پیک با فعالیت ضد میکروبی در دقایق ۵/۶۷ الی ۵/۹۱ و ۱۵/۲۴ تا ۱۵/۳۰ شد. پیک ابتدایی یون مولکولی $[M+Na]^+$ با m/z ۴۶۲/۰۵۱۱ و پیک دوم یون مولکولی $[M+H]^+$ با m/z ۴۸۸/۲۰۴۰ را نشان دادند (شکل ۴ الف). مقایسه نتایج به دست آمده از زمان بازداری و وزن مولکولی این پیک‌ها با پایگاه داده‌ها و به وسیله نرم‌افزار منجر به شناسایی این پیک‌ها به عنوان آلتیوماپسین و میکسوتیازول A شد (شکل ۴ ب).



شکل ۴: شناسایی متابولیت‌های فعال جدا شده ۱۱۸. الف) پروفایل عصاره متانولی کشت در LC/MS به همراه پیک‌های آنالیز شده. ب) ساختار مولکولی میکسوتیازول در راست و آنتیومیاسین در چپ قرار دارند.

جدول ۳: مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه ۱۱۸ و سویه‌های مرتبط فیلوژنتیکی *Myxococcus* گونه‌های *Myxococcus*

<i>M. virescens</i>	<i>M. xanthus</i>	<i>M. stipitatus</i>	<i>M. fulvus</i>	جدایه ۱۱۸	خصوصیات
+	+	+	+	+	قرمز کنگو
-	-	-	-	-	سلولز
-	-	-	-	-	اکسیداز
+	+	+	+	+	کاتالاز
-	-	-	-	-	رشد °C ۴۴
-	-	-	-	-	نفوذ به درون آگار
API ZYM					
+	+	+	+	+	آلکالین فسفاتاز
+	+	+	+	+	استراز (C4)
+	+	+	+	+	استراز لیپاز (C8)
+	+	+	+	+	لیپاز (C12)
+	+	+	+	+	لوسین آریل آمیداز
+	+	+	+	+	والین آریل آمیداز
+	+	+	+	+	سیستئین آریل آمیداز
+	+	+	+	+	تریپسین
+	+	+	-	-	آلفا
+	+	+	+	+	کیموتریپسین
+	+	+	+	+	اسید فسفاتاز
+	+	+	+	+	نفتول
-	-	+	+	+	فسفوهدرولاز
-	-	-	+	+	آلفا گالاکتوزیداز
-	-	-	+	+	بتا گالاکتوزیداز
-	-	-	+	+	بتا گلوکوزیداز
+	-	+	+	+	گلوکوروئیداز
-	-	-	+	+	آلفا گلوکوزیداز
-	-	-	+	+	بتا گلوکوزیداز
+	-	+	+	+	N-استیل بتا گلوکوز آمینیداز
-	-	-	-	-	آلفا مانوزیداز
-	-	-	-	-	آلفا فوکوزیداز

در این مطالعه، جدایه میکسوباکتریایی ۱۱۸ از نمونه خاک برداشته شده از منطقه کوهرنگ چهارمحال و بختیاری ایران جداسازی

شد. به طور کلی جداسازی میکسوباکترها به دلیل کندی رشد مشکل است زیرا احتمال آلودگی با باکتری‌های سریع‌الرشد و قارچ‌ها بیشتر می‌شود؛ به طوری که، حتی بازیابی کشت خالص سویه‌های جداسازی شده نیز به خاطر آلودگی‌ها مشکل و زمان‌بر است (Shimkets *et al.*, 2006). تاکسونومی میکسوباکترها بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی مانند شکل و اندازه سلول‌های رویشی و میکسوسپورها، رنگ و نوع اجسام زایشی و خزش باکتری است (Spröer *et al.*, 1999) بررسی این خصوصیات نشان داد که سویه ۱۱۸ به گونه *M. fulvus* تعلق دارد که اولین بار توسط Thaxter در سال ۱۸۹۲ شرح داده شد (Rosenberg *et al.*, 2014). در ابتدا رده‌بندی میکسوباکترها بر اساس مورفولوژی انجام می‌شد که تمایز بین گونه‌های مختلف بسیاری از جنس‌ها را مشکل می‌ساخت. اخیراً شناسایی فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز توالی 16S rDNA در کنار سایر روش‌های شناسایی برای میکسوباکترها انجام می‌شود. توالی‌یابی ژن 16S rRNA نیز شناسایی این جدایه به عنوان *M. fulvus* را تأیید کرد. جداسازی و خالص‌سازی این گونه به دلیل اجسام زایشی که خارج از سطح آگار رشد و میکسوسپور فراوانی تولید می‌کند، نسبت به برخی میکسوباکترها که در داخل آگار رشد کرده و خزش و اجسام زایشی ضعیفی تولید می‌کنند، آسان‌تر است (Zhang *et al.*, 2003).

میکسوباکترها پتانسیل بالایی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از خود نشان می‌دهند که این به دلیل وجود مکانیسم‌های جدید عملکردی و تولید است که مختص این دسته از باکتری‌ها می‌باشد. به منظور ارزیابی توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه جدایه ۱۱۸ فرایند کشت، استخراج و آزمون فعالیت ضد میکروبی انجام یافت که نشان داد که این جدایه فعالیت ضدباکتریایی بالایی علیه *E. coli* و *M. luteus* دارد. بررسی‌های HPLC و LC/MS عصاره منجر به شناسایی آنتی‌بیوتیک آلتیومایسین و میکسوتیازول شد. آلتیومایسین یک بازدارنده سنتز پروتئین از دسته پپتیدهای حلقوی است که فرایند ترجمه را در مرحله پپتیدیل ترانسفر مختل می‌کند (Fujimoto *et al.*, 1970). این ترکیب قبلاً در استرپتومایسین‌ها و سپس در میکسوباکترها گزارش شده است (Kunze *et al.*, 1982). این ترکیب یکی از متابولیت‌های نادر میکسوباکتریایی است که به متابولیت‌های تولید شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها شباهت دارد. این متابولیت وسیع‌الطیف با سمیت سلولی پایین، فعالیت مناسبی را علیه سلول‌های پروکاریوت نشان می‌دهد.

میکسوتیازول ترکیب دیگر شناسایی شده در جدایه ۱۱۸ از دسته بی‌تیازول‌هاست که فعالیت ضدباکتریایی با مکانیسم ناشناخته دارد (Weissman & Müller, 2010)، اما فعالیت ضدقارچی خود را از طریق مهار کمپلکس III تنفسی اعمال می‌کند. .. بسیاری از ترکیبات میکسوباکتریایی این مکانیسم عمل را دارند، اما این روش در میان ترکیبات طبیعی به دست آمده از سایر باکتری‌ها نادر است (Degli Esposti, 1998). همان‌گونه که در شکل (۴ الف) مشاهده می‌شود، این ترکیب با غلظت بسیار کم توسط جدایه مورد مطالعه تولید می‌شود؛ به همین علت، آثار ضدقارچی در عصاره متانولی مشاهده نشده است. هر چند که می‌توان با انجام بهینه‌سازی در محیط کشت میزان تولید آن را افزایش داد (Weissman & Müller, 2010). شناسایی این ترکیبات نشان داد که فرایند کشت، استخراج و غربالگری فعالیت زیستی به درستی انجام شده است.

نتیجه گیری کلی

جدایه ۱۱۸ نتایج امیدبخشی در آزمون‌های ابتدایی نشان می‌دهد که می‌تواند اهمیت این منبع جدید و بالقوه را برای تولید این آنتی‌بیوتیک‌ها خاطر نشان سازد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جستجو برای جداسازی سویه‌های میکسوباکتر تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی از خاک های ایران نتیجه‌بخش است و می‌توان با گسترش نمونه‌گیری‌ها به مناطقی با شرایط اکولوژیکی خاص انتظار یافتن گونه‌ها و ترکیبات جدیدی را داشت که به عنوان ترکیب پیشرو برای توسعه دارو های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سپاسگزاری

نویسنده از مؤسسه Helmholtz Centrum for Infection Research (HZI) شهر برانشوایگ آلمان به دلیل فراهم نمودن تجهیزات و حصول این نتایج تشکر می‌کند.

منابع

- Cazin, J., Wiemer, D.F., and Howard, J.J. (1989) Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by attine ants. *Applied and environmental microbiology*, 55(6): 1346-1350.
- Dawid, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS microbiology reviews*, 24(4): 403-427.
- Degli Esposti, M. (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1364(2): 222-235.
- Dworkin, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological reviews*, 60(1): 70.
- Fujimoto, H., Kinoshita, T., Suzuki, H., and Umezawa, H. (1970) Studies on the mode of action of althiomycin. *The journal of antibiotics*, 23(6): 271-275.
- Kunze, B., Reichenbach, H., Augustiniak, H., and Höfle, G. (1982) Isolation and identification of althiomycin from *Cystobacter fuscus* (Myxobacterales). *The journal of antibiotics*, 35(5): 635-636.
- Reichenbach, H. (2001) Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 27(3): 149-156.
- Reichenbach, H., and Höfle, G. (1999) Myxobacteria as producers of secondary metabolites. *Drug discovery from nature*: 149-179..
- Spröer, C., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E. (1999) The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 49(3): 1255-1262.
- Weissman, K.J., and Müller, R. (2010) Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Natural product reports*, 27(9): 1276-1295.

-
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2): 163-175.
- Zhang, L., Wang, H., Fang, X., Stackebrandt, E., and Ding, Y. (2003) Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. *Journal of microbiological methods*, 54(1): 21-27.

Isolation and Identification of a Myxobacterium Producing Myxothiazol and Althiomycin from Iran Soil

A. Moradi¹, M.Yaghoubi Avini, G. Ebrahimipour^{1*}, A. Ghasempour²

Received: 2016.10.23

Accepted: 2017.3.1

Abstract

Myxobacteria are soil bacteria that move by gliding and have an astonishing life cycle culminating in fruiting body formation. The myxobacterial strain no.118 was isolated from unexplored soil of **Koohrang** County, Chaharmahal-o-Bakhtiari Province and tested for potential antimicrobial activity against various human pathogens. On the basis of results, strain 118 significantly inhibited growth of *E. coli* and *M. luteus* therefore was used for further characterization. Analysis of morphological, biochemical and 16S rRNA gene sequence indicated that this strain belongs to the genus *Myxococcus*. In addition, neighbor-joining phylogenetic tree confirmed the relationships of this strain to other members of *Myxococcus* genera. In order to explore the potential bioactivities, extract of the fermented broth culture was prepared with organic solvent extraction method. The methanol extract was subjected to HPLC fractionation against sensitive pathogens. LC/MS analysis resulted in the identification of Myxothiazol and Althiomycin antibiotics in methanol extract of the strain no. 118.

Keywords: Myxothiazol and Althiomycin antibiotics, antimicrobial activity, Myxococcus

1-Department of Microbiology and Microbial Technology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: g-ebrahimi@sbu.ac.ir)

2-Department of Microbiology and Microbial Technology, Faculty of Biological s and Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(*Corresponding Author: g-ebrahimi@sbu.ac.ir)

مکانیسم اثر بازدارندگی کافتین چای ایرانی بر سینتیک سیگموئیدی فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز

روبا مهین پور^{۱*}، مجید قاسمی^۲، سیده زهرا موسوی نژاد^{۳*}، زهره زهرایی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

چکیده

کافتین یکی از لیگاندهای مهم آنزیم آدنوزین دامیناز (*Adenosine Deaminase, ADA*) است. در پژوهش حاضر، تغییرات فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز در شرایط بافری *Tris-HCl* ۵۰ میلی مولار ۷/۳ pH و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور و عدم حضور کافتین و در غلظت‌های فزاینده سوبسترای آدنوزین (صفر تا ۵۰ میکرومولار) و در زمان‌های مختلف مجاورت با کافتین اندازه‌گیری شد. با توجه به تجزیه و تحلیل منحنی‌های اشباع به دست آمده، شکل سیگموئیدی آنها تفاوت چشمگیری با منحنی‌های اشباع گزارش‌های پیشین نشان می‌دهد و اولین بار است که گزارش می‌شود. این تفاوت را می‌توان به اختلاف در گستره غلظتی سوبسترا و زمان مجاورت با کافتین نسبت داد. بر پایه شکل سیگموئیدی منحنی اشباع، مکانیسم اثر کافتین قابل توجه است. همچنین بر اساس یافته‌های این پژوهش اثر کافتین بر فعالیت آدنوزین دامیناز تابعی از زمان مجاورت آنها است و پس از ۶ ساعت مجاورت آنزیم و کافتین به ثبات می‌رسد. این نکته در تفسیر نتایج حاصل از بررسی‌های مربوط به آدنوزین دامیناز و لیگاندهایش ارزشمند خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آدنوزین دامیناز، سینتیک سیگموئیدی، کافتین، مکانیسم بازدارندگی.

مقدمه

آدنوزین دامیناز (*Adenosine Deaminase, ADA*) آنزیمی است که از طریق کاتالیز واکنش دامیناسیون برگشت‌ناپذیر آدنوزین یا داکسی آدنوزین به اینوزین یا داکسی اینوزین در متابولیسم پورین‌ها نقش دارد (Hirchhorn & Ratech, 1980). آدنوزین دامیناز به عنوان یک گلیکوپروتئین، زنجیره‌ای پلی پپتیدی با ۳۱۱ آمینواسید دارد و توالی ژن آن در سال ۱۹۸۴ مشخص شده است (Dodona *et al.*, 1984). فعالیت آدنوزین دامیناز سرم انسانی وجود سه شکل مولکولی از این آنزیم را نشان می‌دهد: یک شکل منومر با وزن مولکولی ۳۵۰۰۰ g/mol (ADA)، یک شکل تترامر با وزن مولکولی ۲۸۰۰۰۰ g/mol که از

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

* (نویسنده مسئول: mahinpur@kashanu.ac.ir و z.moosavinejad@alzahra.ac.ir)

۲- کارشناسی ارشد، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

ترکیب دو منومر (ADA^1) و یک گلیکوپروتئین دایمر به نام پروتئین اتصالی تشکیل شده است و شکل سوم آن 100000 g/mol (ADA^2) وزن دارد (Dodona & Kelley, 1979). این اشکال مختلف از لحاظ خصوصیات سینتیکی و ایمونولوژیکی با هم متفاوت هستند (Edwards *et al.*, 1971).

در مقاله های مختلف از این اشکال با نام های شکل کوچک و بزرگ نیز یاد می شود. به عنوان مثال برخی از محققین شکل کوچک آن را فرم ۳۶ تا ۳۸ کیلودالتونی می دانند که از نظر سینتیکی فعال است و شکل بزرگ آن را کمپلکسی از شکل کوچک و یک نوع پروتئین در نظر می گیرند که به طور غیرآزیمی به آنزیم متصل می شود (Dodona & Kelley, 1979). این پروتئین اتصالی از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی، قابل جداسازی است (Bota *et al.*, 2000). نقش پروتئین اتصالی، تنظیم تصفیه آدنوزین دامیناز از سرم و کمک به اتصال آنزیم به سطح خارجی غشا سلول است. علاوه بر این پروتئین اتصالی ADA را به صورت *in vivo* پایدارتر می کند. همچنین فرم بزرگ نسبت به فرم کوچک آن در برابر حرارت پایداری بیشتری دارد که دلیلی بر افزایش پایداری حرارتی آنزیم بر اثر پیوند به پروتئین اتصالی است (Daddona *et al.*, 1980). آدنوزین به عنوان سوبسترای آدنوزین دامیناز متابولیت قابل جبران در همه سلولها است که در فرآیندهای کلیدی مثل سنتز نوکلئیک اسید و بازهای پورین، متابولیسم آمینواسیدها و هموستاز متابولیسم سلولی نقش دارد (Borowic *et al.*, 2006; Latini *et al.*, 1999).

با توجه به اهمیت آدنوزین دامیناز در فرآیندهای زیستی مانند کاتابولیسم پورین (یک فرآیند شیمیایی برای تجزیه مواد به صورت *in vivo*) (Mills *et al.*, 1976)، تکثیر سلول های T، و تقویت سیستم ایمنی (Herrera *et al.*, 2001)، نقش در رفع التهاب (از طریق سوبسترای آن، آدنوزین) و برخی از اختلالهای دیگر مثل بیماری التهابی روده (Antonioli *et al.*, 2007)، این آنزیم بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. نقش این آنزیمها در شرایط پاتولوژیکی مختلف و برخی از بیماریهای خطرناک مورد مطالعه قرار گرفته است (Meier *et al.*, 1976; Antonioli *et al.*, 2007). علاوه براین، آزمایشهای مختلف مثل خالص سازی و نیز تعیین فعالیت و ساختار در موجوداتی مثل موش و باکتری و همچنین فعالیت آن در اندامها و بافتها (Singh & Sharma, 2000; Pombanluaalap & Chalopagorn, 2011; Kathiresan *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 1982)، اثر لیگاند های متفاوت مانند کافئین، آسپیرین، دیکلوفناک، داروهای پورینی، سورفاکتانتها و نمکها انجام شده است. گزارشهای زیادی نیز بر روی فعالیت آدنوزین دامیناز و مهار آن وجود دارد (Moosavi-Ataei *et al.*, 2000; Saboury *et al.*, 2002; Ataei *et al.*, 2005). (Saboury *et al.*, 2003; Alunni *et al.*, 2008; Ajloo *et al.*, 2007; Movahedi *et al.*, 1993).

یکی از لیگاندهای آدنوزین دامیناز، کافئین (۷،۳،۱ تری متیل زانتین) یک آلکالوئید پورینی است و منابع اصلی آن شامل چای، قهوه و دانه های کاکائو است (Tello *et al.*, Icen & Guru, 2009; Senol & Aydin, 2006; Wang *et al.*, 2011). علاوه بر مزایای غذایی، کافئین می تواند در درمان انواع بیماریها مثل چربی زیاد (Phillips *et al.*, 1981)، فشار خون (Nurminen *et al.*, 1999)، بیماریهای قلبی (Katan & Schouten, 2005)، سرطان و ایدز (Nunnari *et al.*, Dreher, 2003).

(2005) موثر باشد. علاوه بر این، کافئین باعث تنگ شدن عروق خونی مغز می‌شود و بنابراین می‌توان آن را برای درمان سردرد عروقی مورد استفاده قرار داد (Schwindinger *et al.*, 2010). این ماده همچنین برای رفع خستگی و خواب آلودگی مفید است (Pelligrino *et al.*, 2010). در بدن کافئین با انواع مولکول‌های زیستی مثل آدنوزین دآمیناز برهم‌کنش دارد که نقش اصلی را در متابولیسم پورین ایفا می‌کند (Moosavi-Movahedi *et al.*, Ataei *et al.*, 2000; Saboury *et al.*, 2002; Ataei *et al.*, 2005). کافئین به عنوان مهارکننده چنین فرآیندی مورد بررسی قرار می‌گیرد (Saboury *et al.*, 2003; Saboury *et al.*, 2002). نکته مهم این است که در همه این گزارش‌ها فعالیت ADA در غلظت‌های بسیار زیاد آدنوزین (تا ۱۰۰ میکرومولار) اندازه‌گیری شده است که در شرایط طبیعی وجود ندارد. در واقع غلظت آدنوزین در بدن بسیار کمتر از این مقدار (در حالت سلامت در گستره ۰/۱-۱ میکرومولار و در حالت بیماری‌ها ۳۰ میکرومولار) است (Latini *et al.*, 1999).

در بررسی پیش رو، ضمن رعایت محدوده طبیعی غلظت آدنوزین، برای اولین بار سیگمئوئیدی بودن منحنی اشباع آدنوزین دآمیناز در این محدوده غلظتی آدنوزین گزارش شده است و بر همین اساس و با کمک تحلیل‌های تئوری مربوط به سینتیک آنزیمی، مکانیسمی پیشنهاد شده است که کافئین (استخراج شده از چای ایرانی) از آن طریق باعث بازدارندگی فعالیت آدنوزین دآمیناز می‌شود. همچنین تابعیت اثر بازدارندگی کافئین با زمان اثبات شده که در انطباق نتایج مقاله حاضر با گزارش پیشین ما بسیار مفید است.

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها

آدنوزین دآمیناز روده گاو از Roche (product no.1010210500) تهیه شد. آدنوزین (سوبسترا) و Tris-HCl هر دو از شرکت Sigma و کلسیم کلراید و دی‌کلرومتان از شرکت Merck خریداری شدند. فعالیت آنزیم با استفاده از روش اسپکتروفوتومتر (UV-Vis. Shimadzu-UV1800) مورد سنجش قرار گرفت. حمام اولتراسونیک (230/240V Hz Italy Soltec) و رفرکتومتر (DR201-95, Germany) نیز برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج و خالص‌سازی کافئین از چای ایرانی

استخراج و خالص‌سازی کافئین از چای ایرانی بر اساس روش امواج فراصوت انجام شد (Mason, 1990). رسوب حاصل از طریق تبلور مجدد در اتانل خالص شد و محصول به صورت جامد سفیدرنگ به دست آمد.

کیفیت محصول بر اساس اندازه‌گیری نقطه ذوب (238°C)، اندیس انکساری ($1/33$) و طیف NMR به مشخصات زیر

تایید شد:

(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.991 (s, 3 H), 3.58 (s, 3 H), 3.403 (s, 3 H), 7.512 (s).

سنجش فعالیت آنزیمی آدنوزین دامیناز

فعالیت آدنوزین دامیناز (19.5×10^{-3} Unit) از طریق سنجش کاهش جذب درطول موج ۲۶۵ nm ناشی از تبدیل آدنوزین ($50/8$ میکرو مولار) به اینوزین در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۳) در دمای 37°C و با احتساب ضریب خاموشی برابر با $8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد (Ataei *et al.*, 2004). یک واحد فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول آدنوزین را در مدت یک دقیقه در دمای 37°C و pH ۷/۳ به اینوزین تبدیل کند.

رسم منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دامیناز

پس از تهیه غلظت‌های مختلف سوبسترا ($0-50.8 \mu\text{M}$) در بافر Tris-HCl در دمای 37°C واکنش آنزیمی با افزودن 19.5×10^{-3} U آنزیم ADA شروع و سرعت کاهش جذب در طول موج ۲۶۵ nm ثبت شد. سرعت‌های به‌دست آمده به عنوان تابعی از غلظت سوبسترا رسم شد. برای رسم منحنی اشباع در حضور کافئین، محلول‌های سوبسترا دقیقاً مانند قبل تهیه شدند با این تفاوت که همگی حاوی مقدار ثابت $10 \mu\text{M}$ کافئین بودند. واکنش طبق روال پیشین، با افزودن همان مقدار آنزیم شروع شد و بقیه عملیات مانند قبل تکرار شد. غلظت‌های آنزیم، آدنوزین و کافئین همگی براساس تجربیات آزمایشگاه و نزدیک به شرایط فیزیولوژیک تنظیم شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی

ضرایب هیل (Hill coefficients) از شیب نمودارهای خطی هیل و مقادیر $S_{1/2}$ به صورت طول از مبدا (محل قطع محور ایکس درمنحنی‌های هیل) اندازه‌گیری شد.

بررسی سینتیکی فعالیت ADA

حجم زیادی از محلول آنزیمی در دو حالت بدون کافئین و به همراه کافئین 10 میکرو مولار، به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C درجه سانتیگراد در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و pH ۷/۳ قرار داده شد. در فواصل زمانی مختلف، حجمی به اندازه یک سنجش آنزیمی برداشته شد و پس از دو دقیقه قرار گرفتن در دمای 37°C ، به منظور برقراری تعادل دمایی، فعالیت آنزیم

مطابق روش سنجش فعالیت، با افزودن سوبسترای آدنوزین به غلظت نهایی ۵۰/۸ میکرو مولار که مربوط به ناحیه V_{max} است اندازه گیری شد.

روش‌های آماری

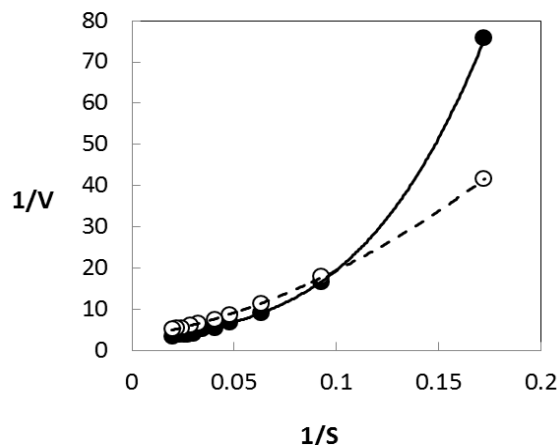
همه‌ی مقادیر آزمایشگاهی، میانگین دست کم سه بار تکرار آزمایش هستند. میانگین انحراف معیار، P-value، رسم منحنی‌ها و بدست آوردن معادلات خط، همگی با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

یکی از مواد موثر بر فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز، کافئین است (Mahinpour Mazzotti *et al.*, 2011; Saboury *et al.*, 2003; *et al.*, 2016). کافئین بصورت خوراکی (در چای، قهوه و نوشیدنی‌های مشابه) یا دارویی (در انواع مسکن‌ها) مصرف زیادی دارد. رابطه مصرف کافئین و تاثیر آن بر خواب اشخاص، جزء تجارب فردی ما است. این تاثیر کافئین به واسطه اثر آن بر فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز است (Mazzotti *et al.*, 2011). نشان داده شده است که گوناگونی ژنتیکی که در ژن سازنده آنزیم آدنوزین دامیناز اشخاص مختلف وجود دارد موجب تفاوت اثر مصرف کافئین در روند خواب آن‌ها می‌گردد (Mazzotti *et al.*, 2012). بطور کلی، مصرف کافئین باعث افزایش مقدار فعالیت آدنوزین دامیناز در بدن می‌شود (Retey *et al.*, 2005). در مطالعاتی که بر روی موش‌های صحرایی (Rat) انجام شده است، مقدار فعالیت آدنوزین دامیناز تیموس و طحال در اثر تیمار با کافئین افزایش می‌یابد (Peters *et al.*, 1982). از سوی دیگر در گزارش‌های کاملاً متفاوتی اعلام شده که کافئین یکی از بازدارنده‌های فعالیت آنزیمی آدنوزین دامیناز است (Mahinpour *et al.*, 2016; Saboury *et al.*, 2003) که این بازدارندگی به علت اتصال مولکول کافئین به مولکول‌های آنزیم آدنوزین دامیناز رخ می‌دهد (Saboury *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد تولید بیشتر این آنزیم، واکنش طبیعی بدن برای جبران کاهش فعالیت ناشی از اثر بازدارندگی کافئین است.

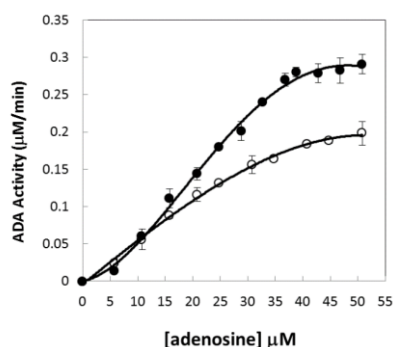
پیش از این، نشان داده شد که منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دامیناز بطور پیچیده‌ای در حضور کافئین تغییر می‌کند (Mahinpour *et al.*, 2016). در آن گزارش بنا بر نوع آزمایش و برای شبیه‌سازی حضور دراز مدت کافئین در بدن تحت شرایط بالینی، آنزیم آدنوزین دامیناز به مدت ۲۴ ساعت در حضور کافئین انکوبه شد. نتیجه آن وجود منحنی‌های اشباع دو فازی بود. اما منحنی اشباع آنزیم آدنوزین دامیناز بدون انکوباسیون دمایی دارای شکل سیگموئیدی است. این شکل سیگموئیدی در حضور کافئین (۱۰ میکرو مولار) تکرار می‌شود (شکل ۱). اگر چه این رفتار در حضور کافئین تکرار می‌شود اما در همین حال، کاهش شدیدی در فعالیت آنزیم ایجاد می‌شود. این کاهش سرعت، با افزایش غلظت سوبسترا (به سمت راست منحنی) حالت افزایشی

دارد؛ به طوری که، فعالیت حداکثر آنزیم (V_{max}) در غلظت حدود ۵۰ میکرومولار آدنوزین به طور معنی داری ($P < 0.01$) به مقدار ۳۱/۹۶ درصد کاهش یافته است (اثر بازدارندگی).



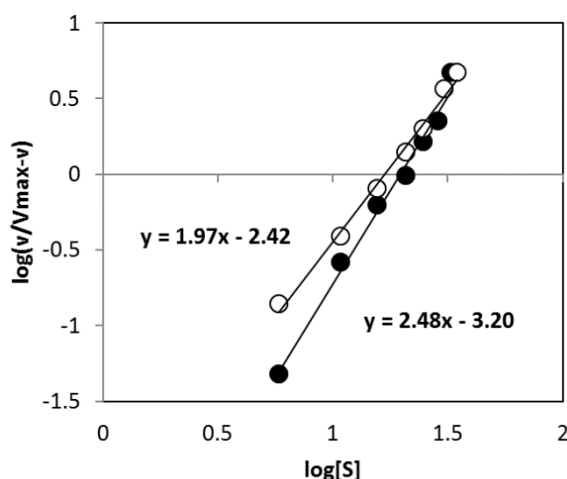
شکل ۱: منحنی اشباع آدنوزین دآمیناز در بافر Tris-HCl، pH ۷/۳ و دمای ۳۷ °C بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی). مقدار آنزیم در همه‌ی سنجش‌ها، یکسان (19.5×10^{-3} U) و از محلول آنزیمی تازه، استفاده شده است. در این مجموعه آزمایش، هیچ انکوباسیونی بین آنزیم و کافئین انجام نشده است. (ADA: Adenosine deaminase) نمودار لاینویور-برک در هر دو شرایط با و بدون کافئین انحنای رو به پایین نشان می‌دهد (شکل ۲). این شکل غیر خطی و انحنای رو به پایین آن، شاخص رفتار آلوستریک و مؤید شکل سیگموئیدی منحنی اشباع است (Bardsley *et al.*, 1980).

(Solano-Munoz *et al.*, 1981;



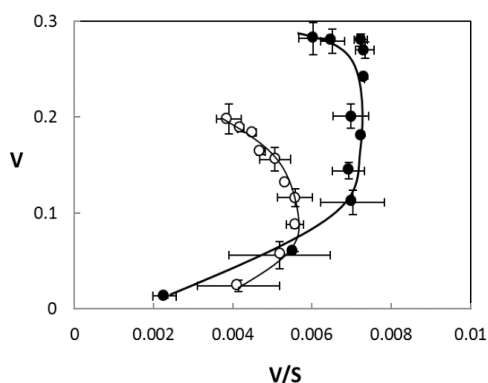
شکل ۲: منحنی لاینویور-برک آدنوزین دآمیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی).

در تایید این برداشت و برای تعیین نوع رفتار آلوستریک، نمودار ادی-هافستی (شکل ۳) رسم شد. انحنای به سمت راست در این نمودار وجود اثر آلوستریک از "نوع مثبت" را نشان می‌دهد. این اثر در آزمایش‌های پیشین در همین محدوده از غلظت سوبسترا نیز گزارش شده بود (Mahinpour *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر فقط یک فاز در تغییرات نمودارها مشاهده می‌شود؛ درحالی که در آزمایش‌های پیشین این تغییرات طی دو فاز رخ دادند. این تفاوت را می‌توان به اثر انکوباسیون ۲۴ ساعته آنزیم و کافئین نسبت داد.



شکل ۳: منحنی ادی-هافستی آدنوزین دامیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی). با توجه به شکل ۳، وجود کافئین شدت اثر آلوستریک مثبت را تغییر داده است. برای کمی کردن شدت اثر آلوستریک

مثبت، نمودار هیل (Hill Plot) رسم شد (شکل ۴).



شکل ۴: منحنی هیل برای آنزیم آدنوزین دامیناز بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10mM (دایره توخالی).

با استفاده از شیب نمودار هیل (ضریب هیل) و طول از مبدا آن ($S_{1/2}$) مقدار اثر آلوستریک مثبت اندازه گیری و ارزیابی

شد. نتیجه این اندازه گیری ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱: پارامترهای سینتیکی آدنوزین دامیناز بدون کافئین و به همراه کافئین 10mM

	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$S_{1/2}$ (μM)	n_H
ADA	0.291 ± 0.013	19.6	2.48
ADA+ Caffeine	0.198 ± 0.016	16.9	1.97

(ADA: Adenosine deaminase)

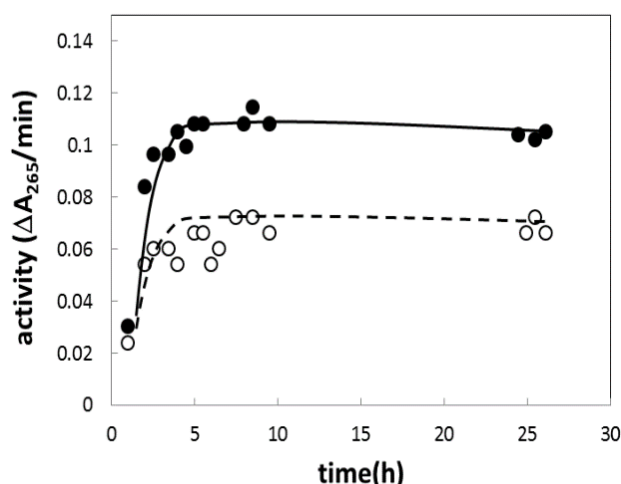
همانطور که در جدول ۱ دیده می شود با آن که در حضور و عدم حضور کافئین مقدار آنزیم مساوی است اما به دلیل

حضور کافئین مقدار V_{max} (در حداکثر مقدار سوبسترا) به طور معنی داری به مقدار ۳۱/۹۶ درصد کاهش یافته است ($P < 0.01$)

که با گزارش های پیشین مبنی بر اثر مهارکنندگی کافئین سازگار است (Saboury *et al.*, 2003). همچنین با توجه به سیگموئیدی

بودن هر دو منحنی در نمودار اشباع و وجود اثر آلوستریک، پارامتر سینتیکی $S_{1/2}$ به جای K_m برای آنزیم در هر دو حالت اندازه‌گیری شد. مقایسه مقادیر $S_{1/2}$ در جدول ۱ نشان می‌دهد که با حضور کافئین در غلظت‌های کمتری از سوپسترا، نیمی از ظرفیت عملکردی آنزیم آدنوزین دامیناز اشغال می‌شود. اما مهم‌ترین یافته، کاهش ضریب هیل (مقدار تعاونی در اتصال آدنوزین به آنزیم) از مقدار $2/48$ به مقدار $1/97$ در حضور کافئین است. این مشاهده حاکی از این است که با اتصال کافئین شدت اثر آلوستریک مثبت در اتصال آدنوزین‌های متوالی به آنزیم ADA کاهش می‌یابد. به این ترتیب دست‌کم یک مکانیسم برای اثر بازدارندگی کافئین روی عملکرد آدنوزین دامیناز، کاهش تعاونی مثبت ذاتی درون این مولکول است.

آزمایش بیشتر نشان داد که اثر کافئین بر فعالیت ADA با گذشت زمان متحمل تغییراتی می‌شود. شکل ۵ این تغییرات را با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در شرایط V_{max} به عنوان تابعی از زمان نشان داده است. این تغییرات به صورت افزایش فعالیت پس از حدود ۶ ساعت به ثبات می‌رسد. با توجه به این مشاهده توصیه می‌شود در پژوهش‌های مشابه، زمان‌های انکوباسیون ADA در شرایط مورد تحقیق به عنوان یک پارامتر موثر بر مقادیر اندازه‌گیری شده فعالیت ADA توجه شود.



شکل ۵: تغییرات V_{max} آنزیم آدنوزین دامیناز به عنوان تابعی از زمان انکوباسیون، بدون کافئین (دایره توپر) و به همراه کافئین 10 mM (دایره تو خالی).

نتیجه‌گیری

در مجموع، با تحلیل شکل سیگموئیدی منحنی‌های اشباع به دست آمده، پیشنهاد می‌شود دست‌کم یک مکانیسم برای اثر بازدارندگی کافئین بر ADA، کاهش اثر آلوستریک مثبت در رابطه بین ADA و سوپسترایش آدنوزین است. یافته‌های این پژوهش همچنین نشان می‌دهد اثر کافئین بر فعالیت این آنزیم، با زمان افزایش می‌یابد و پس از ۶ ساعت مجاورت، ثابت می‌ماند. توجه به این نکته در تفسیر بررسی‌های مربوط به آدنوزین دامیناز اهمیت دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه کاشان سپاسگزار هستند.

منابع

- Ajloo, D., Saboury, A.A., Haghi-Asli, N., Ataei-Jafarai, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Ahmadi, M., Mahnam, K. and Namaki, S. (2007) Kinetic, thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22: (4) 395-406.
- Alunni, S., Orrù, M. and Ottavi, L. (2008) A study on the inhibition of adenosine deaminase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23: (2) 182-189.
- Antonioli, L., Ataie, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Hakimelahi, G.H., Hwu, J.R. and Tsay, S.C. (2000) Enthalpy and enzyme activity of modified histidine residues of adenosine deaminase and diethyl pyrocarbonate complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27: (1) 29-34.
- Ataie, G., Safarian, S., Divsalar, A., Saboury, A.A., Moosavi-Movahedi, A.A., Ranjbar, B., Cristalli, G. and Mardanian, S. (2004) Kinetics and structural analysis of the inhibition of adenosine deaminase by acetaminophen. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19: (1) 71-78.
- Ataei, G., Zonoozi, F., Divsalar, A., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Safarian, S. and Habibi, M. (2005) Comparative kinetic and thermodynamic studies on intestinal and spleen adenosine deaminase. *Pejuhandeh Journal*, 10: (44), 65-72. (In Persian)
- Bardsley, W.G., Leff, P., Kavanagh, J. and Waight, R.D. (1980) Deviations from Michaelis-Menten kinetics. The possibility of complicated curves for simple kinetic schemes and the computer fitting of experimental data for acetylcholinesterase, acid phosphatase, adenosine deaminase, arylsulphatase, benzylamine oxidase, chymotrypsin, fumarase, galactose dehydrogenase, beta-galactosidase, lactate dehydrogenase, peroxidase and xanthine oxidase. *Biochemical Journal*, 187: (3) 739-765.
- Borowicz, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K.A. and Sktadanowski, C. (2006) Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica*, 53: 269-278.
- Bota, A., Gella, F. and Canalias, F. (2000) Purification of human adenosine deaminase for the preparation of a reference material. *Journal of Chromatography B*, 737: 237-244.
- Daddona, P.E., Frohman, M.A. and Kelley, W.N. (1980) Human adenosine deaminase and its binding protein in normal and adenosine deaminase-deficient fibroblast cell strains. *The Journal of Biological Chemistry*, 255: (12) 5681-5687.
- Daddona, P.E. and Kelley, W.N. (1979) Characteristics of an aminohydrolase distinct from adenosine deaminase in cultured human lymphoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure*, 580: (2) 302-311.
- Doddona, P.E., Schewach, D.S., Kelly, W.N., Argos, P., Markham, A.F. and Orkin, S.H. (1984) Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 12101-12106.
- Dreher, H.M. (2003) The effect of caffeine reduction on sleep quality and well-being in persons with HIV. *Journal of Psychosomatic Research*, 54: (3) 191-198.

- Edwards, Y., Hopkinson, D. and Harris, H. (1971) Adenosine deaminase isozymes in human tissues. *Annals of Human Genetics- London*, 35: 207-219.
- Herrera, C., Casado, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Molecular Pharmacology*, 59: 127-134.
- Hirshhorn, R. and Ratech, H. (1980) Isozymes of adenosine deaminase. *Isozymes. Current Topics in Biological and Medical Research*, 4: 131-157.
- Icen, H. and Guru, M. (2009) Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. *Journal of Supercritical Fluids*, 50: 225-228.
- Katan, M.B. and Schouten, E. (2005) Caffeine and arrhythmia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: (3) 539-540.
- Kathiresan, K., Saravanakumar, K., Sahu, S.K. and Sivasankaran, M. (2014) Adenosine deaminase production by an endophytic bacterium (*Lysinibacillus* sp.) from *Avicennia marina*. *3biotech*. 4: 235-239.
- Latini, S., Bordoni, F., Pedata, F. and Corradetti, R. (1999) Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, 127: (3) 729-39.
- Mahinpour, R., Ghasemi, M., Moosavi-Nejad, S.Z. and Zahraie, Z. (2016) Caffeine effect on adenosine deaminase catalysis: A new look at the effect of caffeine on adenosine deaminase activity. *Iranian Journal of Catalysis*, 6: (5) 475-480.
- Mason, T.J. (1990) *Critical reports on applied chemistry*. 1st edn. vol. 28, Society for Chemical Industry, Pp. 1-25, London & New York, NY.
- Mazzotti, D.R., Guindalini, C., De Souza, A.A., Sato, J.R., Santos-Silva, R., Bittencourt, L.R. and Tufik, S. (2012) Human genetics and sleep behavior. *Plos One*, 7: (8) E 44154.
- Mazzotti, D. R., Guindalini, C., Pellegrino, R., Barrueco, K.F., Santos-Silva, R., Bittencourt, L.R. and Tufik, S. (2011) Effects of the adenosine deaminase polymorphism and caffeine intake on sleep parameters in a large population sample. *Sleep*, 34: (3) 399-402.
- Meier, J., Coleman, M.S. and Hutton, J.J. (1976) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *British Journal of Cancer*, 33: 312-319.
- Mills, G.C., Schmalstieg, F.C., Trimmer, K.B., Goldman, A.S. and Goldblum, R.M. (1976) Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73: 2867-2871.
- Moosavi-Movahedi, A.A., Samiee, B. and Hakimelahi, G.H. (1993) Thermal analysis of adenosine deaminase in the presence of dodecyl trimethyl ammonium bromide. *Journal of Colloid and Interface Science* 161: (1) 53-56.
- Nunnari, G., Argyris, E., Fang, J., Mehlman, K.E., Pomerantz, R.J. and Daniel, R. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology*, 335: (2) 177-184.
- Nurminen, M.L., Niittynen, L., Korpela, R. and Vapaatalo, H. (1999) Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53: (11) 831-839.
- Pelligrino, D.A., Xu, H.L. and Vetri, F. (2010) Caffeine and the control of cerebral hemodynamics. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20: S51-S62.

- Peters, G.J., Oosterhof, A. and Veerkamp, J.H. (1982) Age-dependency of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in rat spleen and thymus. *Biology of Neonate*, 42: (3-4) 195-200.
- Phillips, N.R., Havel, R.J. and Kane, J.P. (1981) Levels and interrelationships of serum and lipoprotein cholesterol and triglycerides. Association with adiposity and the consumption of ethanol, tobacco, and beverages containing caffeine. *Arteriosclerosis*, 1: (1) 13-24.
- Pornbanlualap, S. and Chalopagorn, P. (2011) Adenosine deaminase from *Streptomyces coelicolor*: recombinant expression, purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 78: (2) 167-173.
- Rétey, J.V., Adam, M., Honegger, E., Khatami, R., Luhmann, U.F., Jung, H.H., Berger, W. and Landolt, H.P. (2005) A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: (43) 15676-81.
- Saboury, A.A., Divsalar, A., Ataie, G., Amanlou, M., Moosavi-Movahedi, A.A. and Hakimelahi, G.H. (2003) Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration Calorimetry. *Acta Biochimica Polonica*, 50: 849-855.
- Saboury, A.A., Divsalar, A., Ataie Jafari, G., Moosavi-Movahedi, A.A., Housaindokht, M.R. and Hakimelahi, G.H. (2002) A product inhibition study on adenosine deaminase by spectroscopy and calorimetry. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3: 302-305.
- Schwindinger, W.F., Mihalcik, L.J., Giger, K.E., Betz, K.S., Stauffer, A.M., Linden, J., Herve, D. and Robishaw, J.D. (2010) Adenosine A2A receptor signaling and golf assembly show a specific requirement for the gamma7 subtype in the striatum. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 29787-29796.
- Senol, A. and Aydin, A. (2006) Solid-liquid extraction of caffeine from tea waste using battery type extractor: Process optimization. *Journal of Food Engineering*, 75: 565-573.
- Singh, L.S. and Sharma, R. (2000) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 204: (1-2) 127-134.
- Solano-Muñoz, F., Mcginlay, P.B., Woolfson, R. and Bardsley W.G. (1981) Deviations from Michaelis-Menten kinetics. Computation of the probabilities of obtaining complex curves from simple kinetic schemes. *Biochemical Journal*, 193: (1) 339-52.
- Tello, J., Viguera, M. and Calvo, L. (2011) Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 59: 53-60.
- Wang, H., Chen, L., Xu, Y., Zeng, Q., Zhang, X., Zhao, Q. and Ding, L. (2011) Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with clean-up for determination of caffeine in tea. *LWT- Food Science and Technology*, 44: 1490-1495.

The mechanism of inhibitory effect of caffeine from Iranian tea on sigmoidal kinetics of adenosine deaminase enzyme activity

R. Mahinpour^{1*}, M. Ghasemi², Z. Moosavi-Nejad^{3*}, Z. Zahraei¹

Received: 2016.11.21

Accepted: 2018.12.25

Abstract

Caffeine is one of the most important ligand of adenosine deaminase (ADA). In the present study, changes in adenosine deaminase activity were measured in Tris-HCl buffer 50mM, pH 7.3 at 37°C in the presence and absence of caffeine in increasing concentrations of adenosine as a substrate (0-50μM) and in various incubation times with caffeine. Regarding the analysis of the saturation curves, for the first time, their sigmoidal shape shows considerable differences with previous reports which can be referred to differences in concentration range of substrate and incubation time with caffeine. Based on the sigmoidal shape of saturation curve, mechanism of caffeine effect is explainable. Moreover, based on finding of this study, the effect of caffeine on ADA activity is a function of incubation time and stabilized after 6 hours incubation of enzyme with caffeine. This is noteworthy when interpreting the results of the studies on ADA and its ligands.

Key words: Adenosine deaminase, caffeine, mechanism of inhibition, sigmoidal kinetics.

1- Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, IRAN

2- M.Sc, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

* (Corresponding Author: mahinpur@kashanu.ac.ir and z.moosavinejad@alzahra.ac.ir)

4- Assistant Professor, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran

برخی ویژگی های زیست شناختی و بوم شناختی میش مرغ در کشور با تاکید بر

وضعیت به شدت بحرانی گونه

مرتضی نادری*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۴

چکیده

میش مرغ در مقیاس جهانی آسیب پذیر ولی در مقیاس ملی گونه‌ای در خطر انقراض می باشد. زیستگاه این گونه به شدت تحت تاثیر کشاورزی و تغییرات کاربری اراضی می باشد. باید به سرعت اقدامات حفاظتی مبتنی بر مدیریت پویای زیستگاه و حفظ مناطقی وسیع از اراضی بدون کشت و کار پرکار صورت پذیرد. پایین بودن شدید فراوانی جمعیت، فعالیت های کشاورزی به ویژه در فصل جوجه آوری، تجمع طعمه خواران اهلی و وحشی در اثر عدم مدیریت پسماندها، برداشت یا لمس تخم ها از مهمترین تهدیدهای پیش رو محسوب می شوند. خریداری محصول سرپای کشاورزان، تبارشناسی جهت تعیین نزدیکترین جمعیت اهدا کننده تخم در خارج از ایران، مدیریت پسماند، کنترل سگ ها، برقراری وضعیت فوق العاده و پایش فشرده در دوره ی زادآوری، حلقه گذاری و ردیابی ماهواره ای جوجه ها پس از احیای جمعیت از مهمترین اقداماتی است برای نجات گونه از بحران انقراض توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: تهدیدها، حفاظت، روند تغییرات جمعیت، مدل سازی زیستگاه، میش مرغ

مقدمه

میش مرغ (*Otis tarda* Linnaeus, 1758) تنها گونه جنس *Otis* از خانواده *Otididae* و از راسته درناسانان، سنگین وزن ترین پرنده دارای قدرت پرواز بوده و دارای دوریختی جنسی شدیدی می باشد و از این نظر نیز منحصر به فرد می باشد. این پرنده یکی از بزرگترین پرندگان ایران است و از نظر شکل و جثه شباهت زیادی به بوقلمون دارد. طول بدن آن به یک متر و وزنش به بیش از ۱۵ کیلوگرم می رسد، در فصل بهار تخمگذاری کرده و در هر دوره تخم گذاری نیز به طور متوسط دو تا چهار تخم می گذارد؛ جوجه ها پس از ۲۵ الی ۲۷ روز به دنیا می آیند (نادری، ۱۳۹۵). میش مرغ همه چیزخوار بوده و از انواع منابع غذایی در فصول مختلف استفاده می نماید. پژوهش های صورت گرفته در شمال غرب اسپانیا حاکی از آن است که ۴۸/۴ درصد رژیم غذایی پرنده بالغ از مواد گیاهی ۴۰/۹ درصد از بی مهره گان و ۱۰/۶ درصد از دانه و بذر تشکیل شده است. همان جمعیت

۱-استادیار، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه محیط زیست

* (نویسنده مسئول: m-naderi@araku.ac.ir)

در طی فصل زمستان عمدتاً از مواد گیاهی، دانه و بذر استفاده نموده است (del Hoyo 1996). از مواد گیاهی مورد علاقه‌ی این پرنده می‌توان به لگوم‌ها، یونجه، انگور، دانه‌های خشک گندم، جو، نخود، اعضای خانواده قاصدک‌ها اشاره نمود. حشرات عموماً بیشترین سهم را در بخش جانوری رژیم غذایی این پرنده دارند به ویژه میش مرغ‌های جوان و نابالغ در فصل بهار و تابستان از این منابع بهره می‌گیرند. انواع قاب‌بالان به ویژه انواع سوسک‌ها، انواع زنبورها، ملخ‌ها، جیرجیرک‌ها نیز اغلب فراوان‌ترین طعمه‌هایی محسوب می‌شوند که توسط این پرنده مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مهره‌داران قرار گرفته در رژیم غذایی می‌توان به جوندگان، قورباغه‌ها، مارمولک‌ها و جوجه‌های پرنده‌گان نیز اشاره نمود (del Hoyo, 1996، نادری، ۱۳۹۵).

سیمایی که برای آشیان‌گذاری توسط ماده انتخاب می‌شود معمولاً در مناطق باز و به ویژه در اراضی کشاورزی (کشت غلات) (به ویژه کشت زمستانه) قرار دارد و همچنین این پرنده به شدت نسبت به اختلالات و آشفته‌گی‌های محیطی حساس می‌باشد. آشیانه روی زمین ساخته می‌شود به طوری که پرنده ماده قبل از تخم‌گذاری یک گودال کوچک و مخروطی با نوک خود ایجاد کرده و در بعضی موارد از مقداری علوفه بهم فشرده شده به عنوان آستر لانه استفاده می‌نماید. پس از لانه‌گزینی در بهار با افزایش طول روز و زمانی که پوشش گیاهی محل انتخاب لانه به اندازه‌ای که تأمین امنیت و استتار پرنده را فراهم آورد، فصل تولید مثل میش مرغ شروع می‌شود. نمایش‌های جفت‌یابی از طرف پرنده نر در اوایل صبح آغاز می‌شود، پرنده نر با انجام نمایش‌های پرگشایی دم خود را به صورت چتر باز می‌کند به طوری که پرهای ثانویه موجود در دو طرف بدن به شکل گل سفید و بزرگی در می‌آید، گردن پرنده متورم شده و زیر گلو حالت بادکنک به خود می‌گیرد. معمولاً قلمرو حدود شش کیلومتر مربع می‌باشد که در برابر دیگران دفاع می‌شود. پس از انتخاب و رسیدن به یک وضعیت پایدار جفت‌گیری شروع می‌شود (نادری، ۱۳۹۵).

میش مرغ در دشت‌های وسیع بی‌درخت، زمین‌های استپی و کشتزارهای پهناور حبوبات و علفزارها زندگی می‌کند. این گونه در اصل ساکن علفزارها بوده است که به مرور رجحان زیستگاهی خود را به زیستگاه‌های کشاورزی تغییر داده است. در مناطق جنوبی و مرکزی اروپا و در بسیاری از مناطق معتدله آسیا زادآوری می‌نماید. گونه‌ای که در مقیاس جهانی در طبقه آسیب‌پذیر قرار می‌گیرد (Collar *et al.*, 1994). در نشست‌هایی که در سال ۱۹۸۸ در وین برگزار گردید توصیه گردید که تمامی تلاش‌های حفاظتی گونه باید بر حفظ زیستگاه و نه فقط گونه متمرکز گردد (نادری، ۱۳۹۵). در ماه می ۱۹۹۴ کارگاهی در مجارستان برگزار گردید تا در خصوص وضعیت میش مرغ در اروپا و اولویت‌های و اقدامات مهم در راستای حفاظت از گونه در اروپا مورد بحث قرار گیرد (نادری، ۱۳۹۵). بر اساس مذاکرات صورت گرفته در این نشست اساس تدوین طرح اقدام بین‌المللی برای حفاظت از میش مرغ شکل گرفت. بر اساس مطالعات انجام شده میش مرغ نسبت به برخورد با خطوط انتقال نیرو، کشاورزی صنعتی و پرکار و تغییرات هندسیپ توسط انسان آسیب‌پذیر می‌باشد. جمعیت این پرنده در دنیا بین ۴۴ تا ۵۷ هزار فرد برآورد می‌گردد.

در بسیاری از نقاط دنیا مثل شبه جزیره ایبری، روسیه، چین، ایران و مراکش در صورتی که اقدامات فوری صورت نپذیرد این گونه‌ی ارزشمند منقرض خواهد شد (نادری، ۱۳۹۵).

اهمیت این گونه به ویژه در اروپا برای زیست شناسان حفاظت بسیار بالاست به طوری که این گونه در مجارستان به عنوان گونه‌ی سال ۲۰۱۴ انتخاب گردید (Hellmich & Idaghdour, 2000). در این پژوهش تلاش گردید با بررسی وضعیت به شدت نگران کننده‌ی این گونه در کشور، روند تغییرات جمعیت مدل سازی شده و ضمن بر شمردن مهمترین تهدیدها، راه کارهایی برای حفاظت از این گونه ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

در راستای برآورد فراوانی جمعیت این پرنده در زیستگاه مورد مطالعه اواسط دی ماه که بیشترین تجمع در یک نقطه قابل مشاهده است و با بهره‌گیری از شیوه شمارش نقطه‌ای اقدام شد (Alonso *et al.*, 2005). از آنجایی که این پرنده مجددا در مناطقی که سال‌های قبل زادآوری نموده است اقدام به این فعالیت می‌نماید شمارش افراد در این محل‌ها به خوبی می‌تواند روند تغییرات جمعیتی را منعکس نماید (Palacín *et al.*, 1996, Palacín *et al.*, 2016). برای شمارش نقطه‌ای جمعیت مورد نظر از تلسکوپ و دوربین دوچشمی و بهره‌گیری از حداقل چهار ناظر استفاده گردید. همچنین برآوردهای صورت گرفته از فراوانی جمعیت این گونه در سال‌های قبل از انجام این پژوهش، به منظور آگاهی از روند تغییرات جمعیتی مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه با کمک مدل رگرسیونی خطی-لگاریتمی تعداد مشاهده در برابر سال در طی دوره بررسی و برای کل کشور داده‌ها تبدیل به مدل خطی شده و بر اساس نرخ هندسی تغییرات خطی (در صورت وجود) و محاسبه شیب خط رگرسیونی می‌توان در مورد نرخ تغییرات سالیانه فراوانی جمعیت قضاوت نمود (Link & Sauer, 1998).

با بهره‌گیری از مدل ورتکس تلاش گردید احتمال انقراض گونه در طی صد سال آتی محاسبه شود. در این تحلیل‌ها جمعیت اولیه متشکل از ۳۰ فرد، سیستم زادآوری پلی جینی، اولین سال تولیدمثل در چهارسالگی، آخرین سال زادآوری ۳۰ سالگی، نسبت جنسی در بدو تولد به طور پیش فرض یک به یک و میانگین طول نسل معادل شانزده سال در نظر گرفته شد (Palacín *et al.*, 2016). سایر متغیرهای مربوط به نرخ مرگ و میر جنس ویژه با توجه به عدم وجود داده‌های قبلی به طور پیش فرض بین ماده‌ها و نرها یکسان در نظر گرفته شد. ظرفیت قابل تحمل زیستگاه نیز ۳۰۰۰ فرد تعیین گردید تا محدودیت‌های توان محیط در بازسازی روند تغییرات جمعیت محدودیتی اعمال نکند. با توجه به این که متغیرهای مختلفی در مدل ورتکس برای شبیه سازی روند تغییرات جمعیتی و احتمال انقراض گونه در آینده وارد می‌شود و اطلاعات کافی و مدونی در این زمینه و پیشینه جمعیت یا جمعیت‌ها در دست نیست در این راستا به مطالعات مشابه در سایر نقاط دنیا رجوع گردید (Gooch *et al.*, 2015).

مدل سازی مطلوبیت زیستگاهی و توزیع گونه

به منظور مشخص کردن متغیرهای مؤثر در انتخاب زیستگاه در این مناطق، متغیرهای زیستگاهی اندازه‌گیری شده (جدول ۱) بعنوان متغیر مستقل در مدل رگرسیون منطقی دوتایی به روش حذف کمینه یک به یک متغیرهای کم اثر مورد استفاده قرار گرفت. در این مدل آماری، از نقاط حضور و عدم حضور گونه به عنوان متغیر وابسته و متغیرهای زیستگاهی مختلف به عنوان متغیر مستقل استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن ضرایب رگرسیون منطقی از آماره‌ی والد و از آماره‌ی هاسمر لمشو برای بررسی تناسب برازش مدل با داده‌های بکار رفته در تولید آن استفاده گردید. روش صحت کلی (Liu et al., 2005) نیز برای بررسی بیشتر اعتبار مدل مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، درصد پیش‌بینی‌های صحیح مدل از نقاط حضور و عدم حضوری که در جریان تهیه مدل به‌کار گرفته نشده‌اند، به عنوان معیاری از صحت مدل استفاده می‌شود.

جدول ۱: متغیرهای مورد اندازه‌گیری در پلات‌های استقرار یافته

گروه متغیرها	نوع متغیر	نماد	نحوه سنجش
متغیرهای توپوگرافیکی	ارتفاع از سطح دریا	EL	با کمک GPS و نقشه
	طبقه شیب	SLP	
	طبقه جهت	AZM	
	طبقه ارتفاع	ELV	
متغیرهای پوشش گیاهی	غناى گونه‌ای	COI	
	ارتفاع متوسط	HGT	
	گونه‌های مهم در زادآوری	IMB	
	تیپ	TYP	
	حضور ایت‌های مورد تغذیه گونه	FEI	
	سطح پوشش	COV	
	تراکم	DEN	
فاصله‌های	فاصله تا نزدیکترین جاده، روستا و شهر	DIS	با استفاده از نقشه در محیط GIS
	فاصله تا نزدیکترین منبع آب	DIW	

در راستای مدل‌سازی توزیع گونه در مناطق مورد مطالعه و پیش‌بینی سایر نقاط احتمالی حضور گونه بر اساس داده‌های موجود از روش آنتروپی بیشینه استفاده گردید. بدین منظور نقاط حضور گونه در فایل اکسل با فرمت CSV آماده شده و به همراه لایه‌های زیستگاهی وارد نرم افزار گردیدند. سی درصد از داده‌ها برای آزمون اعتبارسنجی مدل کنار گذاشته شدند. از منحنی ROC برای ارزیابی صحت مدل (Palialexis et al., 2009) و سطح زیر منحنی (AUC) برای بررسی توانایی عملکرد مدل در تشخیص میان نقاط حضور و عدم حضور توسط آن استفاده گردید (Phillips et al., 2004).

در این پژوهش از چهار دسته از متغیرهای محیطی در مقیاس کلان در مدل‌سازی استفاده شد که شامل متغیرهای مربوط به تیپ پوشش سرزمین (Land cover)، ویژگی‌های پستی و بلندی، حضور انسان و متغیرهای آب و هوایی بوده است

(جدول ۲). با توجه به وابستگی بالای میش مرغ به تیپ‌های زراعی برای تامین نیازهای غذایی، در این پژوهش تیپ‌های زراعی به عنوان مهمترین متغیر مرتبط با تیپ پوشش سرزمین مورد توجه قرار گرفت. بدین منظور از نقشه پوشش اراضی تهیه شده در وزارت جهادکشاورزی استفاده و فاصله اقلیدسی تا لکه‌های زراعی در ArcGIS محاسبه شد. متغیرهای مربوط به حضور انسان نیز شامل فاصله از سکونتگاه‌های انسانی و فاصله تا جاده‌های اصلی با استفاده از نقشه‌های تهیه شده در سازمان نقشه‌برداری کشور به دست آمد. متغیرهای آب و هوایی نیز از بانک اطلاعات آب و هوایی (Hijmans *et al.*, 2005) به دست آمد. با توجه به همخطی بالای برخی از این متغیرها، فقط متغیرهای غیرهمبسته ($r < 0.8$) در مدل سازی مورد استفاده قرار گرفت. از متغیرهای ارتفاع از سطح دریا و شیب نیز به عنوان مهمترین متغیرهای تأثیرگذار بر نحوه توزیع ناهمواری‌ها و فیزیوگرافی سرزمین در مدلسازی استفاده شد. با توجه به اندازه سلول متغیرهای آب و هوایی با تفکیک حدود یک کیلومتر ($30 \text{ s} \times 30 \text{ s}$) جغرافیایی) سایر متغیرها نیز با همین اندازه سلول تهیه شدند.

جدول ۲: متغیرهای مورد استفاده در ایجاد مدل آنترپوی بیشینه در توزیع گونه مورد مطالعه

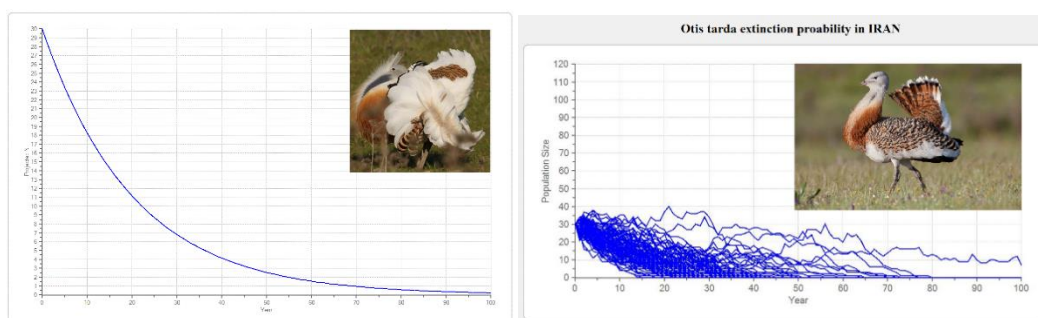
منبع	توصیف	متغیرهای پیش بینی کننده
USGS 2004	ارتفاع از سطح دریا	توپوگرافیک
USGS 2004	شیب	
FRWO 2002	فاصله تا نزدیکترین لکه زراعی	پوشش زمین
Frwo 2002	فاصله تا نزدیک ترین سکونتگاه ها	مداخلات انسانی
Frwo 2002	فاصله تا جاده ها	
Hijmans <i>et al.</i> , 2005	بارش سالیانه	بیوکلیماتیک
	فصلی بودن بارش	
	بارش در خشک ترین یک چهارم	
	بارش در پرباران ترین یک چهارم	
	میانگین دمای سالیانه	
	دما و تغییرات فصلی آن	
	میانگین دمای گرمترین ماه سال	
	میانگین دمای سردترین ماه سال	

نتایج

روند تغییرات فراوانی و توزیع جمعیت

بر اساس سرشماری های صورت پذیرفته و بررسی داده های پیشین روند جمعیت به شدت رو به کاهش بوده و حاکی از وضعیت بحرانی گونه در استان آذربایجان غربی به عنوان تنها مامن این پرند در کشور دارد. در پایشهای مکرر صورت پذیرفته (در یک دوره سیزده ماهه بین سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴) در استان‌های همدان و کردستان که در سال‌های گذشته از زیستگاه‌های فعال برای این گونه محسوب می‌شدند، فردی از این گونه ثبت نشد. در حال حاضر فراوانی جمعیت موجود در کشور که به

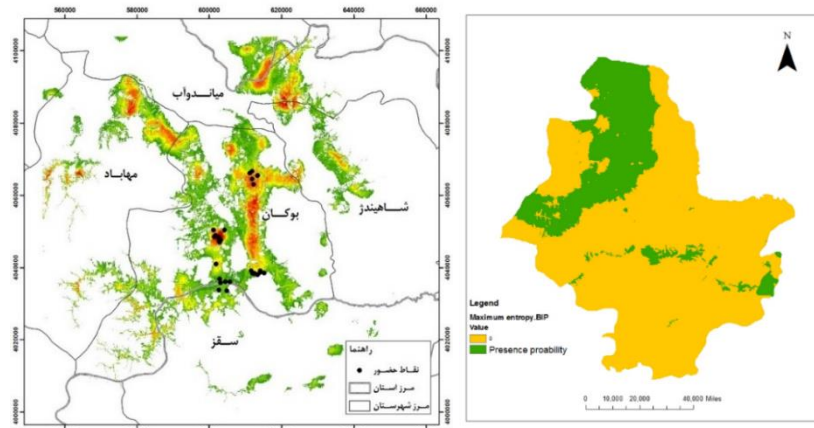
بخش‌هایی از شهرستان بوکان و احتمالاً کردستان محدود شده‌اند کمتر از ۳۰ فرد برآورد می‌گردد. بررسی داده‌های موجود در یک دوره ده ساله حاکی از روند خطی کاهش جمعیت با شیب نسبتاً ملایم می‌باشد. در تحلیل‌های انجام شده با نرم افزار ورتکس نسخه ده در خصوص احتمال انقراض میش مرغ در طی صد سال آتی به صورت زیر محاسبه گردید. در محاسبات انجام شده بر اساس جمعیت متشکل از ۳۰ فرد و یک جمعیت منحصربه فرد مشخص گردید که $r=-0.0494$ ، $\lambda=0.95$ و $R_0=0.80$ می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: مدلی که احتمال انقراض میش مرغ در ایران را نشان می‌دهد. بر اساس این مدل بعد از حدود ۱۳ تا ۱۵ سال آتی افت شدید جمعیتی در این گونه اتفاق می‌افتد و بعد از سی سال حداقل ۵۰ درصد فراوانی کاهش خواهد یافت. شکل سمت چپ روند کاهش فراوانی میش مرغ در ایران در صدسال آتی را نشان می‌دهد. در مقایسه دو روند می‌توان مشاهده نمود که جمعیت میش مرغ در ایران در صورتی که اقدامات احیای جمعیت انجام نشود و علل منجر به کاهش هرچه بیشتر فراوانی حذف نشود بسیار زوتر به انقراض کشانیده خواهد شد.

مدل سازی توزیع گونه و تناسب زیستگاه

با توجه به رفتار افراد این گونه، مختصات افراد مشاهده شده ثبت گردید به این ترتیب به طور کلی ۴۸ نقطه در محدوده حضور گونه در استان آذربایجان غربی (و دو نقطه در کردستان) ثبت گردید و مدل توزیع گونه به دست آمد (شکل ۳). در شکل ارائه شده میانگین کسب شده از ده تکرار نمایش داده شده است. نقشه توزیع بالقوه گونه نشان می‌دهد که ۷/۴۵ درصد کل منطقه مورد مطالعه (۴۳۷۹/۱ کیلومتر مربع) بیشترین مقدار تناسب را به خود اختصاص می‌دهد (دامنه بین ۰/۶ تا ۱) (جدول ۳).



شکل ۲: پیش‌بینی زیستگاه‌های مطلوب برای میش مرغ در مناطق حضور (سمت راست اجرا شده در نرم افزار مود اکو، و سمت چپ اجرا شده در بايومپر)

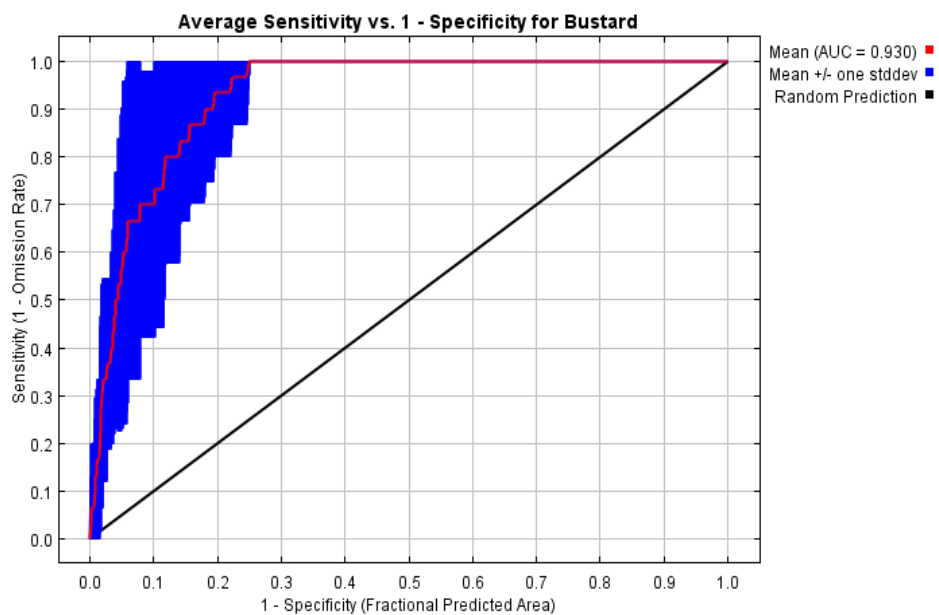
جدول ۳: مساحت و درصد احتمال توزیع زیستگاه‌های مطلوب تا نامطلوب

طبقه	مساحت به کیلومتر مربع	Maxent P-value	درصد
نامطلوب	۴۳۷۹	۰-۰/۳	۷۴/۷۸
با مطلوبیت متوسط	۱۰۴۴۵	۰/۳-۰/۶	۱۷/۷۷
مطلوبیت بالا	۴۳۹۵۵	۰/۶-۱	۷/۴۵

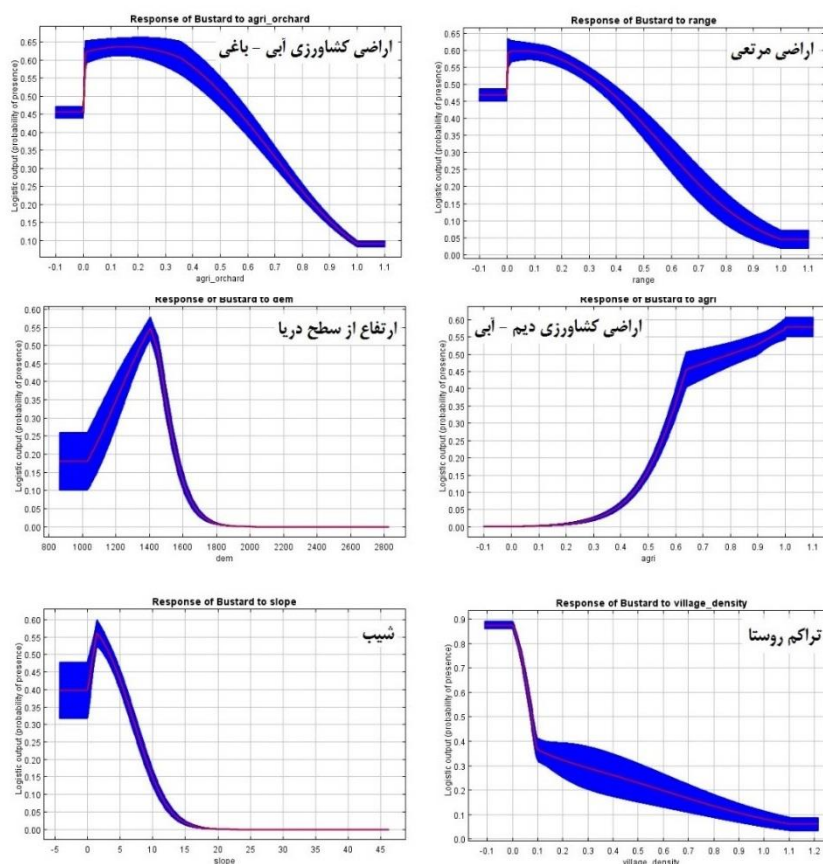
آزمون‌های مستقل از سطح آستانه نشان می‌دهند که مدل به خوبی توزیع گونه مورد مطالعه را پیش‌بینی نموده است.

مقدار میانگین AUC برای مدل تولید شده معادل ۰/۹۳۳ (شکل ۳) و مقدار انحراف معیار برای AUC نیز بسیار پایین بوده است

(۰/۰۱۵) که نشان دهنده مقدار همسانی در بین تکرارهای صورت گرفته است.

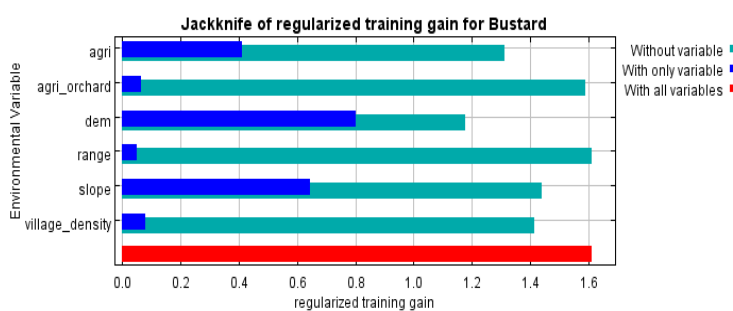


شکل ۳: منحنی ROC و مساحت زیر منحنی برای مدل ایجاد شده



شکل ۴: منحنی پاسخ (ROC) که نشان می دهد میش مرغ تحت تاثیر چه متغیرهایی می باشد

متغیرهای تاثیرگذار بر انتخاب زیستگاه با کمک نمودار جک نایف (شکل ۵) نشان می دهد ناهموازی های اراضی از مهمترین متغیرهای موثر در گزینش زیستگاه توسط این گونه می باشد. بعد از این متغیر، عامل شیب زمین و وجود اراضی زراعی از مهمترین متغیرهای تاثیرگذار بر حضور گونه محسوب می شوند.



شکل ۵: خروجی جک نایف بیانگر اهمیت متغیرها در مدل سازی است

متغیرهای زیستگاهی مهم در گزینش زیستگاه توسط گونه

تحلیل داده‌ها با آنالیز رگرسیون منطقی حاکی از آن است که حضور گونه به شدت تحت تاثیر قابلیت مصرف مواد غذایی در درجه بعد میزان پیوستگی پوشش گیاهی (پناه ایجاد شده) و فاصله حداکثری تا سکونتگاه‌های فعال انسانی است. فاصله تا نزدیکترین منبع آب و همچنین دوری از سکونتگاه‌های فعال انسانی و باغات درختی نیز یکی از فاکتورهای بسیار مهم در گزینش زیستگاه این گونه است. تحلیل داده‌های پلات‌های حضور و عدم حضور افراد حاصل از انجام رگرسیون منطقی به روش حذف یک به یک متغیرهای کم اهمیت نیز حاکی از ارتباط معنی‌دار بین انتخاب محل فعالیت و متغیر ماده‌ی غذایی، فاصله تا منابع آب، بوده است. میزان R^2 نشان دهنده توان بالای مدل در توجیه استفاده از زیستگاه در ارتباط با متغیرهای زیستگاهی است. در مدل مذکور ۹ متغیر وارد شده و در گام آخر متغیرهای ماده غذایی، فاصله تا منابع آب، پناه ایجاد شده با گیاهان، تراکم گیاهان و فاصله تا سکونتگاه‌های انسانی در مدل باقی ماندند (جدول ۵).

جدول ۵: نتایج آزمون رگرسیون منطقی برای داده‌های ثبت شده در پلاتهای حضور و عدم حضور

متغیرها	ضریب β	آماره Wald	$Exp(\beta)$	سطح معناداری	R مربع نایجگرک	خوبی برازش هوسمر لمشو
ماده غذایی	۰/۲۳۲	۲۳/۵۶	۰/۴۵۹	<۰/۰۰۱		
فاصله تا منابع آب	۰/۲۷۶	۱۰/۳۴	۰/۲۱۴	<۰/۰۰۵		۷/۸۷=مجدور کای
پناه ایجاد شده با گیاهان	۰/۱۶۵	۲۱/۴۳	۰/۳۶۵	<۰/۰۰۵	۰/۸۷۹	۴=درجه آزادی
تراکم گیاهان	۰/۳۵۴	۱۰/۸۰	۰/۵۶۶	<۰/۰۰۵		Sig. = ۰/۷۱۵
دوری از سکونتگاه‌های فعال انسانی	۰/۲۸۹	۱۸/۳۹	۰/۳۸۷	<۰/۰۰۵		

مساحت زیستگاه مطلوب به صورت زیر محاسبه گردید (جدول ۶). مساحت کل منطقه مورد مطالعه معادل ۱۲۱۰۳۳۹

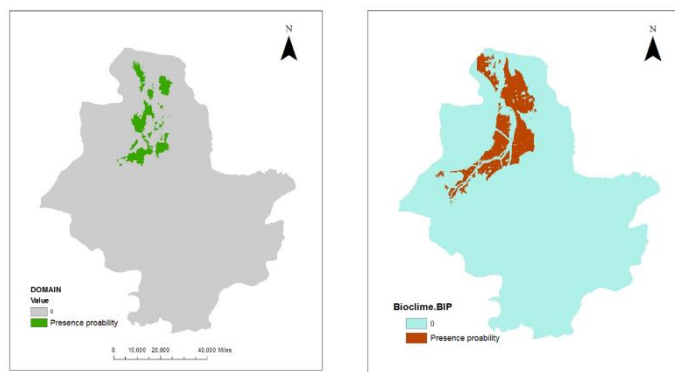
و مساحت زیستگاه مطلوب برابر ۱۰۰۰۱۲ هکتار برآورد شد.

جدول ۶: مساحت (هکتار) و سهم هر شهرستان از کل مناطق مطلوب (به درصد)

منطقه مورد بررسی	مناسب	نامناسب
میاندوآب	۱۰۸۹۱	۱۰/۸۹
مهاباد	۱۸۳۵۱	۱۸/۳۵
شاهین دژ	۷۴۰۰	۷/۴۰
بوکان	۴۹۶۰۴	۴۹/۶۰
سقز	۷۴۹۸	۷/۵۰
ملکان	۵۹۵۳	۷/۹۵

بررسی اعتبار مدل

میزان شاخص صحت کلی نشان داد که مدل قادر است حداقل ۸۹/۵ درصد نقاط حضور و عدم حضور که وارد مدل نشده بودند را به خوبی پیش بینی کند. نتایج حاصل از آزمون همبستگی نیز موید این نتیجه‌گیری است به نحوی که حاکی از وجود بالاترین میزان وابستگی بین حضور گونه و حضور منابع قابل تغذیه ($r_{bs} = 0.94, P < 0.001$) و تراکم پوشش گیاهی ($r_{bs} = 0.61, P < 0.001$) است. همچنین مدل سازی به شیوه‌های دیگر متکی بر داده‌های حضور از قبیل دامین، بایوکلایم و مکسنت در نرم افزار موداکو نیز خروجی‌های ذیل را به همراه داشت:



شکل ۸: خروجی مدل بایوکلایم (راست) و دامین (چپ)

متغیرهای تاثیرگذار بر انتخاب زیستگاه

بر اساس مدل‌های مورد استفاده برای بررسی و شبیه‌سازی زیستگاه میش مرغ مهمترین متغیرهای موثر در حضور و استفاده از زیستگاه توسط این گونه متغیرهای توپوگرافیک به ویژه شیب و حضور زیستگاه‌های کشاورزی زراعی علوفه‌ای (و نه باغات و درختی و درختچه‌ای) می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

مشاهدات نویسنده حاکی از آن است که بیش از ۸۰ درصد آمار مشاهدات میش مرغ در فصل بهار مربوط به مرکز زیستگاه یعنی دشت سوتاو می‌باشد. حد فاصل روستاهای ینگجه و آلبلاغ اراضی موسوم به دشت ینگجه و آلبلاغ که در یک تا دو کیلومتری شرق شهر بوکان واقع گردیده است زیستگاه پاییزه ی میش مرغ محسوب می‌شود. بعد از برداشت محصول اراضی دشت سوتاو معمولاً پرندگان میش مرغ به این دشت نقل مکان کرده و اغلب اوقات در فصل پاییز در این ناحیه مشاهده می‌شوند (اداره محیط زیست شهرستان بوکان، ۱۳۹۴). دشت ینگجه‌ی بوکان که یکی از زیستگاه‌های اصلی پاییزه ی میش مرغ به شمار می‌آید که در حد فاصل روستای ینگجه و در دو کیلومتری شرق شهرستان بوکان واقع گردیده است. تبدیل کشاورزی سنتی به صنعتی و تبدیل اراضی دیم به کشت آبی با استفاده از شبکه‌های آبیاری بارانی و قطره‌ای از عوامل تغییر زیستگاه و نقل مکان پرنده به مکان‌های دیگر محسوب می‌شود (Abdulkarimi et al., 2010).

در رابطه با تحلیل زیست‌مندی گونه در کشور مراکش تحقیق‌های زیادی صورت پذیرفته است (Palacín *et al.*, 2016) به بررسی جمعیت میش‌مرغ در مراکش پرداخت. در این مطالعه مشخص شد که در هر سال ۱۳ درصد کاهش جمعیت اتفاق می‌افتد و نرخ رشد هندسی این گونه ۰/۸۷ می‌باشد و اگر این روند ادامه یابد و تهدیدها متوقف نشوند این جمعیت در طی بیست سال آتی دچار انقراض خواهد شد. با مقایسه نمودار احتمال انقراض گونه در ایران با کشور مراکش به بحرانی بودن وضعیت گونه در ایران بیش از پیش می‌توان پی‌برد. با توجه به تحلیل صورت گرفته در خصوص جمعیت ایران می‌توان نتیجه مشابهی را اخذ نمود و در صورتی که اقدامات عاجلی صورت نپذیرد در آینده نه چندان دور باید شاهد انقراض این گونه باشیم. این پرنده در ایران با ریسک بسیار بالایی از انقراض روبه روست. لازم به ذکر است که میش‌مرغ در طبقات تهدید فهرست قرمز اتحادیه جهانی حفاظت در طبقه Vulnerable قرار می‌گیرد (BirdLife International, 2016) ولی در ایران امکان انقراض آن در مقیاس ملی وجود دارد کمااینکه این گونه در بسیار از نقاط کشور دچار انقراض محلی شده است؛ به عنوان مثال در استان‌های آذربایجان شرقی، همدان (در سال ۱۳۷۲ شانزده قطعه و در سال ۱۳۸۲ تعداد ۲۳ قطعه) و قسمت وسیعی از استان کردستان که سابقه ی حضور گونه ثبت شده بود این گونه کاملاً ریشه کن شده است (Amini-Tareh, 2000, Barati *et al.*, 2015). طبق آخرین برآوردها، این پرنده طی سال‌های گذشته به دلیل محدود شدن زیست‌گاه‌های طبیعی، شکار بی‌رویه و اختلال در مناطق زیست و تخمگذاری آن، در بسیاری از نقاط دنیا معرض تهدید انقراض قرار گرفته‌است. اثرات مستقیم فعالیت‌های کشاورزی در بوکان مربوط به هم‌زمانی سمپاشی با خارج شدن جوجه‌ها از تخم و طی مراحل رشد اولیه می‌باشد که به دلیل تأثیر مستقیم سم روی پرنده باعث از بین رفتن جوجه ی نوپا می‌شود. از بین رفتن حشرات مورد تغذیه‌ی میش‌مرغ در اثر سمپاشی نیز اثر غیرمستقیم استفاده از سموم آفت‌کش می‌باشد. فعالیت کمباین‌های دروکننده غلات که بر اساس عرف محلی در ساعات شبانگاهی صورت می‌گیرد موجب از بین رفتن جوجه‌ها می‌شود.

نتایج به دست آمده در این پژوهش در خصوص گزینش زیستگاه میش‌مرغ تفاوت زیادی با مطالعات پیشین در سایر نقاط دنیا به دنبال نداشت. ارجحیت اراضی شخم نخورده و رها شده ی کشاورزی توسط این پرنده در بسیاری از مطالعات پیشین مورد تاکید واقع شده است (Morales *et al.*, 2006). اجتناب از اراضی شخم خورده و تمرکز بیشتر در مزارع رها شده به میزان غذایی که نصیب جمعیت می‌شود بستگی دارد، عاملی که توسط تحلیل‌های صورت گرفته در این پژوهش نیز مورد تاکید قرار گرفت (Diaz & Telleria, 1994). مطالعات نشان می‌دهد که میش‌مرغ به صورت فصلی الگوی گزینش زیستگاه متفاوتی را ارائه می‌نماید (Alonso & Alonso, 1990, Palacín *et al.*, 1996). از مهمترین زیستگاه‌هایی که توسط این پرنده در سایر نقاط دنیا اشغال شده است می‌توان به مزارع حبوبات و غلات بیشتر مورد استفاده قرار گرفته و زیستگاه‌های کشت نشده کمتر مورد توجه این پرنده محسوب می‌شوند. بر اساس مطالعات پیشین، این پرنده از سکونتگاه‌های انسانی، جاده‌ها، خطوط انتقال نیرو، ریل‌ها اجتناب می‌نماید (Lane *et al.*, 2001). همان‌گونه که داده‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد حضور جمعیت این گونه در زیستگاه

اطراف شهرستان بوکان به واسطه کمتر بودن استرس‌های محیطی ناشی از حضور کمتر انسان در منطقه می‌باشد. پژوهش‌های انجام شده در شبه جزیره ی ایبری حاکی از آن است مطلوبیت زیستگاه این گونه توسط متغیرهایی از قبیل ارتفاع پایین از سطح آزاد دریاها، هموار بودن زیستگاه (دشتی بودن)، کشت غلات با تراکم نه چندان زیاد و حضور کمتر انسان و آشفتگی‌های انسانی تعیین می‌گردد (Suarez-seoane *et al.*, 2002). نتایج این بررسی نیز با این یافته‌ها مطابقت می‌نماید به طوری که زیستگاه انتخاب شده توسط جمعیت این پرنده از نظر آرامش و عدم وجود استرس‌های محیطی مرتبط با فعالیت‌های انسانی بهترین وضعیت را داشته و مزارع کشت حبوبات و غلات تنک در این مناطق، کاربری غالب اراضی محسوب می‌گردند. همچنین بر اساس منحنی‌های عکس‌العمل متغیرهای محیطی، عامل ارتفاع از سطح دریا و شیب نیز از عوامل مهم گزینش زیستگاه توسط گونه مورد مطالعه محسوب می‌گردند. افزایش ارتفاع به بالاتر از ۱۴۰۰ متر و افزایش شیب به بیش از پنج درصد باعث افت شدید مطلوبیت زیستگاهی می‌گردد و این مساله نشان می‌دهد توپوگرافی زیستگاه عامل مهمی در انتخاب آن محسوب می‌شود. البته لازم به ذکر است الگوی گزینش زیستگاه توسط این پرنده می‌تواند به تراکم جمعیت گونه نیز بستگی داشته باشد چراکه با افزایش تراکم جمعیت میزان کفایت منابع غذایی زیستگاه نیز نوسان نشان داده و الگوی گزینش زیستگاه توسط این گونه را دستخوش تغییر خواهد نمود (Gooch *et al.*, 2015).

احیای جمعیت میش مرغ

با توجه به این که گونه مورد مطالعه در کشور به شدت در معرض خطر انقراض می‌باشد، خرید محصول سرپا برای دو سال پیاپی یا ممنوعیت برداشت مکانیزه و پرداخت غرامت مهمترین اقدام در سال‌های اول می‌باشد. ممنوعیت استفاده از آفت کش‌ها، کودهای شیمیایی و آبیاری غرق آبی به مدت دو سال با هماهنگی با اداره جهادکشاورزی شهرستان یکی از اقداماتی است که به جد باید پی‌گیری شود. همچنین علامت گذاری خطوط انتقال نیرو با حلقه‌های پلاستیکی رنگی با هماهنگی با ادارات برق شهرستان و استان، باقی گذاشتن نوارهای میش مرغ در اراضی مختلف در صورت برداشت کلزا و یونجه به ویژه در دشت‌های غازلین، سوتاو و سکانیان را می‌توان جزو مهمترین اقدامات مورد نیاز در راستای احیای میش مرغ دانست. احداث امکانات زیربنایی برای تفریح و پرورش جوجه‌ها، خرید تجهیزات انکوباسیون پرتابل و ثابت، فنس‌کشی و آماده‌سازی بخشی از دشت‌های سوتاو و غازلین برای پرورش و نگهداری افراد و برنامه‌ریزی برای کشت و زرع از پروژه‌های اجرایی مورد نیاز برای نجات میش مرغ از ورطه انقراض می‌باشد. از سایر اقدامات ضروری می‌توان به این موارد اشاره نمود: کنترل طعمه‌خواران طبیعی (Langgemach, 2005)، برآورد دقیق جمعیت و بررسی مسیرهای جابجایی و مهاجرت، ترغیب کشاورزان برای کشت ارگانیک و عدم استفاده از سموم آفت کش، اجرای طرح‌های اشتغال‌زا و تولیدی مبتنی بر میش مرغ از قبیل صنایع دستی، مجلات، لباس، تمبر و ...، برگزاری کارگاه‌های آموزشی و توانمندسازی بومیان، اعزام تیمی تحقیق به کشورهای دارای تجربه مثل آلمان،

اتریش و انگلستان برای آموزش، تعریف طرح تبارشناسی جمعیت، انتقال تخم از نزدیکترین جمعیت (های) خارج از کشور پس از مطالعه تبارشناختی، کنترل منطقه و سایت با دوربین‌های مدار بسته.

میش مرغ در فروردین ماه فصل زادآوری را شروع می‌نماید و با توجه به اهمیت این دوران در موفقیت زادآوری در فصل بهار لازم است با پایش در یک دوره‌ی سه ساله، محدوده لک با بافر یک کیلومتری تعیین شده و تدابیری برای کاهش استرس محیطی در این منطقه اندیشیده شود. تفریح تخم‌ها در اواخر ادربهشت و اواسط خردادماه اتفاق می‌افتد که لازم است با زمان سنجی دقیق، در سال‌های آبی برنامه‌ریزی در خصوص تعویق زمان برداشت و باقی گذاشتن نوارهای میش مرغ انجام شود. لازم به ذکر است با پایش ماده‌ها و آشیان گزینی آنها باید عوامل موثر در آشیان گزینی به دقت مورد بررسی قرار گرفته و در برنامه مدیریت لحاظ شود. باقی گذاشتن محصولات زراعی هم قد یک میش مرغ (Nagy 2009) در حالت نشسته بر روی تخم (لکه‌های زیستگاهی دارای این خصوصیت) بسیار حائز اهمیت می‌باشد تا پناه مناسبی را برای اغنای این رفتار پرنده ایجاد نماید.

تقدیر و تشکر

این طرح با حمایت مالی اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان غربی انجام گردید. از مسئولین محترم این اداره کل و کلیه پرسنل زحمت کش آن و همچنین مسئول محترم وقت اداره محیط زیست شهرستان بوکان جناب آقای مهندس احمدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

نادری م. (۱۳۹۵) طرح پژوهشی اقدام ملی برای حفاظت از میش مرغ، اداره کل حفاظت از محیط زیست استان آذربایجان غربی، ۲۲۴ ص.

Abdulkarimi, R., Daneshyar, M. and Barati, A. (2010) Current status of the Great bustard *otis tarda* in Boukan, West Azerbaijan, Iran. *Podoces*, 5: 63–68.

Alonso, J.C. and Alonso, J.A. (1990) Para´-metros demográficos, seleccion de hábitat distribución de la Avutarda (*Otis tarda*) entres regiones espanolas. Madrid: ICONA.

Alonso, J.C., Palacín, C., Martín, C.A., Mouati M., Arhzaf, Z.L. and Azizi, D. (2005) The Great Bustard *Otis tarda* in Morocco: a reevaluation of its status based on recent survey results. *Ardeola*, 53:79–90

Amini-Tareh, H. (2000) The Status of Great Bustard *Otis tarda* in Iran. *Sandgrouse*, 22: 55–60.

Barati, A., Abdulkarimi, R. and Alonso, J.C. (2015) Recent status and population decline of the great bustard (*Otis tarda*) in Iran. *Bird Conservation International*, 25: 377–384.

BirdLife International (2016) *Otis tarda*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: accessed on 06 August 2017.

- Collar, N.J., Crosby, M.J. and Stattersfield, A.J. (1994) Birds to watch 2: the world list of threatened birds, vol 4. BirdLife Conservation, Cambridge.
- del Hoyo, J. Elliot, A. and Sargatal J. (1996) Handbook of the Birds of the World 3. Barcelona: Lynx Edicions.
- Díaz M. and Tellería J. L. (1994) Predicting the effects of agricultural changes in central Spanish croplands on seed-eating overwintering birds. Agriculture, Ecosystems & Environment, 49: 289-298
- Gooch, S., Ashbrook, K., Taylor, A. and Székely, T. (2015) Using dietary analysis and habitat selection to inform conservation management of reintroduced Great Bustards *Otis tarda* in an agricultural landscape. Bird Study, 62: 289–302.
- Hellmich, J. and Idaghdour, Y. (2002) The great bustard (*Otis tarda*) population in Morocco in 1998–2001. Bird Conservation International, 12: 19–33.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones P.G. and Jarvis A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology, 25: 1965-1978.
- Lane, S.J., Alonso, J.C. and Martín, C. A. (2001) Habitat preferences of great bustard *Otis tarda* flocks in the arable steppes of central Spain: are potentially suitable areas unoccupied? Journal of Applied Ecology, 38:193–203.
- Langgemach, T. (2005) Predation management to improve the reproductive success of the Great Bustard (*Otis tarda*) in Germany. Aquila, 112: 151–152.
- Link, W. A., and J. R. Sauer. (1998) Estimating population change from count data: application to the North American Breeding Bird Survey. Ecological Applications, 8: 258–268.
- Liu, C., Berry, P.M., Dawson, T.P. and Pearson, R.G. (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. Ecography, 28, 385–393.
- Morales, M.B., Suárez, F. and de la Morena, E.L.G. (2006) Response of steppe birds to various levels of farming intensity and of modification of the agricultural landscape: a comparative analysis of their effects on population density and habitat selection in the Little and Great Bustards (*Tetrax tetrax*) and *Otis tarda*. Revue D'Ecologie-La Terre et la Vie, 61:261–270.
- Nagy, S. (2009) International single species action plan for the Western Palaearctic population of Great Bustard, *Otis tarda*. Accessed: August 5, 2017.
- Palacín, C., Campos, B. and Pinilla, J. (1996) Demografía y uso del hábitat de la avutarda (*Otis tarda*) en Castilla-La Mancha. Pp. 183–190 in J. Fernández and J. Sanz-Zuasti, eds. Conservación de las aves esteparias y su habitat. Valladolid: Junta de Castilla y León.
- Palacín, C., Martín, B., Onrubia, A. and Alonso, J.C. (2016) Assessing the extinction risk of the Great bustard *Otis tarda* in Africa. Endangered Species Research, 30: 73– 82,
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. and Schapire, R.E. (2004) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecological modelling, 190: 231-59.
- Suárez-Seoane, S., Osborne, P. E. and Alonso, J. C. (2002) Large-scale habitat selection by agricultural steppe birds in Spain: identifying species–habitat responses using generalized additive models. Journal of Applied Ecology, 39:755–771.

Some biological and ecological peculiarities of the Great Bustard in Iran with emphasis on critically endangered situation of the species

M. Naderi^{1*}

Received: 2017.11.30

Accepted: 2018.1.31

Abstract

Great bustard as a globally threatened species faces extinction risk in Iran. Great Bustard's habitat is strongly destructed by agricultural activities and land use change. Urgent integrated activities are obligatory to save it from extinction vortex. Great bustard faces with different levels of threats that put it at the extinction risk like very low abundance, agricultural activities especially in the breeding season, waste mismanagement which attract wild and domestic predators, collecting and even touching the eggs. Stopping farm crops' harvest for three consecutive years, or to postpone harvesting time while keeping Great bustard strips, phylogenetic study to determine the closest donor population, waste management, predators controlling, species ringing and satellite tracking are some of the high priority activities should be considered.

Keyword: Threats, Conservation, Population change trend, Habitat modeling, Great Bustard

1- Assistant professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Arak University, Arak .

*(Corresponding Author: m-naderi@araku.ac.ir)

بررسی تاثیر یک دوره تمرینات هوازی و مصرف دارچین بر برخی عوامل خطرزای

قلبی-عروقی در زنان فعال

حمیده نخعی^۱، پروانه نظرعلی^۲، پریچهر حناچی^{۳*}، مهدی هدایتی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر یک دوره تمرین های هوازی و مصرف دارچین بر برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی در زنان فعال می باشد. ۲۸ نفر دانشجوی دختر رشته تربیت بدنی (سنین $22/36 \pm 2/02$ سال؛ وزن $59/80 \pm 7/17$ کیلوگرم؛ قد $162/40 \pm 6/60$ سانتی متر) به طور داوطلبانه انتخاب و به طور تصادفی به ۵ گروه: (۱) تمرین هوازی به همراه مصرف دارچین (۳) تمرین هوازی به همراه مصرف دارونما (۴) دارچین و (۵) کنترل تقسیم شدند. تمرین هوازی به مدت ۶ هفته و با شدت ($65-80$) $Vo2max$ انجام شد. در ابتدا و انتهای مطالعه نمونه های خونی جمع آوری گردید. داده ها در نرم افزار آماری SPSS 20 وارد شد و با استفاده از آزمون کروسکال والیس، ویلکاکسون در سطح معناداری ($p < 0/05$) مورد بررسی قرار گرفت. نیم رخ لیپیدی، قند خون و BMI در گروه تمرین هوازی به همراه مصرف دارچین تفاوت معنی داری نداشت ($p < 0/05$). نتایج این مطالعه نشان می دهد انجام فعالیت ورزشی با شدت ($65-80$) $Vo2max$ بیش از ۶ هفته با مصرف دارچین احتمالاً می تواند موجب بهبود نیم رخ لیپیدی، قندخون و شاخص توده بدنی گردد.

واژه های کلیدی: بیماری های قلب و عروق، نیم رخ لیپیدی، ورزش هوازی، ورزش

مقدمه

بیماری قلبی-عروقی بزرگترین علت مرگ و میر در جهان است که سالانه شمار آن به ۱۸ میلیون نفر می رسد (Abdulrahim & Imam Naji, 2010). تناسب اندام و تنظیم وزن، خطر بیماری های قلبی-عروقی را به شدت کاهش می دهد زیرا فشار خون شریانی در حد پایین تری حفظ می شود و لیپوپروتئین های با چگالی کم، کاهش و لیپوپروتئین های با چگالی زیاد، افزایش می یابد (Jay Lori et al., 2011; Modaresi, 2011). مطالعه صورت گرفته در حیوان و انسان نشان می دهد که ورزش منظم خطر

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: p.hanachi@alzahra.ac.ir

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون ریز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

بسیاری از بیماری های مزمن را از طریق مکانیسم هایی که به طور کامل شناخته نشده اند و مستقل از کاهش وزن یا بافت چربی می باشند، کاهش می دهد (Alam Khan & Muzafar, 2003). آگاهی از اصول تغذیه ای سالم و چگونگی استفاده درست از انواع گوناگون مکمل های غذایی، ورزشکاران را قادر می سازد تا در کنار شرایط بدنی خوب و تمرین های مرتب و درست به نتیجه دلخواه خویش برسند. امروزه توجه خاصی به افزودنی های غذایی مختلف شده است، این ترکیبات از این جهت جالب هستند که دارای منشأ گیاهی بوده و کاربرد وسیعی در رژیم های غذایی گوناگون دارند. مصرف غذاهای غنی از فلاونوئید، محافظت کننده انسان علیه بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو هم چون بیماری های قلبی-عروقی و سرطان هستند. در این بین، دارچین با نام علمی سی نامو زیلانیکوم (*Cinnamomum zeylanicum*) از پوست های خشک شده انواع گیاهان سی نامو زیلانیکوم و سی ناموم کاسیا و سیناموموم لوری رئی از تیره لوراسه، گیاهی سنتی است که بومی سریلانکا و مناطق جنوب شرقی هند می باشد. این گیاه یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی است که در طب سنتی به عنوان دارویی مهم کاربرد داشته است و نه فقط به عنوان چاشنی بلکه به دلیل داشتن خواص بیولوژیکی گوناگون هم چون ضد سرطان و ضد التهاب از قدیم الایام مورد استفاده بوده است (Modaresi, 2011 ; Ghasemi & Shaghaghi, 2002). این ماده، همچنین دارای خواص مختلف دارویی مانند آنتی اسپاسموتیک، ضد نفخ، ضد اسهال، شبه فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد باکتریایی می باشد. علاوه بر اینکه دارچین می تواند به تنهایی اثرات مفیدی داشته باشد، ورزشکاران نیز نیاز مند بعضی از این مکمل ها هستند (Ghasemi & Shaghaghi, 2002 ; Ashley *et al.*, 2012).

گیاهان (میوه ها، سبزیجات، گیاهان دارویی و غیره) دارای دامنه وسیعی از مولکول های پاکسازی کننده رادیکال های آزاد می باشند مانند: عناصر فنولیک مانند (اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، کنیون ها، کومارین، گنین ها، استیبلن ها، تانن ها) و عناصر نیتروژنی (آلکالوئیدها، آمین ها، بتالائین ها)، ویتامین ها، تروپونوئیدها (کارتنوئیدها) و برخی متابولیت های دیگر که فعالیت های ضد اکسایشی قوی دارند (Ashley *et al.*, 2012).

مصرف دارچین باعث بهبود متابولیسم چربی در محیط بدن می شود (Khan *et al.*, 2003). سطح بالای مواد آنتی اکسیدان موجود در دارچین سبب می شود تا این گیاه به عنوان محافظ سلول در برابر آسیب های شیمیایی شامل سموم محیطی، کاهش دادن پراکسیدهای لیپیدی و محافظت کبد، در برابر انواع استرس ها عمل کند. بدین ترتیب دارچین در پیشگیری و بهبود وضعیت های آنتی اکسیدانی در افراد چاق مبتلا به دیابت، بیماری های قلبی و سندرم متابولیک می تواند نقش موثری ایفا کند (Anderson, 2008 ; Durstin *et al.*, 2001; Yao & Vieira, 2007).

با توجه به اینکه از پوسته دارچین به عنوان چاشنی غذایی و یا در تهیه چای به طور گسترده استفاده می شود (Dehghan *et al.*, 2011) و این گیاه از نظر اجتماعی و اقتصادی مقرون به صرفه می باشد، می تواند توسط ورزشکاران و مربیان مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی، با آگاهی از فواید استفاده از مکمل های گیاهی، نسبت به مصرف داروها و مکمل های شیمیایی،

و این که مکمل‌های گیاهی از لحاظ درمانی فواید سودمندی برای حفظ سلامتی دارند، به نظر می‌رسد که تأثیر دارچین، که فواید آن از جنبه‌های درمانی ثابت شده است، در فعالیت ورزشی بر برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی مورد پژوهش قرار گیرد. نتایج این پژوهش می‌تواند موجب سلامتی، بهبود عملکرد و افزایش سطح آگاهی متخصصین امر تغذیه ورزشکاران شده و در سطوح مختلف مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل یکی از سوالاتی که مطرح می‌باشد این است که آیا مصرف دارچین با خواص آنتی‌اکسیدانی و شبه‌انسولینی می‌تواند بر میزان برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی اثر بگذارد؟

مواد و روش‌ها

طرح پژوهش از نوع پیش‌آزمون، پس‌آزمون با ۴ گروه تجربی و گروه کنترل بود و سپس متغیرهای مستقل بر روی گروه‌های تجربی اجرا شد. پژوهش حاضر در پاییز ۱۳۹۲ در سالن ورزشی باغ نو در دانشگاه الزهرا انجام شد و به منظور دسترسی به نمونه‌های پژوهشی، از دانشجویان تربیت بدنی دانشگاه الزهرا در تهران با محدوده سنی نرمال دعوت به عمل آمد. ۲۸ دانشجوی دختر رشته تربیت بدنی (سنین $22/36 \pm 2/02$ سال؛ وزن $59/80 \pm 7/17$ کیلوگرم؛ قد $162/40 \pm 6/60$ سانتی متر) به طور داوطلبانه انتخاب و به صورت تصادفی به ۵ گروه (۱ تمرین هوازی ۲ تمرین هوازی به همراه مصرف دارچین ۳ تمرین هوازی به همراه مصرف دارونما ۴ دارچین و ۵) کنترل تقسیم شدند. تمرین هوازی به مدت ۶ هفته و با شدت ۸۰-۶۵ درصد حداکثر ضربان قلب انجام شد. قبل از شروع پژوهش، علاوه بر توضیحات شفاهی و همچنین تأکید بر اهمیت حضور آزمودنی‌ها در این پژوهش رضایت‌نامه فردی برای انجام نمونه‌گیری خونی پیش‌آزمون و پس‌آزمون از داوطلبین دریافت گردید و در نهایت به طور تصادفی در گروه‌ها تقسیم شدند. یک روز قبل از اندازه‌گیری اولیه متغیرها (پیش‌آزمون) قد، وزن، چربی زیر پوستی و شاخص توده بدنی آزمودنی‌ها در حالی که حداقل پوشش را داشتند اندازه‌گیری گردید و فشار خون آزمودنی‌ها بررسی شد و برای محاسبه حداکثر اکسیژن مصرفی از تست پله کوبین استفاده گردید. همچنین برای برآورد توان هوازی از آزمودنی‌ها، تست یک مایل مورد استفاده قرار گرفت. برای انتخاب گروه‌ها از آزمودنی‌ها تست یک مایل توان هوازی گرفته شد و به طور تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند.

در روز بعد آزمودنی‌ها پس از ۲۴ ساعت قبل از شروع تمرین و ۱۲ ساعت ناشتای، در یک ساعت معین به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده تربیت بدنی دانشگاه الزهرا مراجعه کردند و از هر نفر ۱۰ سی‌سی خون برای بررسی نیم رخ چربی، قند خون در مرحله پیش‌آزمون از هر فرد در حالت ناشتا توسط کارشناس آزمایشگاه گرفته شد. پس از خون‌گیری، بلافاصله نمونه‌ها جهت جدا سازی سرم خونی برای تعیین شاخص‌های خونی مورد نظر با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه پژوهشکده متابولیسم و غدد منتقل گردید. نمونه‌های خونی در سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم از خون جدا شد و پس از آن در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه تا زمان اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی نگهداری گردید. پس از

خون گیری در پیش آزمون، آزمودنی های گروه هوازی و گروه هوازی به همراه مکمل دارچین و گروه هوازی به همراه دارونما، به مدت ۶ هفته تمرین های هوازی انجام دادند و گروه مکمل دارچین به مدت ۶ هفته روزانه یک گرم مکمل دارچین مصرف کردند؛ به این طریق که، روزانه یک گرم مکمل دارچین را که شامل دو کپسول ۵۰۰ میلی گرمی بود بر اساس پژوهش لمیر و همکاران به همراه نهار و شام مصرف نمودند (Rashidlamir et al., 2012). کپسول ها از شرکت تولید ژلاتین کپسول ایران خریداری شد که از نظر رنگ، شکل، جنس و اندازه مشابه بودند. پودر کپسول های حاوی دارچین، از شرکت هاتی کارا تهیه شد و بر اساس استانداردهای فرماکوپه ای دارویی تحت شرایط کنترل شده قرار گرفت. در نهایت، در آزمایشگاه دانشگاه الزهراء در داخل هر کپسول مقدار ۵۰۰ میلی گرم دارچین ریخته شد و تمامی کپسول ها در کیسه های پلاستیکی در دمای اتاق نگهداری گردید. این گروه همزمان در برنامه تمرینی گروه فعالیت هوازی شرکت نمودند و گروه کنترل نیز مداخله خاصی نداشتند و آزمودنی ها چون از دانشجویان خوابگاهی انتخاب شدند از رژیم غذایی نسبتاً یکسانی پیروی می کردند.

برنامه تمرینی هوازی بر اساس حداکثر ضربان قلب طراحی شد. حداکثر ضربان قلب، بالاترین ضربان قلبی است که فرد در حین حداکثر فعالیت خود به حالت واماندگی می رسد که بر اساس فرمول سن-۲۲۰ محاسبه می شود. برنامه تمرین هوازی در مدت ۶ هفته، هر هفته ۳ جلسه انجام گرفت. تمرین ها در هفته اول با شدت ۶۵ درصد حداکثر ضربان قلب و به مدت ۴۰ دقیقه شروع شد، در هفته دوم و سوم به ۷۰ درصد حداکثر ضربان قلب و به مدت ۴۰ و ۴۵ دقیقه رسید، در هفته چهارم و پنجم با شدت ۷۵ درصد حداکثر ضربان قلب و به مدت ۴۵ و ۵۰ دقیقه و در نهایت در هفته ششم با شدت ۸۰ درصد حداکثر ضربان قلب و به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. مراحل شامل ۵ دقیقه گرم کردن، ۳۰-۴۰ دقیقه فعالیت اصلی تمرین ها شامل: دویدن های متنوع _ حرکات پایه ای ایروبیک و استراحت یک ونیم دقیقه بین هر مرحله- ایستگاهی و ۵ دقیقه سرد کردن بود. در هر مرحله از تمرین، شدت فعالیت با ضربان سنج Sunnto با ساعت مچی و belt مربوطه اندازه گیری شد (Masoodsinaki et al., 2014).

جدول ۱: برنامه تمرینی

هفته	شدت تمرین	حجم تمرین
هفته اول	۶۵٪ حداکثر ضربان قلب	۴۰ دقیقه
هفته دوم	۷۰٪ حداکثر ضربان قلب	۴۰ دقیقه
هفته سوم	۷۰٪ حداکثر ضربان قلب	۴۵ دقیقه
هفته چهارم	۷۵٪ حداکثر ضربان قلب	۴۵ دقیقه
هفته پنجم	۷۵٪ حداکثر ضربان قلب	۵۰ دقیقه
هفته ششم	۸۰٪ حداکثر ضربان قلب	۵۰ دقیقه

در پایان ۶ هفته تمرین، بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی و حداقل ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین خون گیری دوم

انجام گرفت. بار دیگر اندازه گیری های پیش آزمون در پس آزمون با ۵ گروه در شرایط یکسان تکرار شد. شاخص های تری

گلیسرید، کلسترول، LDL و HDL با استفاده از کیت رنگ سنجی آنزیمی اندازه گیری شد. داده‌ها در نرم‌افزار آماری SPSS 20 وارد شدند. در بخش توصیفی از جدول توزیع فراوانی و شاخص‌های توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، حداقل مقدار، کمترین مقدار) و نمودار استفاده شد. ابتدا داده‌ها با استفاده از آزمون اسمیرنوف کولموگروف از نظر برخورداری از توزیع نرمال بررسی و از توزیع نرمال برخورداری بودند؛ ولی، به دلیل کم بودن داده‌ها از آزمون‌های آماری ناپارامتریک کروسکال والیس، ویلکاکسون در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

از نظر آماری، تفاوت معناداری در میانگین تغییرات سطح نیم رخ‌های لیپیدی پلازما در زنان ۵ گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتیجه آزمون کروسکال والیس نشان داد که از نظر آماری تفاوت معناداری در میانگین تغییرات میزان قند خون در زنان ۵ گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین وجود نداشت ($p > 0/05$). در میانگین تغییرات BMI در زنان ۵ گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین تفاوت معناداری وجود نداشت ($p > 0/05$).

جدول ۲: توصیف گروه براساس میانگین سن، وزن، قد، شاخص توده بدنی، نسبت دور کمر به باسن، درصد چربی و $vo_2 \max$ در زنان ۵ گروه مورد مطالعه

مولفه	گروه	میانگین \pm انحراف استاندارد
سن (سال)	دارو نما و تمرین	۲۲/۱ \pm ۴۰/۶۷
	مکمل و تمرین	۲۱/۱ \pm ۸۰/۴۸
	مکمل	۲۱/۱ \pm ۵۰/۰۵
	تمرین	۲۱/۲ \pm ۵۰/۰۷
	کنترل	۲۴/۲ \pm ۵۰/۲۶
قد (سانتیمتر)	دارو نما و تمرین	۱۵۸/۶ \pm ۲۰/۸۷
	مکمل و تمرین	۱۶۲/۰۴ \pm ۵
	مکمل	۱۶۰/۴ \pm ۶۷/۶۸
	تمرین	۱۶۳/۶ \pm ۵۰/۷۵
	کنترل	۱۶۶/۷ \pm ۸۳/۹۱
وزن (کیلوگرم)	دارو نما و تمرین	۵۷/۵ \pm ۶۶/۴۱
	مکمل و تمرین	۶۳/۹ \pm ۱۲/۰۹
	مکمل	۶ \pm ۶۰/۱۹
	تمرین	۵۵/۹ \pm ۷۷/۴۵
	کنترل	۶۲/۳ \pm ۶۲/۹۸
شاخص توده بدنی (kg/m^2)	دارو نما و تمرین	۲۳/۳ \pm ۲۵/۹۳
	مکمل و تمرین	۲۳/۲ \pm ۹۷/۴۸
	مکمل	۲۳/۲ \pm ۲۹/۸۴
	تمرین	۲۰/۲ \pm ۷۱/۴۶
	کنترل	۲۵/۷ \pm ۲۲ ۱/۹۷
نسبت دور کمر به باسن (سانتی‌متر)	دارو نما و تمرین	۰/۰ \pm ۸۲/۰۴
	مکمل و تمرین	۰/۰ \pm ۸۱/۰۷

مکمل	۰/۰±۸۱/۰۵
تمرین	۰/۰±۷۹/۰۴
کنترل	۰/۰±۷۶/۰۷
دارو نما و تمرین	۳۲/۲±۷۹/۴۷
مکمل و تمرین	۳۳/۱±۴۵/۹۱
مکمل	۳۳/۱±۸۶/۴۴
تمرین	۳۴/۲±۹۰/۲۱
کنترل	۳۲/۰±۷۹/۸۹
دارو نما و تمرین	۱۹/۲±۸۹/۹۲
مکمل و تمرین	۲۰/۴±۸۹/۵۶
مکمل	۲۰/۴±۴۶/۱۲
تمرین	۱۷/۴±۸۳/۲۹
کنترل	۲۱/۳±۵۳/۷۱

VO2 max (میلی لیتر بر دقیقه)

درصد چربی

جدول ۳: مقایسه میانگین تغییرات نیم رخ لیپیدی (mg/dl) در زنان گروه‌های مختلف مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین

نتیجه آماری	میانگین ± انحراف استاندارد	گروه	نیم رخ لیپیدی
$x^2=۳/۱۲$ $df=۴$ $p=۰/۵۴$	۲/۲۹±۶۰/۵۸	دارو نما و تمرین	گلیسرید
	۲۱/۴۱±۶۰/۸۵	مکمل و تمرین	
	۲۴/۳۲±۳۳/۷۹	مکمل	
	۳۶±۱۱/۱۶	تمرین	
$x^2=۰/۶۵$ $df=۴$ $p=۰/۹۷$	-۱/۳۸±۵۰/۲۹	کنترل	کلسترول
	۳/۱۴±۲۰/۴۳	دارو نما و تمرین	
	۲/۱۶±۴۰/۰۹	مکمل و تمرین	
	۵/۱۲±۶۷/۴۲	مکمل	
$x^2=۱/۶۱$ $df=۴$ $p=۰/۸۱$	-۴/۳۵±۱۷/۶۷	تمرین	LDL
	-۱/۲۶±۳۳/۸۸	کنترل	
	۱۱/۱۳±۶۸/۱۱	دارو نما و تمرین	
	۲/۱۸±۰۲/۰۴	مکمل و تمرین	
$x^2=۷/۸۰$ $df=۴$ $p=۰/۱۰$	۳/۱۳±۲۷/۱۱	مکمل	HDL
	۰/۲۸±۰۲/۳۱	تمرین	
	-۰/۲۳±۳۵/۵۲	کنترل	
	-۸/۲±۱۲	دارو نما و تمرین	
$x^2=۷/۸۰$ $df=۴$ $p=۰/۱۰$	-۴/۳±۱۴/۴۳	مکمل و تمرین	HDL
	-۲/۴±۳۲/۴۳	مکمل	
	-۶/۸±۳۸/۱۵	تمرین	
	-۰/۶±۵۵/۴۸	کنترل	

جدول ۴: مقایسه میانگین تغییرات سطح گلوکز خون (mg/dl) در زنان ۵ گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین

نتیجه آزمون آماری	میانگین \pm انحراف استاندارد	گروه
	۳/۵ \pm ۸۰/۲۶	دارو نما و تمرین
$x^2=۵/۳۴$	۱/۵ \pm ۲۰/۸۹	مکمل و تمرین
df=۴	۱۱/۶ \pm ۳۳/۹۸	مکمل
p=۰/۲۵	۱۰/۱۵ \pm ۳۳/۸۳	تمرین
	۵/۱۵ \pm ۶۷/۱۹	کنترل

جدول ۵: مقایسه میانگین تغییرات شاخص توده بدنی (kg/m²) در زنان ۵ گروه مورد مطالعه قبل و بعد از تمرین

نتیجه آزمون آماری	میانگین \pm انحراف استاندارد	گروه
	۰/۰ \pm ۰۴/۵۳	دارو نما و تمرین
$x^2=۸/۶۷$	۰/۰ \pm ۲۶/۱۰	مکمل و تمرین
df=۴	۰/۰ \pm ۱۶/۱۵	مکمل
p=۰/۰۷	۰/۰ \pm ۰۷/۱۹	تمرین
	-۰/۰ \pm ۰۰۸/۰۵	کنترل

بحث

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر ۶ هفته تمرین هوازی به همراه مصرف دارچین بر شاخص های نیم رخ لیپیدی، قند خون و شاخص توده بدنی زنان فعال انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مصرف مکمل دارچین به همراه تمرین هوازی بر HDL، LDL، تری گلیسرید، کلسترول، قند خون و شاخص توده بدنی هیچ گونه اثر معنی داری ندارد. به طور کلی، پس از فعالیت ورزش استقامتی مقادیر تری گلیسرید خون کاهش می‌یابد. این تغییرات به مقادیر قبل از تمرین بستگی دارد؛ ولی، موضوع مهم آن است که مقدار تری گلیسرید خون به حجم فعالیت ورزشی در هفته نیز مربوط است. در مطالعه ورزشی، معلوم شد در اشخاصی که قبل از شروع فعالیت بدنی مقادیر تری گلیسرید بالاتری داشتند، پس از خاتمه فعالیت ورزشی، مقادیر تری گلیسرید کاهش بیشتری داشت (Jay Lori et al., 2011). در مطالعه دیگری که مقادیر تری گلیسرید خون در دامنه طبیعی بود (حدود ۱۳۰ میلی گرم در دسی لیتر قبل از فعالیت ورزش)، مقادیر تری گلیسرید به دنبال برنامه فعالیت ورزشی ۱۲-۳ ماه طول کشید تا کاهش یابد؛ ولی، مقدار تغییر تری گلیسرید به اندازه افرادی نبود که قبل از فعالیت ورزشی مقادیر تری گلیسرید بالاتری داشتند.

یافته‌های آزمون نشان می‌دهد که با یافته‌های پژوهش‌های تیم و همکاران (Tim et al., 2006) و لمیر و همکاران (Rashidlamir et al., 2012) هم سو می‌باشد؛ اما، با یافته‌های نتایج تانگلو و همکاران (Tinglua et al., 2012)، الجمال و

(Abdulrahim & Imam Naji, 2010)، علم خان و همکاران (Alam Khan & Muzafar, 2003) ناهمسو است.

بیشتر مطالعات نشان می دهند که فعالیت ورزشی کلسترول خون را تغییر نمی دهد (Durstin *et al.*, 2002). ولی تحت شرایط معینی کلسترول خون پس از فعالیت ورزشی کاهش می یابد؛ برای مثال، هنگامی که برنامه ورزشی را شروع می کنیم، تغییراتی در رژیم غذایی ما صورت می گیرد و آن کاهش مصرف چربی های غذایی است. این تغییر اگر با فعالیت ورزشی همراه باشد، کلسترول خون را کاهش می دهد. دومین مورد، محدودیت مقدار کالری دریافتی هنگام شروع برنامه فعالیت ورزشی و در نتیجه کاهش وزن بدن است. در این مورد، کلسترول خون نیز کاهش می یابد. برای آنکه کاهش کلسترول خون با فعالیت ورزشی رخ دهد، کاهش چربی غذایی یا وزن بدن اجتناب ناپذیر است.

یافته های آزمون نشان می دهد که با یافته های پژوهش های تیم و همکاران (Tim *et al.*, 2006) همسو است و با یافته های پژوهش الجمال و همکاران (Abdulrahim&Imam Naji, 2010) و لمیر و همکاران (Rashidlamir *et al.*, 2012)، علم خان و همکاران (Alam Khan & Muzafar, 2003)، تانگلو و همکاران (Ting lua *et al.*, 2012) و سونیا و همکاران (Sonia *et al.*, 2011) ناهمسو می باشد.

LDL ابزار اصلی به حرکت درآوردن کلسترول خون است. LDL در افرادی که رژیم غذایی پر چرب به ویژه چربی های اشباع شده (چربی های حیوانی) دارند یا در افرادی که به لحاظ ژنتیکی LDL زیادی دارند افزایش می یابد. برخی شواهد نشان می دهند فعالیت ورزشی منظم تعداد ذره های LDL ریز را کاهش می دهد، در نتیجه خطر بیماری های قلبی کاهش می یابد. مطالعه ای که به تازگی در مردان سالم ولی تا حدودی دارای اضافه وزن انجام شد، نشان داد که یک سال پس از شروع فعالیت بدنی، تعداد ذره های LDL ریز تغییر می کند (Durstin *et al.*, 2002). هر چند کاهش تعداد LDL ریز از نظر آماری مهم نیست ولی مقدار فعالیت ورزشی هفتگی به همراه کاهش چربی با کاهش تعداد ذره های LDL ریز ارتباط معنی داری دارد. دومین مطالعه نشان داد که مقدار تری گلیسرید خون و تعداد ذره های LDL ریز در مردانی که از لحاظ بدنی فعال اند کاهش می یابد (Alam Khan & Muzafar, 2003). در این زمینه تحقیقات زیادی لازم است، ولی جان کلام این است که افزایش فعالیت بدنی و کاهش وزن بدن، بر ذره های LDL ریز تاثیر می گذارند و موجب کاهش خطر بیماری های قلبی می شوند.

همچنین یافته های آزمون نشان می دهد که با یافته های پژوهش های تانگلو و همکاران (Ting lua *et al.*, 2012)، تیم و همکاران (Tim *et al.*, 2006) و لمیر و همکاران (Rashidlamir *et al.*, 2012) همسو می باشد و با نتایج بدل زاده و همکاران (Badalzadeh *et al.*, 2014)، سونیا و همکاران (Sonia *et al.*, 2013)، الجمال و همکاران (Abdulrahim&Imam Naji, 2010)، علم خان و همکاران (Alam Khan & Muzafar, 2003) ناهمسو است. درست مثل دیگر لیپوپروتئین ها، HDL نیز به عوامل ژنتیکی و محیطی بستگی دارد. عواملی که مقادیر HDL را افزایش می دهند عبارتند از فعالیت ورزشی، کاهش برخی آثار رژیم

غذایی، کاهش وزن بدن و تغییر ترکیب بدنی. به طور کلی، HDL به فعالیت ورزشی استقامتی واکنش نشان می‌دهد و با توجه به مقدار ورزش، مقادیر HDL افزایش می‌یابد.

این بدان معناست که هر چه مقدار فعالیت ورزشی HDL نیز بیشتر افزایش می‌یابد. برنامه تمرین فعالیت ورزشی باید دست کم دوازده هفته اجرا شود تا مقادیر HDL افزایش یابد. دامنه افزایش HDL ناشی از فعالیت ورزشی معمولاً ۴ تا ۲۲ درصد است، در حالی که دامنه مقادیر واقعی آن ۲ تا ۸ میلی گرم در دسی لیتر است. در افرادی که ژنتیک سبب پاسخ کمتر آنان شده است، فعالیت ورزشی استقامتی در افزایش HDL خون تاثیر نداشته است (Soleimani *et al.*, 2011).

در صد چربی بدن عامل دیگری است که در تغییر HDL ناشی از فعالیت ورزشی نقش دارد. کاهش چربی بدن با افزایش HDL ارتباط دارد. از نظر علمی، این رابطه رابطه معکوس است، زیرا عاملی (چربی خون) کاهش و عامل دیگر (HDL) افزایش می‌یابد. کاهش وزن بدن با محدودیت کالریایی و فعالیت ورزشی ارتباط دارد و درصد چربی بدن را کاهش می‌دهد. این یکی به نوبه خود با افزایش مقادیر HDL ارتباط دارد. موضوع مهم این است که وقتی رژیم های غذایی کم کالری با فعالیت ورزشی ترکیب می‌شوند، تغییرات بیشتری در ترکیب بدنی و HDL رخ می‌دهد. افزایش HDL بر اثر فعالیت ورزشی، در بود و نبود کاهش چربی بدن رخ می‌دهد و فعالیت ورزشی بدون تغییر وزن یا ترکیب بدنی HDL را افزایش می‌دهد، ولی اگر چربی بدن را کاهش دهد، این افزایش بیشتر می‌شود (Abdulrahim & Imam Naji, 2010).

در نتیجه، یافته های آزمون نشان می‌دهد که با یافته های پژوهش های تانگلو و همکاران (Ting lua *et al.*, 2012)، تیم و همکاران (Tim *et al.*, 2006) و سونیا و همکاران (Sonia *et al.*, 2013) همسو است و با نتایج بدل زاده و همکاران (Badalzadeh *et al.*, 2014)، الجمال و همکاران (Abdulrahim & Imam Naji, 2010)، علم خان و همکاران (Alam Khan & Muzafar, 2003) ناهمسو می‌باشد.

برای تغییرات HDL، چندین ماه فعالیت ورزشی منظم و هزینه هفتگی ۱۵۰۰-۱۲۰۰ کیلوکالری انرژی لازم است. از لحاظ بدنی افرادی که غیر فعال اند، فعال شدن باعث برخی تغییرات در لیپید و لیپوپروتئین می‌شود، باید فعالیت بدنی و فعالیت ورزشی بیشتری را به طور منظم انجام دهند. هر چه فعالیت ورزشی بیشتری انجام شود، احتمالاً تغییر لیپید و لیپوپروتئین بیشتر است. شدت جلسه فعالیت ورزشی مهم است. شدت فعالیت ورزشی در مطلوب سازی تغییرات لیپید و لیپوپروتئین نقش دارد؛ ولی مورد مهمتر، حجم فعالیت ورزشی است. فعالیت سریع و سخت موجب می‌شود حجم فعالیت ورزشی در یک دوره زمانی بیشتر شود. دامنه شدت مناسب فعالیت ورزشی بین ۶۰-۴۰ درصد حداکثر مقدار فعالیت ورزشی است. در نهایت، بدن برخی افراد به افزایش فعالیت بدنی و برنامه فعالیت ورزشی با بهتر شدن نیم رخ لیپیدی و لیپوپروتئین خون پاسخ می‌دهد، ولی برخی اینگونه نیستند. عوامل بسیاری در نیم رخ لیپیدی و لیپوپروتئین موثراند که یکی از آنها ژنتیک است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد بیشتر افراد به فعالیت ورزشی پاسخ می‌دهند (پاسخگویان)؛ در حالی که، تعداد کمی از افراد به فعالیت ورزشی پاسخ نمی‌دهند یا

کمتر از مقداری که برای تغییرات لیپید و لیپوپروتئین بهینه لازم است پاسخ می دهند، این افراد را بی پاسخ گویند می نامند (Jay Lori et al., 2011).

در نتیجه، با توجه به محدودیت های پژوهش، امکان خطا و نتایج ضد و نقیض پژوهش های پیشین، باید تامل بیشتری در این نتایج کرد. در مورد اثر ورزش به همراه مصرف مکمل دارچین بر قند خون نیز یافته های ضد و نقیضی وجود دارد. پورتر و همکاران گزارش کرده اند که مصرف مکمل دارچین (۶ گرم) قبل از ۹۰ دقیقه دوچرخه سواری تاثیر معنی داری بر کاهش قند خون نسبت به گروه کنترل ندارد که این یافته ها با یافته های پژوهش حاضر همسو است. برخلاف یافته های پژوهش حاضر لمیر و همکاران (Rashidlamir et al., 2012) در پژوهش خود اعلام داشتند که مصرف یک گرم دارچین به مدت ۴ هفته به همراه تمرین هوازی بر کاهش قند خون تاثیر معنی داری دارد.

مطالعه جتمیر و همکاران (Jean Jitomir, 2009) نشان داد که ۵۰ دقیقه تمرین استقامتی سخت به همراه مصرف دارچین بر روی ۱۰ زن بی تحرک می تواند منجر به کاهش معنی داری در قند خون ناشتا شود که با پژوهش حاضر همسو نیست و مصرف دارچین موجب کنترل قند خون نمی شود. در پژوهش خان و همکاران (Alam Khan & Muzafar, 2003) که بیماران مبتلا به دیابت نوع دو روزانه ۶، ۳، ۱ گرم دارچین را به مدت ۴۰ روز مصرف کردند منجر به کاهش معنی داری در گلوکز خون ناشتا شد که با نتایج این پژوهش نا همسو می باشد؛ همچنین، در پژوهش زحمتکش و همکاران (Zahmatkesh et al., 2011) مصرف روزانه یک گرم دارچین در بیماران دیابتی بعد از ۸ هفته در گروه دارچین نسبت به گروه دارونما معنی دار نبود. در مطالعه ای دیگر که توسط بلیوس و همکاران در آمریکا انجام شد، نتایج مصرف یک گرم در روز دارچین به مدت ۳ ماه بر روی سطح گلوکز خون نشان داد که کاهش معنی داری در گلوکز خون وجود ندارد. در پژوهش الجمال و همکاران (Abdulrahim & Imam Naji, 2010) روزانه ۶ گرم دارچین به مدت ۴ هفته در افراد دیابتی موجب کاهش معنی داری در گلوکز خون شد، که با این پژوهش نا همسو می باشد. همچنین در پژوهش اشلی و همکاران (Ashley et al., 2012) مصرف یک گرم دارچین به مدت ۱۲ هفته به طور معنی داری قند خون را کاهش داده است که با نتایج پژوهش حاضر نا همسو است.

با توجه به اینکه میزان گلوکز خون آزمودنی های پژوهش حاضر در سطح طبیعی قرار دارد که خود به دلیل توازن موجود در سوخت و ساز گلوکز می باشد، این توازن توسط عصاره دارچین نه تنها به هم نخورده بلکه نشان دهنده عدم دخالت در انباشت گلوکز به فرم گلیکوژن است. این تایید کننده این مطلب است که ترکیبات دارچین تنها در میزان جذب گلوکز به داخل سلول دخالت دارد و باعث به هم خوردن مکانیزم های ساخت گلیکوژن نمی گردد. لذا به نظر می رسد که ترکیبات موثر دارچین تنها زمانی بر میزان گلوکز خون تاثیر می گذارد که غلظت گلوکز در حد بالاتر رفته و اصطلاحاً هایپر گلاسمی اتفاق افتاده باشد (Vafa et al., 2012).

یافته‌های پژوهش وفا و همکاران (Vafa *et al.*, 2012) نشان می‌دهد، مصرف ۳ گرم دارچین به مدت ۸ هفته به طور معنی‌داری BMI را کاهش می‌دهد که با یافته پژوهش حاضر مغایرت دارد، اما با پژوهش لمیر و همکاران (Rashidlamir *et al.*, 2012) که در آن، یک گرم دارچین به مدت چهار هفته توسط افراد دیابتی مصرف شد و همچنین با پژوهش مشهدی و همکاران (Shokri mashhadi *et al.*, 2013) که در آن ورزشکاران ۱/۵ گرم دارچین را به مدت ۶ هفته مصرف کردند همسو می‌باشد. با توجه به پیشینه پژوهش احتمالا علت به دلیل مدت زمان کم دوره و شدت پایین تمرین می‌باشد.

به تازگی معلوم شده است عوامل محیطی و ژنتیکی بسیاری بر حرکت لیپو پروتئین به سوی بافت‌های مختلف بدن و مقدار تری‌گلیسریدها و کلسترول خون تاثیر گذارند. این عوامل عبارتند از: پیری، توزیع چربی بدن، ترکیب غذایی، دود سیگار و شرکت در برنامه فعالیت ورزشی منظم (Abdulrahim & Imam Naji, 2010). دانش علمی موجود نشان می‌دهد فعالیت بدنی و فعالیت ورزشی منظم مقادیر تری‌گلیسرید خون را تغییر می‌دهد. ولی معمولا کلسترول تام خون بعد از فعالیت ورزشی تا زمانی که وزن بدن کاهش نیابد یا ترکیب غذایی تغییر نکند، مورد تغییر قرار نمی‌گیرد (Dehghan *et al.*, 2011).

فعالیت ورزشی استقامتی، مقادیر تری‌گلیسرید خون را در بیشتر افراد کاهش می‌دهد، ولی افرادی با بالاترین مقادیر تری‌گلیسرید اولیه بیشترین کاهش را نشان می‌دهند، بنابراین بیشترین فواید سلامتی را دریافت می‌کنند. همچنین حجم فعالیت ورزشی از اهمیت خاصی برخوردار است، به طوری که هر چه حجم فعالیت ورزشی بیشتر شود تری‌گلیسرید خون بیشتر کاهش می‌یابد (Abdulrahim & Imam Naji, 2010).

LDL به طور کلی بعد از فعالیت ورزشی استقامتی منظم کاهش نمی‌یابد. هرچند برخی مطالعات کاهش LDL را پس از فعالیت ورزشی گزارش کرده‌اند، ولی در این مورد، آزمودنی‌ها مصرف چربی غذا، یا وزن بدن‌شان، و یا هر دو را کاهش داده بودند (Dehghan *et al.*, 2011).

مدت و مقدار فعالیت ورزشی در هفته نقش مهمی در تعیین تغییر HDL دارد. ۱۲ هفته فعالیت ورزشی، معمولا مقادیر HDL خون را افزایش می‌دهد. چنانچه مدت برنامه کمتر از ۱۲ هفته باشد، احتمالا HDL خون تغییر نمی‌کند. شاید، مهمترین عامل HDL پس از فعالیت ورزشی، مقدار فعالیت ورزشی انجام شده باشد (Abdulrahim & Imam Naji, 2010; Soleimani *et al.*, 2011). به نظر می‌رسد عواملی در بروز این پدیده نقش دارد. تاثیر دارچین در جمعیت‌های مختلف بسته به نژادهای متعدد و حتی در افراد مختلف با فاکتورهای ژنتیکی متفاوت، که هر یک می‌تواند در بروز دیابت نقش متفاوتی را ایفا نمایند، مغایر با یکدیگر می‌باشد. هم‌چنین در مطالعات مختلف، بسته به دوز دارچین، مدت زمان انجام مداخله و حجم‌های نمونه‌ی متفاوت نتایج متضادی گزارش شده است. شاید اگر در مطالعه حاضر نیز دوز دارچین مورد استفاده بیشتر می‌شد و یا این که مدت زمان انجام مداخله از ۹۰ روز طولانی‌تر می‌گشت، نتایج این بررسی نیز معنی‌دار می‌شد.

در مجموع، مطالعه حاضر شواهدی را فراهم آورد که مصرف مکمل دارچین خوراکی بجز در کاهش شاخص توده بدنی، نمی‌تواند باعث کاهش شاخص‌های گلوکز و لیپید خون در افراد شود. اما با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر و نتایج متناقض گزارش شده در مطالعات مختلف، نیاز به انجام بررسی‌های بیشتر در این زمینه می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی اساتید، کارکنان، دانشجویان دانشگاه الزهراء (س) و کارکنان آزمایشگاه پژوهشکده متابولیسم و غدد که در انجام پایان‌نامه اینجانب تحت عنوان بررسی تاثیر یک دوره تمرین‌های هوازی با مصرف دارچین بر ظرفیت تام آنتی‌اکسایشی و برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی بر زنان فعال، همکاری داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Abdulrahim, A.J. and Imad Naji, R. (2010) Effects of cinnamon (*Cassia zelynicum*) on diabetic rats. *African Journal of Food Science*, 4(9): 615 –617.
- Alam khan, M.S. and Mohammad Muzaffar, A.Kh. (2003) Effect of various doses of profile in diabetic individuals. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(5): 312-317.
- Anderson, RA. (2008) Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Jagric food chem* 67(1):48-53.
- Badalzadeh, R., Shaghghi, M., Mohammadi, M., Dehghan, Gh.R. and Mohamadi, Z. (2014) The effect of cinnamon extract and long-term aerobic training on heart function. *Biochemical alterations and lipid profile following exhaustive exercise in male rats. Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2):515-20. [in Persian]
- Baker, WL., Willimas, GG., Whith, M., Kluger, J. and Coleman, CI. (2008) Effect of cinnamon on glucose control and lipid parameters. *Diabetes Care*, 31(1):41-43.
- Dehghan, Gh., Ebrahimi, S., Shaghghi, M., Jafari, A., Mohammadi, M., Badalzade R. and Fallah, S. (2011) Antioxidant effect cinnamon bark extract following an exhaustive exercise in male rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 13(5): 21-28. [in Persian]
- Durstine, L.J. (2001) Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise, a quantitative analysis. *Sports Medicine*, 31(15): 1033-62.
- Durstine, L.J., Grandjean, P. W, Cox, C. A. and Thompson, P. D. (2002) Lipids, lipoproteins, and exercise. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation*, 22(6): 385-398.
- Ghasemi, N. and Ahmadi, R. (2015) The effect of topical and injectable *Cinnamomum zeylanicum* extract on burn wound healing in diabetic male rats as compared to healthy male rats. *Journal of Islamic Azad University*, 1(25):27-32. [in Persian]
- Hall.j.e. (2011) *Guypol and Hall.tecst book of . Medical Physiology*, 12th edn. Tehran, Arjomand Book Publishing Jay Pp1352.

- Hoehn A.N. and Stockert A.L. (2012) The effects of *Cinnamomum cassia* on blood glucose values are greater than those of dietary changes. *Nutrition and Metabolic Insights*, 5: 77–83.
- Jean Jitomir, B. S. (2009) Cassia Cinnamon and acute endurance exercise for the enhancement of glucose uptake in healthy young women, Graduate school, Pp.255.
- Khan, A., Safdar, M., Khan, M.M., Khattak, K.N. and Anderson, R.A. (2003) Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26(12):3215-3218
- Kraus, W. E. Houmard, J. A., Duscha, B. D., Knwtzger, K. J., Wharton, M. B., McCartney, J. S., Bales, C.W, Henes, S., Samsa, G.P., Otvos, J.D., Kulkarni, K.R. and Slentz, C.A. (2002) Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *New England Journal of Medicine*, 347(19): 1483-1492.
- Durstin, J.L. (2011) Sports activity and cholesterol control, Expectancy publications (Physical Education and Certain Sports Science) Tehran entesharat entezar
- Masoodsinaki, H., Nazarali, P. and Hanachi, P. (2014) Evaluation and impact of omega-3 supplementation with a period of selective aerobic exercise on liver enzymes (AST-ALT) of active student girls, 18(3): 247-256 [in Persian].
- Milbury, PE., Graf, B., Curran-Celentano, JM. and Blumberg. JB. (2007) Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells, 48(5): 2343-2349.
- Modaresi, M. (2011) The effect of cinnamon extract on serum protein levels of male Balb/c mice. *Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)*, 16(5): 444-452. [in Persian]
- Rashidlamir, A., Alizadeh, A., Ebrahimiatri, A. and Dastani, M. (2012) The effect of four-week period of aerobic exercise with cinnamon consumption on lipoprotein indicators and blood sugar in diabetic female patients (Type 2). *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 20(5): 605-614. [in Persian]
- Shokri Mashhadi, N., Ghiasvand, R., Hariri, M., Askari, Gh., Feizi, A., Darvishi, L., Hajishafiee, M. and Barani, A. (2013) Effect of ginger and cinnamon intake on oxidative stress and exercise performance and body composition in Iranian female athletes. *International Journal of Preventive Medicine, Supplement of the 5th Iranian International Sports Medicine Congress*, 4(1): 1-7. [in Persian]
- Soleimani, M.N., Abnassi, M., Mahmoudi, M.H., Anvari, M. and Dezfulian, M. (2011) Evaluation of cinnamon on ovarian structures in male diabetic patients, *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 16(23): 243-233. [in Persian]
- Sonia, R., Halima B., Zaida R., Ferdous A., Jalaluddin I. and Abul Kalam, M Y. (2013) Effect of cinnamon (*Cinnamomum cassia*) as a lipid lowering agent on hypercholesterolemic rats. *Journal of Enam Medical College*, 3(2):94-98.
- Tim, N. Z., Jennifer, E. H., Ronald, W. M., Jamie, L. and Richard, A. A. (2006) Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 3(2): 45-53.
- Ting Lua, b., Hongguang, She., Johnna, W., Yuan, Ch., Jianming Z. and Yan, Ch. (2012) Cinnamon extract improves fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin level in Chinese patients with type 2 diabetes. *NUTRITION RESEARCH*, 3(2). 408 – 412.

-
- Vafa, M., Mohammadi, F., Shidfar, F., Salehi Sormaghi, MH., Heidari, I., Golestan, B. and Amiri, F. (2012) Effects of cinnamon consumption on glycemic status, lipid profile and body composition in Type 2 diabetic patients. *International Journal of Preventive Medicine*, 3(8): 531-536. [in Persian]
- Vaibhavi, J., Rakesh, P., Pankaj, Kh., Neeraj, P., Sunil G., Anupriya P. and Sonu Sh. (2010) CINNAMON: A PHARMACOLOGICAL REVIEW" *Journal of Advanced. Science. Research*, 1(2): 19-23.
- Yao, Y. and Vieira, A. (2007) Protective activities of Vaccinium antioxidants with potential relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 28(1): 93-100.
- Zahmatkesh, M., Fallah, H., Hassan, Haji Aghaei, R., Heidari, M. and Mehrafarin A. (2011) The effect of cinnamon on glucose levels in type 2 diabetic patients, a double blind clinical trial. *Medicinal Plants Quarterly*, 11(8): 258-263. [in Persian]

Effects of aerobic training and *Cinnamon zeylanicum* taking on some risk factors of cardiovascular women

H.Nakhayi ¹,P. Nazarali ²,P. Hanachi ^{3*},M. Hedayati ³

Received:2018.9.11
Accepted:2018.11.11

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of aerobic training and cinnamon consumption on some cardiovascular risk factors in active women. 28 female students of physical education (ages $02/2 \pm 36/22$ years, weight $17/7 \pm 80/59$ kg, height $60/6 \pm 40/162$ cm) are recruited and randomized into 5 groups: 1) exercise 2) aerobic exercise combined with cinnamon 3) aerobic training with placebo 4) cinnamon 5) were assigned. Intensity aerobic exercise was for 6 weeks with 80-65% of maximum heart rate. Blood samples were collected at the beginning and end of the study. Data were analyzed using SPSS20 software and Kruskal Wallis test, Wilcoxon test was used at significant level ($p < 0.05$). lipid profile in the aerobic exercise group showed no significant difference with cinnamon consumption ($P < 0.05$). Based on the results of this study, exercise activity with intensity of 65-80% of maximal oxygen consumption over 6 weeks with cinnamon supplementation can improve lipid, glucose and BMI.

Keyword: Aerobic exercise, exercise, cardiovascular diseases, Lipid profiles

1. Department of exercise physiology, Birjand University , Birjand, Iran

2. Department of exercise physiology, Alzahra University, Tehran, Iran

3. Department of biotechnology, Alzahra University, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: p.hanachi@alzahra.ac.ir)

4. Cellular and molecular endocrine research center,Research institute for endocrine sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran, Iran

بررسی تغییرات درون گونه‌ای مورفومتریک جمجمه خرگوش غربی (*Lepus*)

(*europaeus*) در استان‌های غربی ایران

فرزاد هوشیار^۱، سحر رضائی^۲، حمیدرضا رضایی^{۳*}، حمیدرضا کبیری بالاجاده^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۸

چکیده

خرگوش‌های صحرایی به طور گسترده در جهان توسعه یافته و به شرایط آب و هوایی متنوع سازگار شده‌اند. شرایط محیطی و رژیم غذایی متفاوت دو فاکتور مهم و موثر در ایجاد تنوع در خانواده خرگوش‌ها محسوب می‌گردد. مطالعات مختلف نشان داده است، جمجمه‌ها تنها اجزای اسکلتی پایدار در شرایط مختلف محیطی به منظور بررسی تغییرات مورفومتریکی گونه‌ها محسوب می‌شوند. از این رو در این مقاله بررسی تغییرات مورفومتریکی تنها به جمجمه خرگوش محدود شد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تنوع ریخت‌شناسی و گروه‌بندی صفات مورفومتریکی اندازه‌گیری شده در ۵۰ نمونه جمجمه خرگوش است که در شش استان غربی کشور (آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کرمانشاه، کردستان، همدان، زنجان)، در قالب یک نمونه‌گیری کاملاً تصادفی با استفاده نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ به روش Ward و تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA) و آنالیز کانونی (CVA) با استفاده از نرم افزار PAST بوده است. در مجموع ۴۰ صفت مورفومتریکی اندازه‌گیری شد. از همبستگی پیرسون به منظور بررسی شباهت بین صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۹۹ درصد استفاده شد. برازش دارنگاره (Dendrogram) مذکور کل گونه‌ها را از فاصله پانزده اقلیدسی به سه گروه مجزای (A، B و C) تقسیم و ادامه برازش مذکور از فاصله ده اقلیدسی بر اساس صفات مورفومتریک به چهار گروه مجزای (A، B، C1، C2) تقسیم نمود. گروه اول (A) شامل: گونه‌های آذربایجان شرقی و غربی، گروه دوم (B) شامل: گونه‌ی کردستان هستند که از نظر اکثر صفات مورد بررسی بیشترین مقدار اندازه‌گیری شده در صفات مورفومتری را دارا می‌باشد. گروه سوم (C) در فاصله ده اقلیدسی به دو دسته C1 و C2 تقسیم می‌شود. در دسته C1 گونه‌های استان کرمانشاه و در دسته دوم گونه‌های استان‌های همدان و زنجان قرار گرفتند. آزمون آنالیز کانونی برای جمعیت‌ها نیز نشان داد که جمعیت‌های کردستان با اختلاف بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌ها قرار دارد همچنین جمعیت کرمانشاه با جمعیت‌های زنجان، همدان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در حول محور اصلی اول قرار دارد.

۱- کارشناسی ارشد تنوع زیستی و زیستگاه‌ها، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشجوی دکتری محیط زیست، گرایش ارزیابی و آمایش سرزمین، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانشیار گروه محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* نویسنده مسئول: (rezaei@gau.ac.ir)

۴- کارشناس ارشد مهندسی منابع طبیعی محیط زیست، تنوع زیستی و زیستگاه‌ها، مرکز آموزش علمی - کاربردی دادگستری کل استان گلستان.

واژه‌های کلیدی: استان‌های غرب ایران، تجزیه خوشه‌ای، خرگوش غربی (*Lepus europaeus*)، صفات مورفومتري،

مقدمه

اختلافات مکانی جغرافیایی (تمایز جغرافیایی) اولین عامل جداکننده جمعیت گونه‌های مختلف در روند تکاملی می‌باشد. مطالعه این اختلافات نقش بسیار مهمی در بحث گونه‌زایی دارد (Sokal, 1973). مطالعات صورت گرفته در رابطه با تجزیه و تحلیل جغرافیایی گونه‌ها نشان داد، مفهوم بیولوژی گونه‌ها یک بحث مهم در مطالعات فنوتیکی، ژنتیکی و جغرافیایی می‌باشد (Waltari & Cook, 2005). راسته خرگوش‌ها (Order Legomorpha) شامل دو خانواده و سه گونه می‌باشند. خانواده خرگوش‌ها (Family Leporidae) شامل دو گونه به نام‌های خرگوش غربی (*Lepus europaeus*) و خرگوش شرقی (*Lepus tolai*) است. پراکندگی خرگوش غربی بیشتر در نواحی غرب و جنوب غرب مازندران، آذربایجان، کردستان و خوزستان می‌باشد. این گونه انفرادی است و قلمرو آن دارای چند استراحتگاه می‌باشد که بر حسب موقعیت‌های مختلف استفاده می‌شود. پراکندگی خرگوش شرقی بیشتر در جنوب شرقی مازندران، میانکاله تا مرز افغانستان است (اعتماد، ۱۳۸۳). اندازه گستره خانگی سالیانه خرگوش‌ها در دوجنس نر و ماده به ترتیب $1/68$ و $0/43$ کیلومتر مربع تخمین زده شده است که به طور قابل توجهی در نرها بزرگتر از ماده‌ها می‌باشد (Misorowska, 2013). این گونه از نظر طبقه بندی IUCN در رده Lc (Least concern) قرار دارد. از علل اصلی کاهش گونه می‌توان به کاهش باروری، اختلالات باروری (Hansen, 1992, Caillol et al, 1989)، حضور بیماری، شکار شدن و آلودگی منابع آبی و غذایی اشاره نمود (Duff et al, 1994, Edwards et al, 2000). استان‌های غرب و شمال غربی به خاطر دارا بودن مراتع وسیع و شرایط اقلیمی مناسب دارای جنگل‌های خودرو و دشت‌های وسیعی می‌باشند که برای رشد خرگوش‌های غربی مناسب هستند (رسولی و همکاران، ۱۳۹۱).

خرگوش‌های صحرائی به طور گسترده در جهان توزیع پیدا کرده‌اند (Demirbaş et al, 2013) و قادر هستند در اکوسیستم‌های مختلف مانند مناطق استپی، بوته‌زارها، جنگل‌ها، مزارع کشاورزی و مرغزارها به دلیل سازگاری بالا زندگی کنند (Demirbaş et al, 2010). خرگوش‌های غربی به عنوان گونه‌های آفت معرفی شده‌اند. در ضمن گزارش‌هایی از حملات آن‌ها به اراضی کشاورزی ثبت شده است (Noé, 2009, Bonino & Montenegro, 1997). با وجود تنوع بالا بین خرگوش‌ها برخی محققین بر این باورند که هنوز فیلوژنی و سیستماتیک خرگوش‌ها به صورت کامل مورد مطالعه قرار نگرفته است (Flux, 1983, Chapman & Flux, 1990). در خانواده خرگوش‌ها تنوع در ویژگی‌های مورفولوژیکی به شرایط محیط زیستی و رژیم غذایی بستگی دارد (Yom-Tov & Geffen, 2006). عوامل محیطی به عنوان یکی از مهم ترین فاکتورهای موثر بر رشد جمجمه (Van, Burnett, 1989, Hall, 1972) و همچنین اندازه نهایی جمجمه خرگوش‌ها محسوب می‌شوند (Suchentrunk et al, 2007, Burnett, 1983, Demirbaş & Albayrak, 2014). مقایسه الگوی رشد جمجمه بین حیوانات می‌تواند به عنوان یک فاکتور مهم در درک تغییرات

جغرافیایی (طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع و شرایط آب و هوایی)، استراتژی تاریخچه زندگی موجود و همچنین در بررسی تغییرات تکاملی موثر باشد (Lu, 2003, Harris) و (Steuder, 1997) اعلام کردند که تغییرات مورفومتری حاصل شده مانند تغییر در اندازه جمجمه گونه‌ها به خاطر سازگاری اکولوژیکی و اختلافات محیط زیستی می‌باشد. طبق قانون برگمن معمولا اندازه جمجمه و بدن حیوانات با کاهش درجه حرارت ارتباط مستقیم دارد (Meiri & Simberloff, 2004). طبق بررسی‌های صورت گرفته با افزایش ارتفاع فاکتورهایی مانند درجه حرارت نسبت به عرض جغرافیایی با سرعت بیشتر تغییر می‌کند، به گونه ای که به ازای هر ۱۰۰ متر ۰/۶ درجه دما کاهش می‌یابد (Rundel et al, 1994).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، در بسیاری از مطالعات از تحلیل تغییرات جمجمه خرگوش در تعیین گونه، زیر گونه (Pintur et al, 2014, Temizer & Önel, 2011) و همچنین تعیین سن خرگوش استفاده شده است (Li et al, 2011). آنالیز جمجمه به عنوان یک روش غالب در بررسی تغییرات مورفومتری در گونه‌های مختلف جنس خرگوش در نواحی مختلف استفاده می‌شود (Palacios, 1996, Palacios et al, 2008, Riga et al, 2001, Shevchenko & Peskov, 2005). علاوه بر این، مطالعه اسکلت جمجمه خرگوش‌ها اطلاعاتی درباره اکولوژی گونه و شرایط محیط طبیعی در اختیار قرار می‌دهد (Kraatz et al, 2015). جمجمه در تمام طول زندگی موجود رشد یکنواختی ندارد، به عبارتی عملکرد رشد جمجمه موجودات به نور بستگی دارد (Lu, 2003). در بین پستانداران مطالعات مورفومتری بین راسته خرگوش‌ها، با هدف درک ارتباط بین عملکرد و شکل جمجمه صورت می‌گیرد (Reese et al, 2013, Young et al, 2014) اما با این حال اسکلت جمجمه در بیشتر مطالعات نادیده گرفته می‌شود. هر چند یافته‌های مختلف نشان دادند یک همبستگی قوی بین فرم جمجمه و رفتار حرکتی موجود مانند نقش جمجمه در head first burrowing وجود دارد (Gans, 1974, Hopkins & Davis, 2009).

در واقع پیرامون اندازه گیری پارامترهای جمجمه ای خرگوش، مطالعات متفاوتی صورت گرفته است، اما تاکنون به شکل مشخص در خصوص تغییرات مورفومتری گونه خرگوش در ایران مطالعات جامعی صورت نگرفته است. Cabon (1964) از آزمون همبستگی پیرسون به منظور بررسی روابط بین پارامترهای اندازه گیری شده جمجمه خرگوش در اروپا استفاده کردند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد، از بین ۲۶ پارامتر اندازه گیری شده فقط در بین ۷ صفت همبستگی بسیار بالا وجود دارد (rostral length, basal length, profile length, condylobasal length, nasal length, length of mandible, maxillary tooth-row). در ضمن با استفاده از پارامترهای جمجمه ای، نمونه‌های گرفته شده را در چهار گروه سنی طبقه بندی کردن (۳-۶ ماه، ۶-۸ ماه، ۱ ساله و بیش از ۱ سال). نتایج نشان داد، با افزایش سن همبستگی بین پارامترها کاهش می‌یابد. Yum tor (1967) طی بررسی جمجمه خرگوش‌های صحرایی اسرائیل نتیجه گیری کردند، تنوع بالای اندازه جمجمه و بدن از شمال تا جنوب به متوسط دما سالیانه و بارندگی بستگی دارد.

Lu (2003) به اندازه گیری پارامترهای خطی جمجمه خرگوش (*Lepus capensis*) در شمال چین با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی متر پرداختند. در مجموع ۳۰۴ نمونه جمجمه مورد بررسی قرار گرفت. از روش ANOVA (One-way) و همبستگی پیرسون استفاده شد. نتایج نشان داد، اختلاف معنی دار بین پارامترهای جمجمه خرگوش (Basal, Cranial length, Profile length, Palate length, Zygomatic width, Postorbital width) از نظر منطقه ای وجود ندارد. Pintur و همکاران (2014) به بررسی ویژگی‌های جمجمه خرگوش اروپایی (*Lepus europaeus* Pall) در شمال غرب کرواسی و جزیره ویر (vir) پرداختند. نتایج نشان داد، از نظر آماری بین پارامترهای جمجمه ای اندازه گیری شده، اختلاف معنی دار وجود دارد. به عبارتی، در ۱۰ نمونه جمجمه مقدار p کمتر از ۰/۰۱ و در ۳ نمونه جمجمه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ و در ۶ نمونه فک و ۵ نمونه جمجمه مقدار p کمتر از ۰/۰۱ برآورد شده است. در ضمن، با استفاده از پارامترهای جمجمه‌ای سن نمونه‌ها برآورد شد.

Demirbas و Albayrak (2014) به بررسی وضعیت تاکسونومیکی و توزیع جغرافیایی خرگوش صحرایی (*Lepus europaeus* Pallas) در ترکیه پرداختند. ۱۲۵ نمونه از ۶۱ بخش مختلف جمع آوری شد. از آزمون MANOVA به منظور آنالیز صفات استفاده شد. نتایج نشان داد، بین صفات اندازه گیری شده همچون W (weight), TL (tail length), BL (basal length), CBL (condylobasal length), RB (rostral breadth), HBC (height of braincase), FIL (foramen incisiva length), ONL (occipitonasal length), PFL (profile length), MAH (mandible height) از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود دارد (P 5 < 0.0). اما برخی از مطالعات نمایش دادند که از نظر آماری بین پارامترهای اندازه گیری شده جمجمه در دو جنس نر و ماده هیچ گونه تفاوت معنی دار وجود ندارد (Baker et al, 1978, Anderson, 1974, Manning & Macpherson, 1958).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع ریخت شناسی و روابط بین صفات مورفومتری اندازه گیری شده در ۵۰ نمونه جمجمه خرگوش در ۵ استان غربی کشور شامل، کردستان، کرمانشاه، زنجان، همدان، آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی در قالب یک نمونه گیری کاملاً تصادفی بوده است.

روش کار

مناطق نمونه برداری

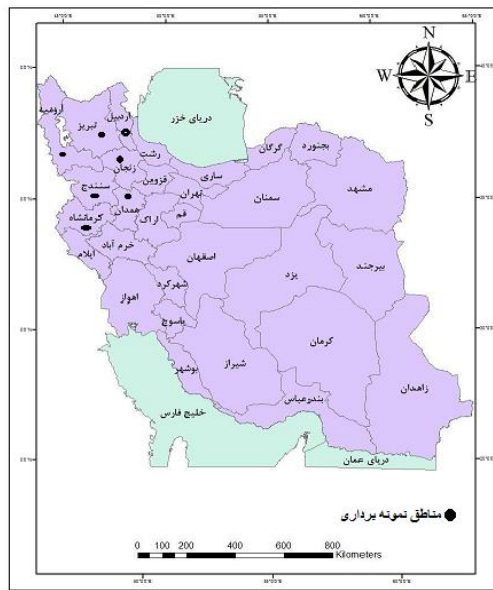
استان‌های غرب و شمال غربی به خاطر دارا بودن مراتع وسیع و شرایط اقلیمی مناسب دارای جنگل‌های خودرو و دشت‌های وسیعی هستند که برای زندگی خرگوش‌های غربی مناسب می‌باشند (رسولی و همکاران، ۱۳۹۱). لذا، در پژوهش حاضر استان‌های غربی کشور به شرح جدول ۱ به عنوان کانون‌های نمونه برداری شناخته شدند.

جدول ۱: تعداد نمونه و محل نمونه برداری

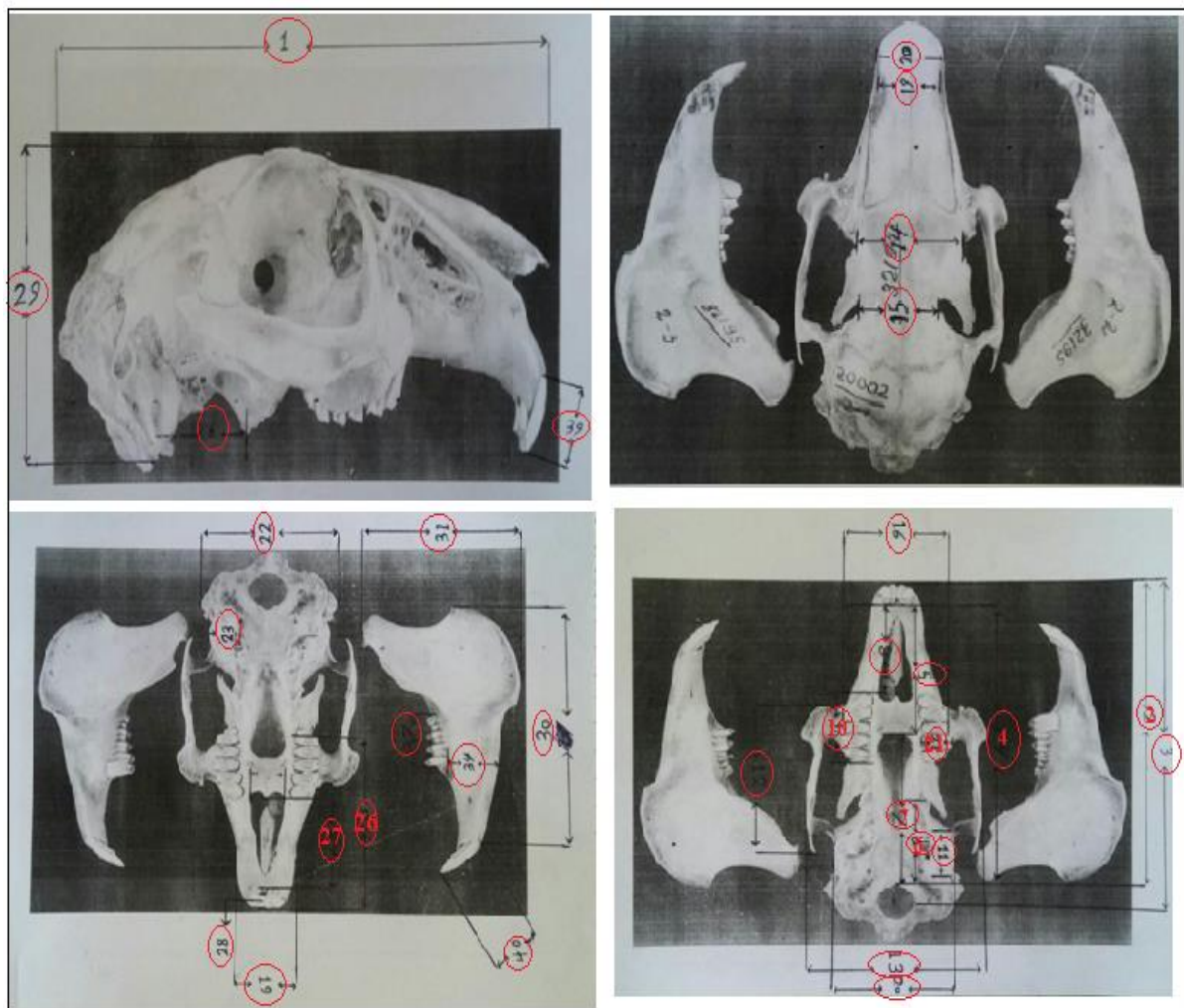
ردیف	استان	شهر	روستا	مختصات جغرافیایی	تعداد نمونه
۱	کردستان	مریوان	روستای گوگجه	۴۶/۴۱۳۷۷۰	۵
		دیواندره	روستای الی همدان	۴۶/۴۸۲۹۵۶	۳
		پاوه	هزار کانیان	۴۶/۷۳۲۹۳۰	۴
۲	کرمانشاه	سنقر	-	۴۶/۲۸۵۱۵۱	۳
		سرپل ذهاب	-	۴۷/۵۵۷۰۱۷	۳
۳	زنجان	ابه‌ر	-	۴۶/۲۵۳۴۱	۳
		ماه‌نشان	-	۴۷/۴۰۱۹۵۵	۴
۴	همدان	ملایر	روستای جوراب	۴۸/۶۹۳۰۸۱	۴
		کبودر اهنک	-	۴۸/۵۷۵۰۵۴	۲
۵	اذربایجان غربی	اسدآباد	-	۴۸/۰۹۹۹۴۷	۲
		مهاباد	روستای کوران	۴۵/۶۵۹۵۴۸	۴
۶	اذربایجان شرقی	پیرانشهر	-	۴۵/۱۵۰۶۹۷	۴
		ایلخچی	-	۴۵/۹۴۸۷۱۳	۳
		میانه	-	۴۷/۶۷۰۹۲۱	۳

روش نمونه گیری

نمونه‌های خرگوش طی روش تله گذاری با استفاده از تله‌های زنده‌گیر و کشنده که به صورت تصادفی در منطقه مکانیابی شده بودند، توسط شکارچی به دام افتادند. در برخی شرایط نمونه‌ها توسط تفنگ همراه با پروژکتور در شب شکار می‌شدند. در مجموع پنجاه نمونه خرگوش در سطح ۵ استان در قسمت غربی کشور و ۱۵ شهرستان نمونه برداری شد (شکل ۱).



شکل ۱: نقشه موقعیت مکان های نمونه گیری



شکل ۲: جمجمه خرگوش و نقاط لندمارک اندازه گیری شده (عکس از نگارنده)

آماده سازی نمونه

در مرحله اول مجموعه‌های جمع آوری شده بدون توجه به جنسیت آن‌ها از مناطق مختلف به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده و سپس پاکسازی شدند. با استفاده از کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۵ میلی متر پارامترهای مد نظر اندازه گیری شد (شکل ۲). در مجموع ۴۰ صفت مورفومتری محاسبه شد (جدول ۲). از آنجایی که نمونه‌ها به صورت تصادفی شکار می‌شدند، نسبت جنسی در جمعیت مورد مطالعه ۱:۱ در نظر گرفته شد (Lu, 2003). تمامی صفات اندازه گیری شده جدول (۲) با استفاده از نرم افزار Spss ورژن ۱۹ و دندروگرام به روش Ward گروه بندی شدند. در نهایت با استفاده از روش پیرسون، همبستگی بین صفات مورفومتری در جمعیت‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه ریختی جمعیت‌های مورد مطالعه از روش‌های تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و آنالیز کانونی (CVA) با استفاده از نرم افزار PAST استفاده گردید (Hammer, 2001). برای متغیرهایی نظیر AF که دارای توزیع نرمال نبودند از تغییر شکل داده‌ها (لگاریتم داده‌ها) استفاده شد، زیرا این کار باعث کاهش چولگی و همگنی واریانس‌ها می‌شود.

جدول ۲: صفات اندازه‌گیری شده در جمجمه خرگوش

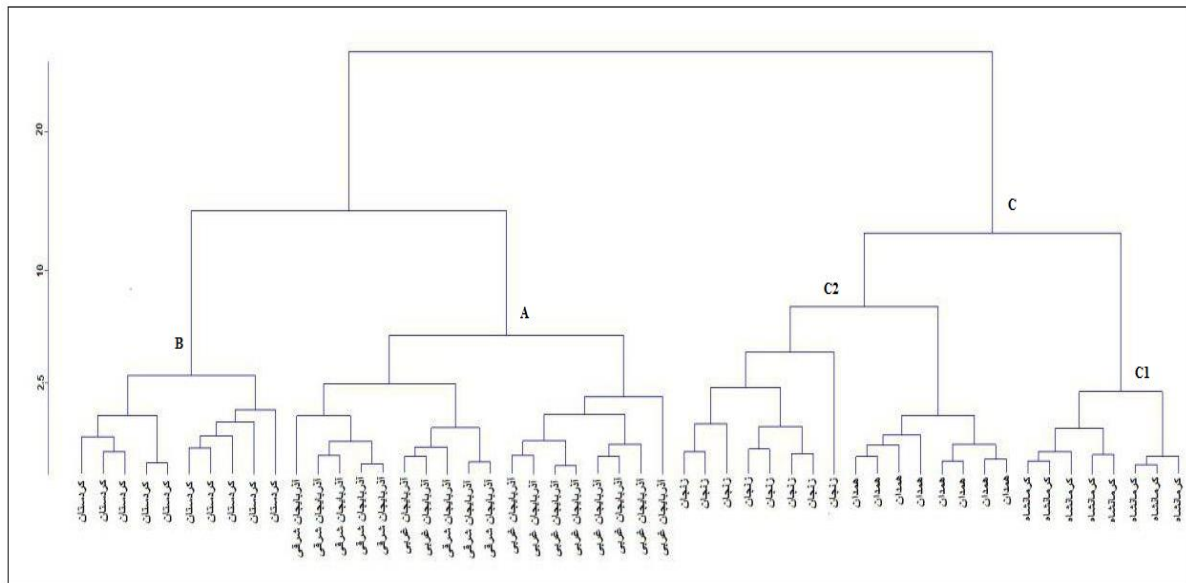
ردیف	صفت	اختصاری	تعریف
۱	Occipitonasal length	O.L	از جلو استخوان بینی تا عقب استخوان پس سری (اکسی پیتونازال)
۲	Basal length	B.L	از جلو استخوان پیش تا قسمت ابتدایی فورمان ماگنوم
۳	Condylbasal length	C.L	از جلو استخوان پیش فکی تا عقب کندیل استخوان پس سری (کندیل و بازال)
۴	Basilar length	Ba	از عقب دندان پیش تا ابتدای فورمان ماگنوم
۵	Palatal length	P	کام (از عقب دندان پیش تا انتهای استخوان کام)
۶	Basioccipital length	B.O.L	از ابتدای فورمان ماگنوم تا ابتدای بازوی اسفنوئید
۷	Postpalatal length	P.L	از انتهای استخوان کام تا ابتدای فورمان ماگنوم
۸	Diastema length	D.L	از عقب دندان پیش تا اولین دندان پیش آسیا (طول دیاستما)
۹	Nasal length	N.L	طول استخوان بینی
۱۰	Upper cheekteeth	U.CH	طول ردیف دندانی آرواره بالا
۱۱	Bullar length	BU.L	طول کپسول شنوایی
۱۲	Zygomatic length	ZY.L	طول کمان ژیگوماتیک
۱۳	Zygomatic width	ZY.W	عرض کمان ژیگوماتیک
۱۴	Least interorbital width	L.i.W	حداقل فاصله بین حدقه‌های چشم از قسمت بالایی
۱۵	Postorbital width	P.O.W	فاصله بین حدقه‌های چشم در قسمت عقبی
۱۶	Maxillary width	M.W	عرض فک بالایی
۱۷	Nasal width	N.W	عرض استخوان بینی در جلو
۱۸	PreMaxillary width	P.W	عرض پیش فکی
۱۹	Maxillary arch Spread	M.A.S	عرض قسمت جلویی فک بالا
۲۰	Width of skull behind zygomaticorches	W.B.ZY	عرض جمجمه در پشت کمان‌های ژیگوماتیک
۲۱	Bread across toothtraws	B.A.T	عرض دندانه‌های ردیف بالایی از پشت دندان آسیا اول
۲۲	Greatest width	G.W	بیشترین پهنای جمجمه از قسمت بالایی متاتوس شنوایی
۲۳	Bullar width	B.W	عرض کپسول شنوایی

۲۴	Length of suture between frontal	L.B.F	فاصله بین درز های پیشانی
۲۵	Length of facial region	L.F.R	طول ناحیه جلویی جمجمه از جلو دندان پیش تا عقب دندان آسیا دوم
۲۶	Length of braincase	L.B	طول جعبه جمجمه از قسمت انتهایی دندان آسیا سوم تا عقب کندیل استخوان پس سری
۲۷	Length of palatin forman	L.P.F	طول استخوان کامی در قسمت جلو
۲۸	Incisor thickness	I.TH	ضخامت دندان های پیش در قسمت قاعده
۲۹	High of braincase	H.B	ارتفاع جمجمه (فک بالا)
۳۰	Length of mandible	L.M	طول آرواره پایین
۳۱	High of mandible	H.M	ارتفاع آرواره پایین
۳۲	Articular Length	A.L	طول ناحیه مفصلی در مفصل پایین
۳۳	Angular distranc	A.D	فاصله ناحیه زاویه ای در فک پایین
۳۴	Height to the underside of the lower jaw in the area of the tooth to the jaw Asia During the Asian region before the first corner to the front of the base of the teeth	HULT	ارتفاع آرواره پایین در ناحیه اولین دندان پیش آسیا تا قسمت زیرین آرواره
۳۵	width of Palatine bone	DAFT	طول بین ناحیه زاویه ای تا قسمت جلویی قاعده دندان پیش آسیا اول
۳۶	Lower cheekteeth	WPB	عرض شکاف استخوان کامی
۳۷	The bottom row of the first molar teeth width	L.CH	طول ردیف دندانی آرواره پایین
۳۸	Length of maxillary incisors	BMW	عرض دندانهای ردیف پایینی از پشت دندان آسیا اول
۳۹	Length of mandibular incisors	LMI	طول دندان پیشین بالا
۴۰		LMI	طول دندان پیشین پایین

نتایج

گروه‌بندی گونه‌ها براساس مجموع صفات مورفومتری اندازه‌گیری شده در نواحی مختلف، به روش Ward صورت گرفت. دارنگاره (Dendrogram) بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده بین گونه‌های جمع‌آوری شده خرگوش در شکل (۳) آمده است. نتایج نشان داد، برازش دارنگاره مذکور از فاصله پانزده اقلیدسی، جمعیت‌های مربوط را بر اساس محل جمع‌آوری به سه گروه مجزای A و B و C تقسیم کرد. در ضمن، ادامه برازش مذکور از فاصله ده اقلیدسی، گونه‌های مورد بررسی را بر اساس صفات مورفومتریک به چهار گروه مجزا (A، B، C1، C2) تقسیم نمود. طبق نتایج حاصل از شکل ۳، گروه اول (A) شامل: گونه‌های آذربایجان شرقی و غربی، گروه دوم (B) شامل: گونه‌ی کردستان هستند که از نظر اکثر صفات مورد بررسی بیشترین مقدار اندازه‌گیری شده در صفات مورفومتری را دارا می‌باشد. گروه سوم (C) در فاصله ده اقلیدسی به دو دسته C1 و C2 تقسیم می‌شود. در دسته C1 گونه‌های استان کرمانشاه و در دسته دوم گونه‌های استان‌های همدان و زنجان قرار

گرفتند. در نهایت می‌توان اشاره نمود که گونه‌های استان زنجان دارای تنوع گونه‌ای بیشتری نسبت به سایر استان‌های مورد بررسی می‌باشد.



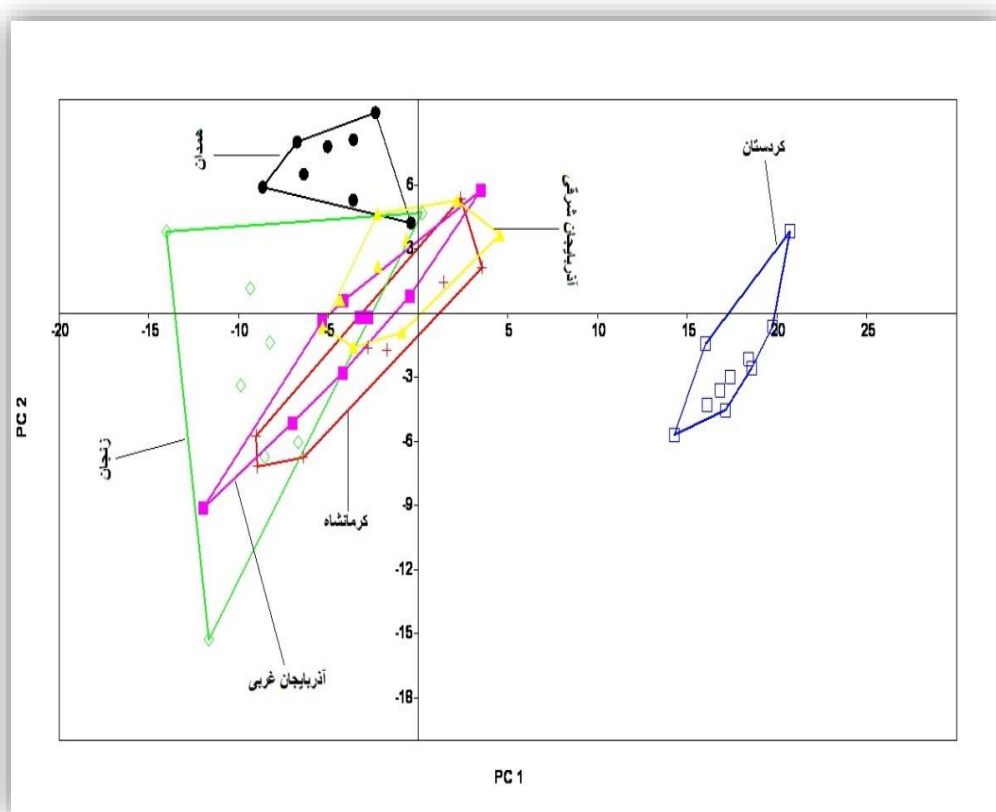
شکل ۳: نمودار درختی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward برای صفات اندازه‌گیری شده در جمعیت خرگوش غریبی

ضرایب همبستگی بین صفات مورفومتری

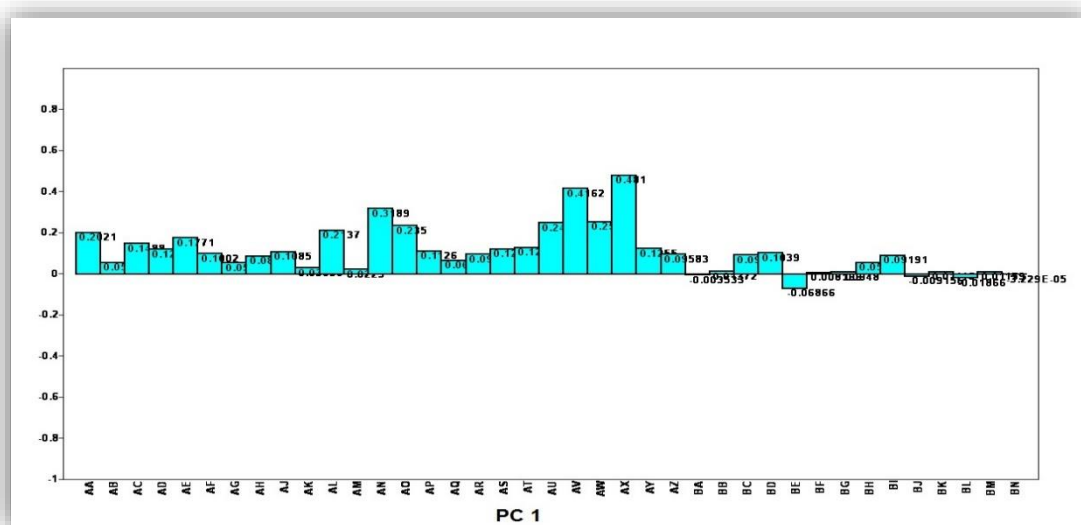
ضرایب همبستگی بین صفات مورفومتری اندازه‌گیری شده نشان داد که از بین صفات اندازه‌گیری شده تعدادی از صفات همبستگی مثبت و بالا ($r > 80\%$) در سطح احتمال ۱ درصد، همچنین تعدادی دیگر از صفات همبستگی منفی و بالا ($r > 60\%$) در سطح احتمال ۱ درصد را دارا می‌باشند. به عنوان مثال، بین صفات Condylbasal length (از جلو استخوان پیش فکی تا عقب کندیل استخوان پس سری) (کندیل و بازال) و Palatal length (از عقب دندان پیش تا انتهای استخوان کام)، Zygomatic width (عرض کمان زیگوماتیک) و Greatest width (بیشترین پهنا از مجسمه از قسمت بالایی متاتوس شنوایی)، Least interorbital width (حداقل فاصله بین حلقه‌های چشم از قسمت بالایی) و Postorbital width (فاصله بین حلقه‌های چشم در قسمت عقبی)، Least interorbital width (حداقل فاصله بین حلقه‌های چشم از قسمت بالایی) و Width of skull behind zygomatic arches (عرض مجسمه در پشت کمان‌های زیگوماتیک) (AC و AN، AE و AW، AO و AP، AO و AU) دارای همبستگی مثبت و بالا ($r > 80\%$) در سطح احتمال ۱ درصد و AV (عرض دندان‌های ردیف بالایی از پشت دندان آسیا اول) و BL (ارتفاع آرواره پایین در ناحیه اولین دندان پیش آسیا تا قسمت زیرین آرواره) دارای همبستگی منفی و بالایی ($r > 60\%$) در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند.

تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) و آزمون آنالیز کانونی

نتایج آزمون تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) بر روی ماتریس داده ها نشان داد که مؤلفه اصلی اول (PC 1) به میزان ۴۳/۴۷ درصد واریانس ها و مؤلفه اصلی دوم (PC 2) ۱۲/۱۶ درصد واریانس داده ها را به خود اختصاص می دهند. با توجه به شکل ۴ مشخص می شود که تمامی جمعیت های مورد مطالعه به استثنای جمعیت کردستان، حول مؤلفه های اصلی اول و دوم دارای هم پوشانی هستند. بر اساس نمودار مربوط به Loading PC مشخص گردید که سنجه های AX, AA, AW, AN و AV مهمترین سنجه های جدا کننده جمعیت ها هستند و سایر سنجه ها نیز دارای لودینگ مثبت هستند (شکل ۵).

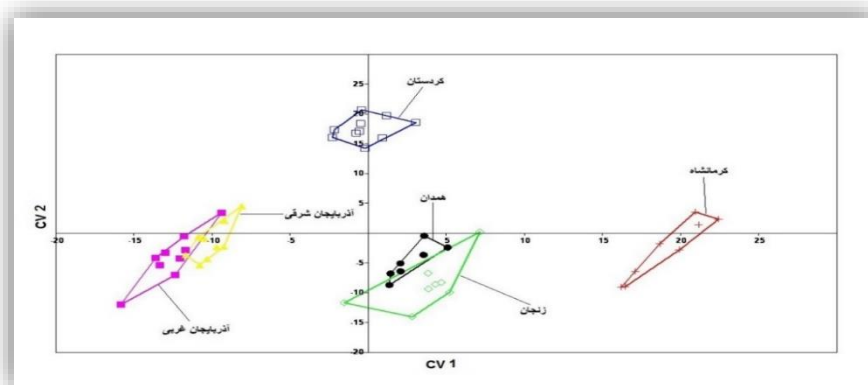


شکل ۴: نمودار پراکنش جمعیت های مورد مطالعه خرگوش بر اساس دو مؤلفه اصلی اول (PC 1) و دوم (PC 2)



شکل ۵: مهم ترین نسبت‌های تأثیرگذار برای جدایی جمعیت‌های مطالعه شده

آزمون آنالیز کانونی برای جمعیت‌ها نیز نشان داد که جمعیت‌های کردستان با اختلاف بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌ها قرار دارد همچنین جمعیت کرمانشاه با جمعیت‌های زنجان، همدان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در حول محور اصلی اول قرار دارد. همچنین جمعیت‌های زنجان با همدان و جمعیت‌های آذربایجان شرقی با آذربایجان غربی دارای هم پوشانی می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۶: نمودار تمایز جمعیت‌های خرگوش بر اساس آنالیز کانونی (CVA)

بحث و نتیجه گیری

متغیرهای محیطی، یکی از مهم‌ترین عواملی هستند که بر روی مجسمه و اندازه نهایی بدن اثر دارند (Yom-Tov & Geffen, 2006). نتایج مطالعات مختلف نشان داد، علاوه بر حجم بدن که شایعترین عامل موثر بر روی اندازه بدن می‌باشد (Meiri *et al*, 2004)، دسترسی به مواد غذایی و توانایی مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی از دیگر عوامل موثر محسوب می‌شوند (Hickling & Millar, 1990). بر خلاف حجم بدن که طبق فاکتورهای محیطی تغییر می‌کند استخوان پستانداران جز ویژگی‌های

نسبتا پایدار آن‌ها محسوب می‌شود (Demirbaş *et al*, 2013). مطالعه حاضر با استفاده از آزمون تجزیه به مولفه های اصلی (PCA) بر روی ماتریس داده ها نشان داد، که تمامی جمعیت های مورد مطالعه به استثنای جمعیت کردستان، حول مؤلفه های اصلی اول و دوم دارای هم پوشانی هستند. در ضمن، بر اساس نمودار مربوط به Loading PC مشخص گردید که سنجه های AX, AA, AN و AW, AV مهمترین سنجه های جدا کننده جمعیت ها هستند و سایر سنجه ها نیز دارای لودینگ مثبت هستند. با توجه به اینکه بیش از ۹۰ درصد پارامترهای اندازه گیری شده دارای لودینگ مثبت هستند شاهد جدایی جمعیت در استان های مختلف نیستیم. علاوه بر این با توجه به نتایج آزمون آنالیز کانونی، جمعیت های زنجان با همدان و جمعیت های آذربایجان شرقی با آذربایجان غربی دارای هم پوشانی می باشد که از علل اصلی آن می توان به موقعیت قرار گیری شهرها اشاره نمود که، در همسایگی هم قرار دارند. لذا می توان شاهد هم پوشانی گونه های مربوط به این استان ها بود.

علاوه بر این، با استفاده از روش Ward در فاصله ده اقلیدسی، گونه های مورد بررسی را بر اساس صفات مورفومتریک به چهار گروه مجزا (A, B, C1, C2) تقسیم کرد. در نهایت نتایج حاصل از تحلیل نشان داد، گونه های استان زنجان دارای تنوع گونه ای بیشتری نسبت به سایر استان های مورد بررسی می باشند. که طی بازدیدهای میدانی صورت گرفته در منطقه، مصاحبه با شکارچیان و نمونه های گرفته شده در استان زنجان شاهد این امر بودیم. دلیل اصلی آن می تواند، وضعیت توپوگرافی منطقه، شرایط آب و هوایی و موقعیت قرار گیری استان زنجان، کاهش صیادان و حضور منابع غذایی خاص در منطقه باشد. لذا، نتایج حاصل شده، دور از انتظار نیست. در ضمن می توان نتیجه گیری کرد که خرگوش ها دارای سازگاری محلی بالایی هستند و طبق شرایط منطقه ای که در آن حضور دارند تغییراتی در پارامترهای جمجمه ای و حتی پوششی به منظور افزایش نرخ بقا رخ می دهد. علاوه بر این، نتایج حاصل از همبستگی پیرسون نشان داد، بین صفات، از جلو استخوان پیش فکی تا عقب کندیل استخوان پس سری (کندیل و بازال) و کام (از عقب دندان پیش تا انتهای استخوان کام)، عرض کمان زیگوماتیک و بیشترین پهنای جمجمه از قسمت بالایی متاتوس شنوایی، حداقل فاصله بین حدقه های چشم از قسمت بالایی و فاصله بین حدقه های چشم در قسمت عقبی، حداقل فاصله بین حدقه های چشم از قسمت بالایی و عرض جمجمه در پشت کمان های زیگوماتیک (AC و AE، AN و AW، AO، AP و AO) دارای همبستگی مثبت و بالا ($r > 80\%$) در سطح احتمال ۱ درصد و عرض دندان های ردیف بالایی از پشت دندان آسیا اول و ارتفاع آرواره پایین در ناحیه اولین دندان پیش آسیا تا قسمت زیرین آرواره دارای همبستگی منفی و بالا ($r > 60\%$) در سطح احتمال ۱ درصد می باشد. تفاوت در شرایط توپوگرافی و آب و هوایی مناطق مورد مطالعه که به نوبه خود بر پوشش غالب منطقه تاثیر می گذارند، دلیل اصلی همبستگی منفی شناخته شده است. لذا گونه های خرگوش ویژگی دندان های خود را با پوشش غالب منطقه در نواحی مختلف سازگار کرده تا بتواند نیازهای غذایی خود را رفع کند. و در نهایت میزان بقا خود را افزایش دهند.

مطالعات مختلف نشان دادند، بررسی تغییرات مورفومتری جمجمه خرگوش‌ها به عنوان یک روش کارآمد و رایج در طبقه بندی گونه‌های مختلف خرگوش می‌باشد (Suchentrunk *et al*, 2007, Riga *et al*, 2001). از جمله از این مطالعات می‌توان به مطالعه تغییرات مورفومتری *Lepus brachyurus* در ژاپن (Hirakawa *et al*, 1978)، *Lepus arcticus* در جنوب آمریکا (Angerbjörn, 1995)، *Lepus europaeus* در اسلواکی (Shevchenko & Peskov, 2005) اشاره نمود.

نتایج حاصل از بررسی‌های Pintur و همکاران، ۲۰۱۴ نشان داد، از نظر آماری بین پارامترهای condylobasal length، greatest length of the nasals، length of the diastema، palatal length، مطالعه حاضر می‌باشد. به عبارتی، در ۱۰ نمونه مقدار p کمتر از ۰/۰۱ و در سه نمونه کمتر از ۰/۰۵ برآورد شد. نتایج بررسی Demirbaş و همکاران، ۲۰۱۳ نشان داد که بین صفات اندازه گیری شده جمجمه شامل: (nasal length، condylobasal length، upper molar length، zygomatic breadth، occipitonasal length، bulle breadth از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود ندارد. به عبارتی بین صفات ذکر شده همبستگی بالا وجود دارد. که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. به عبارتی شرایط محیطی و غذایی روی اندازه پارامترهای جمجمه ای اندازه گیری شده در ترکیه اثر ندارد و تنها اختلاف در طول پای عقب و وزن بدن می‌باشد ($P < 0.05$). یافته‌های Lu، 2003 نشان داد، بر اساس نتایج حاصل از ANOVA بین پارامترهای اندازه گیری جمجمه خرگوش شامل: Cranial length، Basal length، Profile length، Palate length، Zygomatic width، Postorbital width از نظر منطقه ای در شمال و جنوب، از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود ندارد لذا نمونه‌های دو منطقه با هم ادغام شدند. علاوه بر این نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Cabon (1964) همخوانی دارد. لذا طبق یافته‌های ایشان، از بین ۲۶ پارامتر اندازه گیری شده فقط در بین ۷ صفت همبستگی بسیار بالا وجود دارد، که همراستا با مطالعه حاضر می‌باشد (condylobasal length، maxillary tooth-row و length of mandible، nasal length، basal length، rostral length، profile length).

از طرفی نتایج مطالعه حاضر، با یافته‌های DEMİRBAŞ و Albayrak، 2014 در ترکیه مطابقت ندارد. زیرا مطالعات آن‌ها نشان داد، بین صفات جمجمه ای اندازه گیری شده (BL (basal length)، CBL (condylobasal length)، RB (breadth)، HBC (height of braincase)، FIL (foramen incisiva length)، ONL (occipitonasal length)، PFL (profile length)، MAH (mandible height) با استفاده از روش MANOVA از نظر آماری اختلاف معنادار وجود دارد ($P < 0.05$). که همراستا با مطالعه حاضر نمی‌باشد. دلیل اصلی اختلاف می‌تواند تفاوت در شرایط جغرافیایی، سیمای سرزمین، فواصل جغرافیایی بین مناطق نمونه برداری باشد. که گونه به منظور افزایش نرخ بقا نرخ سازگاری خود را افزایش می‌دهد. که طبق مطالعات مختلف تغییر در ویژگی مورفومتری جمجمه خرگوش‌ها در نواحی مختلف با شرایط توپوگرافی مختلف می‌تواند طبق قانون برگمن تایید شود (Pintur *et al*, 2014).

در نهایت نتایج حاصل از تحلیل نشان داد، گونه‌های استان زنجان دارای تنوع گونه‌ای بیشتری نسبت به سایر استان‌های مورد بررسی می‌باشند. که طی بازدیدهای میدانی صورت گرفته در منطقه، مصاحبه با شکارچیان و نمونه‌های گرفته شده در استان زنجان شاهد این امر بودیم. دلیل اصلی آن می‌تواند، وضعیت توپوگرافی منطقه، شرایط آب و هوایی و موقعیت قرار گیری استان زنجان، کاهش صیادان و حضور منابع غذایی خاص در منطقه باشد. لذا، نتایج حاصل شده، دور از انتظار نیست. در ضمن می‌توان نتیجه گیری کرد که خرگوش‌ها دارای سازگاری محلی بالایی هستند و طبق شرایط منطقه‌ای که در آن حضور دارند تغییراتی در پارامترهای جمجمه‌ای و حتی پوششی به منظور افزایش نرخ بقا رخ می‌دهد. در پایان باید اذعان داشت یافته‌های این پژوهش در مشخص کردن مباحث حفاظتی در ارتباط با گونه مورد نظر در مناطق مورد مطالعه اهمیت بسزایی دارد. درواقع، اطلاعات به دست آمده می‌تواند مورد استفاده مدیران و کارشناسان حیات‌وحش در بحث‌های مدیریتی قرار گیرد. از مهم‌ترین راه‌های حفاظتی این گونه می‌توان به شناخت عمیق‌تر بیولوژیک و اکولوژیک گونه در مراحل و فصول مختلف، فرهنگ‌سازی و افزایش آگاهی مردم، افزایش محیط‌بانان برای کنترل بیشتر منطقه از نظر تردد خودرو و حضور شکارچیان و نیز اجرای بهینه قوانین حفاظتی اشاره نمود.

منابع

- Anderson, H. L. (1974) *Natural history and systematics of the tundra hare (Lepus othus Merriam) in western Alaska* (Doctoral dissertation, University of Alaska).
- Angerbjörn, A. (1995) *Lepus timidus*. *Mammalian species*, (495), 1-11.
- Bonino, N., and Montenegro, A. (1997) Studies on the European hare. 53. Reproduction of the European hare in Patagonia, Argentina. *Acta Theriologica*, 42(1), 47-54.
- Burnett, C. D. (1983) Geographic and climatic correlates of morphological variation in *Eptesicus fuscus*. *Journal of Mammalogy*, 64(3), 437-444.
- Baker, A. J., Peterson, R. L., Eger, J. L., and Manning, T. H. (1978) Statistical analysis of geographic variation in the skull of the arctic hare (*Lepus arcticus*). *Canadian Journal of Zoology*, 56(10), 2067-2082.
- Chapman, J. A., and Flux, J. E. (1990) *Rabbits, hares and pikas: status survey and conservation action plan*. IUCN.
- Caboń-Raczyńska, K. (1964) Correlations of skull measurements of *Lepus europaeus* Pallas, 1778; Korelacja wymiarów czaszki *Lepus europaeus* Pallas, 1778. *Acta Theriologica*, 8(13), 207-216.
- Cailloil, M., Meunier, M., Mondain-Monval, M., and Simon, P. (1989) Seasonal variations in testis size, testosterone and LH basal levels, and pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Canadian journal of zoology*, 67(7), 1626-1630.
- Duff, J. P., Chasey, D., Munro, R., and Wooldridge, M. (1994) European brown hare syndrome in England. *The Veterinary Record*, 134(26), 669-673.

- Demirbaş, Y., Albayrak, İ., and Yilmaz, A. (2013) Studies of ecomorphological variations of the European hare (*Lepus europaeus*) in Turkey. *Archives of Biological Sciences*.
- DEMİRBAŞ, Y., AŞAN, N., and Albayrak, I. (2010) Cytogenetic study on the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) (Mammalia: Lagomorpha) in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 34(3), 247-252.
- DEMİRBAŞ, Y., and Albayrak, I. (2014) The taxonomic status and geographic distribution of the European hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Turkey (Mammalia: Lagomorpha). *Turkish Journal of Zoology*, 38(2), 119-130.
- Edwards, P. J., Fletcher, M. R., and Berny, P. (2000) Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraquat. *Agriculture, ecosystems & environment*, 79(2), 95-103
- Etemad, E. (1978) Guide for Iranian Mammals. Scientific Society for the Protection of Natural and Environmental Resources.
- Flux, J. E. C. (1983) Introduction to taxonomic problems in hares. *Acta Zoologica Fennica*.
- Gans, C. (1974) Anatomy in Action.(Book Reviews: Biomechanics. An Approach to Vertebrate Biology). *Science*, 186, 526-527.
- Hall, B. K. (1989) Genetic and epigenetic control of vertebrate embryonic development. *Netherlands Journal of Zoology*, 40(1), 352-361.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. "Paleontological Statistics Software: Package for Education and Data Analysis." *Palaeontologia Electronica* (2001)
- Harris, M. A., & Steudel, K. (1997) Ecological correlates of hind-limb length in the Carnivora. *Journal of Zoology*, 241(2), 381-408.
- Hopkins, S. S., and Davis, E. B. (2009) Quantitative morphological proxies for fossoriality in small mammals. *Journal of Mammalogy*, 90(6), 1449-1460.
- Hirakawa, H., Kuwahata, T., Shibata, Y., and Yamada, E. (1992) Insular variation of the Japanese hare (*Lepus brachyurus*) on the Oki Islands, Japan. *Journal of mammalogy*, 73(3), 672-679
- Hansen, K. (1992) Studies on the European hare. 44. Reproduction in European hare in a Danish farmland. *Acta Theriologica*, 37(1-2), 27-40.
- Kraatz, B. P., Sherratt, E., Bumacod, N., and Wedel, M. J. (2015) Ecological correlates to cranial morphology in Leporids (Mammalia, Lagomorpha). *PeerJ*, 3, e844.
- Lu, X. (2003) Postnatal growth of skull linear measurements of Cape hare *Lepus capensis* in northern China: an analysis in an adaptive context. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78(3), 343-353.
- LI, H. P., ZHANG, F., and HAN, C. X. (2011) Geographical Differentiation in Skull Morphology of *Lepus capensis* in Shaanxi Province [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 1, 025.
- Misiorowska, M. (2013) Annual and seasonal home range and distances of movements of released hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Central Poland. *Folia Zoologica*, 62(2), 133-142.
- Meiri, S., Dayan, T., and Simberloff, D. (2004) Carnivores, biases and Bergmann's rule. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(4), 579-588.

- Manning, T. H., and Macpherson, A. H. (1958) The mammals of Banks Island. Arctic Institute of North America, Technical Paper, 2: 1-74.. 1961. A biological investigation of Prince of Wales Island. *NWT Transactions of the Royal Canadian Institute*, 33, 1-16.
- Noé, U., Mantilla-Meluk, H., Ramirez, F., Perez, P., Mujica, N., Troche, A., and Gimenez, M. (2009) Mammalia, Lagomorpha, Leporidae, *Lepus europaeus*, Pallas, 1778: Distribution extension, first confirmed record for Paraguay. *Check List*, 5(3), 428-432.
- Pintur, K., Dančević, N., Štedul, I., Popović, N., and Slijepčević, V. (2014) Craniometric features of European hare (*Lepus europaeus* Pall.) from North-west Croatia and the island of Vir. *Veterinarski arhiv*, 84(4), 387-400.
- Palacios, E. (1996) Systematics of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Mammalia: Leporidae). *Bonner Zoologische Beiträge*, 46, 59-92.
- Palacios, F., Angelone, C., Alonso, G., and Reig, S. (2008) Morphological evidence of species differentiation within *Lepus capensis* Linnaeus, 1758 (Leporidae, Lagomorpha) in Cape Province, South Africa. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 73(5), 358-370.
- Rasoli, P. Khodadadi, A. Tavasoli, M. Safaei, Sh., and Sedighyani, M. (2011) Study of the rate and diversity of *Eimeria* protozoa in rabbits in the northwest of Iran. 3, 151-163.
- Riga, F., Trocchi, V., Randi, E., and Toso, S. (2001) Morphometric differentiation between the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Journal of zoology*, 253(2), 241-252.
- Rundel, P. W., Smith, A. P., and Meinzer, F. C. (1994) *Tropical alpine environments: plant form and function*. Cambridge University Press. Mammalia, Ochotonidae). *Journal of morphology*, 274(5), 585-602.
- Reese, A. T., Lanier, H. C., and Sargis, E. J. (2013) Skeletal indicators of ecological specialization in pika (43)
- Riga, F., Trocchi, V., Randi, E., and Toso, S. (2001) Morphometric differentiation between the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Journal of zoology*, 253(2), 241-252.
- Shevchenko, L. S., and Peskov, V. N. (2005) The geographical variability and morphological differentiation of the European hare on the territory of Ukraine. *Proceedings of the Zoological Museum*, 37, 121-133.
- Shevchenko, L. S., and Peskov, V. N. (2005) The geographical variability and morphological differentiation of the European hare on the territory of Ukraine. *Proceedings of the Zoological Museum*, 37, 121-133.
- Suchentrunk, F., Flux, J. E. C., Flux, M. M., and Slimen, H. B. (2007) Multivariate discrimination between East African cape hares (*Lepus capensis*) and savanna hares (*L. victoriae*) based on occipital bone shape. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 72(6), 372-383.
- Sokal, RR. (1973) The species problem reconsidered. *Syst. Zool* 22: 360-374. Sokal, RR, and T.J. Crovello. 1970. The biological species concept: A critical evaluation. *Amer. Nat.* 104: 127-153.
- Stace, CA (1978) Breeding systems, variation patterns and species delimitation. Pp. 57-78, in *Essays in plant taxonomy* (HE Street, ed.). Academic Press, New York. *Conceptual Issues in Evolutionary Biology*, 31, 232.
- Temizer, A., and Önel, A. (2011) Elazığ ve Malatya İlleri Yabani Tavşanı (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)'nın Geometrik ve Morfometrik Yöntemler Kullanılarak Karşılaştırılması. *Firat University Journal of Science*, 23(1).
- Van Limborgh, J. (1972) The role of genetic and local environmental factors in the control of postnatal craniofacial morphogenesis. *Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica*, 10(1), 37.

-
- Waltari, E., and Cook, J. A. (2005) Hares on ice: phylogeography and historical demographics of *Lepus arcticus*, *L. othus*, and *L. timidus* (Mammalia: Lagomorpha). *Molecular Ecology*, 14(10), 3005-3016.
- Yom-Tov, Y., & Geffen, E. (2006) Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation. *Oecologia*, 148(2), 213-218.
- Young, J. W., Danczak, R., Russo, G. A. and Fellmann, C. D. (2014) Limb bone morphology, bone strength, and cursoriality in lagomorphs. *Journal of anatomy*, 225(4), 403-418.
- Yom-Tov, Y. (1967) On the taxonomic status of the hares. (Genus *Lepus*) In Israel. *Mammalia*, 31(2), 246-259.

Check skull morphometric variation within species *Lepus europaeus* in the western provinces of Iran

F .Hoshyar¹ ,S.Rezaei^{2*} ,H.R. Rezaei³ ,H.R. Kabiri Balagadeh⁴

Received:2017.12.16

Accepted:2017.12.19

Abstract

Desert rabbits are widely distributed in the world and have adapted to various weather conditions. Different environmental conditions and diet are two important factors in creating diversity in the family of rabbits. Various studies have shown that skulls are the only skeletal components in different environmental conditions to investigate species morphometric changes. Therefore, in this article the investigate morphometric variation was limited only to the rabbit's skull. The aim of this study was to investigate morphological diversity and grouping of morphometric traits measured in 50 rabbit's skull samples, in six western provinces of Iran with a random sampling. Totally, 40 morphometric traits were measured. Grouping the measured traits were carried out by the SPSS, Ward method, CA and CVA with PAST. Furthermore, we used Pearson correlation to study the correlations between measured traits at the level of 99%. Fitting dendrogram divided species into three groups (A, B, C) from a fifteen fitting the Euclidean distance. Therefore, from a ten fitting the Euclidean distance divided the studied species into four distinct groups (A ,B ,C1 ,C2) based on morphological traits. Group (A) consists of East Azerbaijan species and Western Azerbaijan species, group (B) consists of Kurdistan species which has the highest value measured between morphometric traits. Third group (C) from a ten continue fitting the Euclidean distance is divided into two sub-group C1 (Kermanshah) and C2 (Znjan and Hamedan). CVA test shows Kurdistan population difference is more than another one. Also, the population of Kermanshah, Zanjan, Hamedan, East Azerbaijan and Western Azerbaijan put on the first main axis.

Keyword: *Lepus europaeus*, the western provinces of Iran, morphometric traits, Ward method, Pearson correlation

1-MSc. Environmental Sci., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan. Iran.

2-PhD Student Environmental Sci., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan. Iran. 3-Associate

*(Corresponding Author: rezaei@gau.ac.ir)

Professor, Environmental Sci. Dep., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan. Iran.4-MSc. Environmental Sci. Golestan Judiciary Scientific Applied Training Center. Gorgan, Iran.

Content

Reproductive Phenology and Breeding Success of Bridled Tern *Onychoprion anaethetus* in Ghabre Nakhoda Island in 2015

B. Behrouzi-Rad.....23

Effect of ethanol on pigments production in *Chlorella sorociniana* in autotrophic condition

Z. Khalili, H. Jalili, M. Noroozi.....33

Evaluation of Cr stress tolerance in *Portulaca oleracea* L. based on growth, photosynthesis indexes and the activity of antioxidant enzymes

R. Rahbarian, E. Azizi, A. Behdad, A. Mirblook,57

Survey of antioxidant defensive responses in three genotypes of *Lolium perenne* under drought stress

F. Tarkesh-Esfahani, L. Shabani, M.R. Sabzalian.....76

Feeding habits of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Beheshtabad River of Chaharmahal & Bakhtiari Province

M. Aalipour, Y. Keivany, E. Ebrahimi.....99

Optimization of growth and catalase production in *Kocuria* sp. ASB 107 in economic medium

E. Asgarani, E. Godini, J. Fooladi.....109

Effects of Magnetically-Treated Water on vegetative organs and stomata density of lentil (*Lens culinaris* L.)

N. Azimi, A. Majd, F. Ghanati, T. Nejadi, S. Arbabian.....120

and antioxidant activity of sour orange (*Citrus aurantium*) hydroethanolic and methanolic peel extract

M. Mayeli, H. Tajik, T. Mehdizadeh, F. Esmaeli.....135

Isolation and Identification of a Myxobacterium Producing Myxothiazol and Althiomycin from Iran Soil

A. Moradi, M. Yaghoubi Evin, G. Ebrahimipour, A. Ghasempour.....150

The mechanism of inhibitory effect of caffeine from Iranian tea on sigmoidal kinetics of adenosine deaminase enzyme activity

R. Mahinpour, M. Ghasemi, Z. Moosavi-Nejad, Z. Zahraei.....162

Some biological and ecological peculiarities of the Great Bustard in Iran with emphasis on critically endangered situation of the species

M. Naderi.....177

Effects of aerobic training and *Cinnamon Zeylanicum* taking on some risk factors of cardiovascular women

H. Nakhayi, P. Nazarali, P. Hanachi, M. Hedayati192

Check skull morphometric variation within species *Lepus europaeus* in the western provinces of Iran

F. Hoshyar, S. Rezaei, H.R. Rezaei, H.R. Kabiri Balagadeh.....210

Journal of Applied Biology
Spring 2019

AlZahra University - Vice Chancellery for Research

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

Chief Editor: E. Abdi ali, Associate Professor Professor of Alzahra University

Editorial Boards

F. Eftekhar, Associate Professor Shahid Beheshti University

M. Pakravan, Associate Professor of Alzahra University

O. Rabbani, Professor of Tehran University

P. Rostami, Professor of Tarbiat Moalem University

M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University

T. Falsafi Momughani, Professor of alzahra University

A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Al-Zahra University - Vice Chancellery for Research

English Editor: S. A.Gadami

Persian Editor: P. S. Pourhosseini

Printing and Binding: Scientists peak Publications

Circulation: 10 copies

Publication Frequency: Quarterly

Price: 10000 Rls

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

**Address: AlZahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak Sq,
Tehran, 1993891176, Iran.**

Tel/Fax:021- 85692205

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

ISSN: 2251-7901

Email: Oolomepaieh@gmail.com