



مجله زیست‌شناسی کاربردی

تابستان 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 زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر نرگس حسینمردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر طاهره فلسفی ممقانی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عذرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار فارسی و انگلیسی: دکتر سید ابوالقاسم قدمی

چاپ و صحافی: انتشارات

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

این فصلنامه علمی - پژوهشی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴ / ۱۱ / ۳ / ۸۹ - 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: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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 دیگری 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 جداول 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 (Petrak, 1953)، معتقد است... و یا به اعتقاد شیمی و همکاران (Shimi et al., 2005).

- *et al.* واژه‌ای لاتینی است و حتما 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 $21 \times 29/7$ 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 ۲۰۰ 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 و با 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. (دو خط 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 (و 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 حتما 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 posremergrnce 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/michelmore/projectssummary.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.

بررسی ساختار اسکلتی شیر ماهی *Schizothorax pelzami* از حوضه دشت کویر

پریا جلیلی، سهیل ایگدری، شیما لطیف نژاد، مهوش سیفعلی..... ۹

بیان افزایش یافته پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده از محیط کشت بهینه سازی شده

زهرا حاجی حسن، نوید نظری..... ۲۳

تولید اسیدهای چرب با قابلیت سوخت زیستی توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* از گلوکز

فرشاد درویشی، ناهیده سلمانی..... ۳۶

بررسی تمایل اتصال داروی ضد سرطان وینکریستین به پروتئین های هیستونی کروماتین با استفاده از روشهای

اسپکتروسکوپی

آزاده محمدقلی، عذرا ربانی چادگانی..... ۴۸

بررسی ساختار میوه در گونه های اندمیک و نیمه اندمیک (*Veronica L. (Plantaginaceae)* در ایران

شهریار سعیدی مهرورز، صغری رمزی..... ۶۱

اثر تنش شوری بر ارقام برنج (*Oryza Sativa L.*) در مرحله گیاهچه ای و زایشی تحت شرایط کشت

هیدروپونیک

فرزین سعید زاده، رضا تقی زاده..... ۷۹

مطالعه تنوع زیستی گونه های گیاهی آوندی در منطقه حفاظت شده بیدوئیه بردسیر کرمان

شیرین شکیب، مجید شریفی تهرانی و زهرا حسن آبادی..... ۹۵

جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز برون سلولی فاقد خاصیت گلوتامینازی از خلیج

فارس

سالومه شعاعی نایینی، امید رعنائی سیادت، غلامحسین ابراهیمی پور، بیژن بمبئی..... ۱۱۱

طراحی و ساخت سامانه الکترومغناطیس کننده با نانو فیلترهای مؤثر به منظور افزایش تولید و کاهش آلودگی

زیست محیطی در آبیاری محصولات کشاورزی

شاهین شرفالدین شیرازی، منصور نجاتی جهرمی، مهدی سیمیری.....۱۳۳

مقایسه ی ترکیبات شیمیایی عضله ماهی تیلاپیای وارداتی (*Oreochromis niloticus*) با عضله ماهی قزل

آلای پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) استان خوزستان

فاطمه نقیعی، ابوالفضل عسکری ساری.....۱۵۴

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* تیمار شده با اشعه UV در فرایند فروشویی

میکروبی اورانیوم

ملوس شیدایی، رضا حاج حسینی.....۱۷۰

حفاظت انجمادی بذر گیاه کنجد (*Sesamum indicum L.*) به روش **Vitrification**

مهدی کاکایی، محسن منصورى.....۱۹۰

بررسی ساختار اسکلتی شیر ماهی *Schizothorax pelzami* از حوضه دشت کویر

پریا جلیلی^۱، سهیل ایگدري^{۲*}، شیما لطیف نژاد^۳، مهوش سیفعلی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

گونه شیر ماهی *Schizothorax pelzami* یکی از اعضای خانواده کپورماهیان در حوضه‌های آبریز دشت کویر و هری رود است. با توجه به اهمیت ویژگی‌های استخوان‌شناسی در آرایه‌شناسی ماهیان و فقدان اطلاعات در مورد ویژگی‌های استخوان‌شناسی *S. pelzami* این تحقیق با هدف توصیف ویژگی‌های استخوان‌شناسی این گونه به اجرا درآمد. برای مطالعه ساختار اسکلتی، نمونه‌ها توسط آلسیان بلو و آلیزارین رد شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی شدند. تصویربرداری ساختارهای اسکلتی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط دستگاه اسکنر مجهز به حمام گلیسیرین انجام شد. ترسیم و نام‌گذاری ساختار اسکلتی صورت پذیرفت. بررسی ساختار استخوانی نیز توسط استریومیکروسکوپ انجام و توصیف شد. بر اساس نتایج، گونه *S. pelzami* با ویژگی‌های استخوانی (۱) وجود ۴۴ مهره، (۲) استخوان بینی کشیده و بدون قوس، (۳) باله مخرجی با موقعیت قدامی‌تر (در نزدیکی مهره ۲۷)، (۴) پهن‌تر بودن بخش خلفی استخوان قاعده‌ای آبششی نسبت به بخش قدامی، (۵) صاف بودن لبه خلفی استخوان دملامی و (۶) عدم وجود استخوان پیش‌کامی از سایر گونه‌های این جنس قابل شناسایی است.

واژه های کلیدی: آب‌های داخلی ایران، آرایه شناسی، استخوان‌شناسی، توصیف.

مقدمه

شیرماهی، *Schizothorax pelzami* (Kessler, 1870) از جمله اعضای خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است (شکل ۱) که در حوضه‌های هری‌رود و دشت کویر ایران یافت می‌شود (Coad, 2017). این گونه یکی از سه گونه زیرخانواده Schizothoracine در ایران می‌باشد که به‌واسطه داشتن تعداد فلس‌های زیاد در خط جانبی و وجود فلس‌های بزرگ در اطراف مخرج و باله مخرجی از سایر گونه‌ها قابل شناسایی است (Coad, 2017). از این جنس دو گونه *S. zarudnyi* و *S. intermedius* نیز از حوضه سیستان ایران گزارش شده است (Jouladeh-Roudbar et al., 2015). گونه *S. pelzami* به‌واسطه داشتن ویژگی‌های

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

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

* (نویسنده مسئول soheil.eagderi@ut.ac.ir)

۳- دانشجوی کارشناسی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران.

ریختی شامل باله پشتی با ۷-۸ شعاع منشعب و ۳-۴ شعاع غیرمنشعب، باله مخرجی با ۶-۵ شعاع منشعب (معمولاً ۵) و ۳ شعاع غیرمنشعب، باله سینه‌ای با ۲۱-۱۶ شعاع منشعب و باله شکمی با ۹-۷ شعاع منشعب قابل تشخیص می‌باشد. در این گونه همچنین خار باله پشتی بسیار ضخیم بوده و به خوبی توسعه یافته و دنداندار است. تعداد فلس‌های خط جانبی به ۱۰۸ عدد می‌رسد. فرمول دندان حلقی در این گونه ۵,۳,۲-۲,۳,۵ بوده و دندان‌ها گرد و دارای نوک قلاب مانند می‌باشند (Coad, 2015).

ساختار اسکلتی ماهیان در بردارنده اطلاعات زیست‌شناختی و اکولوژیکی فراوانی است و برای درک روابط تبارشناختی و روند تکامل و بررسی ویژگی‌های آرایه شناختی و طبقه‌بندی آن‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد. امروزه زیست‌شناسان با اطلاعات فراوانی که از ساختارهای اسکلتی ماهیان به دست می‌آورند، اطلاعات زیادی در مورد سن، جنس، مکان و شرایط محیطی آن‌ها را می‌توانند به راحتی استخراج نمایند (Helfman *et al.*, 2009). مطالعات بسیار اندکی در مورد زیست‌شناسی این گونه از جمله بررسی هورمون‌های استروئیدی جنسی (Safari *et al.*, 2014) و ریخت‌سنجی مقایسه‌ای جمعیت‌های حوضه‌های کویر و تجن (Sazgar *et al.*, 2017) انجام شده است. از آنجایی که اطلاعاتی در زمینه ویژگی‌های استخوان‌شناسی گونه *S. pelzami* در دسترس نمی‌باشد، بنابراین این تحقیق با هدف توصیف ویژگی‌های استخوان‌شناسی این گونه به اجرا درآمد. نتایج این تحقیق می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات تبارزایی این آرایه براساس صفات استخوان‌شناسی باشد.



شکل ۱: نمای جانبی شیر ماهی، *Schizothorax pelzami* رودخانه چشمه علی دامغان، حوضه آبریز دشت کویر.

مواد و روش کار

تعداد ۲۲ عدد شیر ماهی *S. pelzami* از رودخانه چشمه علی دامغان واقع در حوضه آبریز دشت کویر توسط دستگاه الکتروشوکر نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها پس از بیهوشی در محلول گل میخک، در فرمالین ده درصد بافری تثبیت شدند. برای مطالعه ساختار اسکلتی تعداد ۷ نمونه بالغ با طول استاندارد ۷۲/۷-۶۵/۵ میلی‌متر براساس روش اصلاح شده Van و Taylor (۱۹۸۵) Dyke توسط آلسیان بلو و آلیزارین رد شفاف‌سازی و رنگ آمیزی شدند (شکل ۲). تصویربرداری ساختارهای اسکلتی نمونه‌های رنگ آمیزی شده توسط دستگاه اسکنر Epson v600 مجهز به یک حمام گلیسیرین، انجام شد. ترسیم و نام‌گذاری

تصاویر در نرم افزار CorelDraw X6 صورت پذیرفت. بررسی ساختار استخوانی نیز توسط استریومیکروسکوپ Leica MS5 انجام شد. نام گذاری ساختارهای استخوانی نیز براساس روجو (۲۰۰۹) و جلیلی و همکاران (۲۰۱۵d) انجام شد



شکل ۲: نمونه شفاف و رنگ آمیزی شده ماهی شیر *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۰/۵ سانتی متر است).

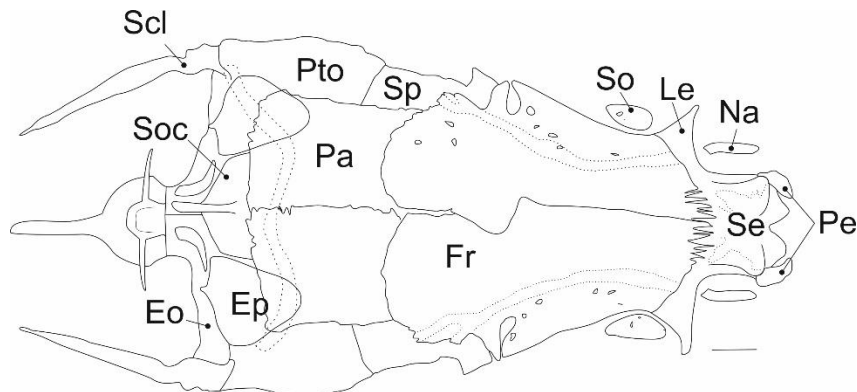
نتایج

در مجموعه عصبی (Neurocranium)، ناحیه بویایی (Ethmoid) شامل استخوان‌های اتموئید فوقانی (Supraethmoid)، اتموئید جانبی (Lateral ethmoid)، پیش‌اتموئید (Preethmoid-I)، بینی (Nasal)، و مر (Vomer) و کین‌اتموئید (Kinethmoid) می‌باشد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). استخوان اتموئید فوقانی شامل دو بخش عمودی و افقی است. بخش افقی دارای دو زائده قدامی-جانبی نوک تیز است. بخش عمودی این استخوان نیز به استخوان‌های و مر و اتموئید جانبی متصل می‌گردد. استخوان بینی که در حاشیه جانبی اتموئید فوقانی واقع شده است، دارای دو سوراخ جانبی می‌باشد. کانال فوق چشمی از میان استخوان بینی عبور می‌کند. اتموئید جانبی در بخش قدامی و خلفی مقعر می‌گردد. این استخوان در بخش شکمی صاف بوده و دارای یک زائده قدامی می‌باشد که به حاشیه خلفی و مر متصل می‌شود. بخش قدامی استخوان و مر نیز V شکل است و به استخوان پیش‌اتموئید اتموئید I متصل می‌شود. پیش‌اتموئید I نیم‌دایره‌ای شکل بوده و به حاشیه قدامی جانبی و مر متصل می‌شود.

ناحیه بینایی (Orbit) شامل استخوان‌های پیشانی (Frontal)، حدقه‌ای پروانه‌ای (Orbitosphenoid)، بالی پروانه‌ای (Ptersphenoid)، اطراف پروانه‌ای (Parasphenoid) و استخوان‌های دور چشمی (Circumorbital) است. استخوان‌های دور چشمی شامل ۶-۷ استخوان زیرچشمی (Infraorbital) و یک استخوان فوق چشمی (Supraorbital) می‌باشد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). استخوان پیشانی بزرگ بوده و در بخش میانی دارای زائده‌ای است که به استخوان پروانه‌ای متصل می‌گردد. حاشیه قدامی این استخوان دندان‌دار است. جفت استخوان حدقه‌ای پروانه‌ای در بخش شکمی به یکدیگر متصل شده و در محل اتصال یک زائده تیغه‌ای شکل را تشکیل می‌دهند. استخوان بالی پروانه‌ای در بخش پشتی به پیشانی و توسط یک زائده شکمی به اطراف پروانه‌ای متصل می‌گردد (شکل ۵). استخوان دراز اطراف پروانه‌ای در بخش قدامی به و مر و در بخش خلفی به بخش میانی قاعده‌ای پس‌سری متصل بوده و حاشیه خلفی آن دو می‌باشد.

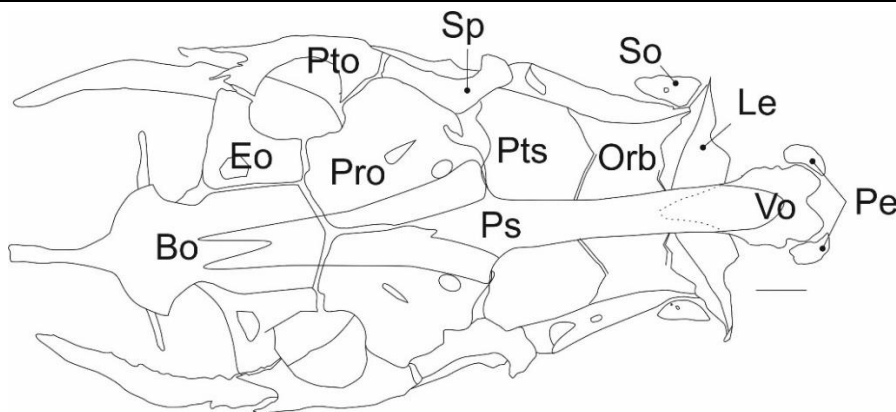
مجموعه استخوان‌های آه یا نه (Parietal)، پروانه‌ای (Sphenotic)، پتراتیک (Pterotic)، پتراتیک پوستی (Dermopterotric)، پرواتیک (Prootic) و اپی‌اتیک (Epiotic) ناحیه شنوایی (Otic) مجموعه عصبی را تشکیل داده‌اند (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). استخوان آهیانه دارای حاشیه دنداندار بوده و تعدادی حفره کوچک بر روی آن مشاهده می‌شود. زائده جانبی استخوان پروانه‌ای به استخوان پیشانی متصل شده و دارای انحنا روی به عقب است. استخوان اپی‌اتیک بین استخوان‌های پتراتیک و فوق پس سری قرار دارد و دارای حاشیه خلفی آن ۷ شکل است (شکل ۳). استخوان پتراتیک پهن بوده و با حاشیه خلفی پروانه‌ای دارای هم‌پوشانی است. استخوان پرواتیک با یک زائده بالارونده در بخش جانبی داخلی به استخوان اطراف پروانه‌ای متصل می‌گردد (شکل ۴).

ناحیه پس سری مجموعه عصبی (Occipital) شامل استخوان‌های فوق پس سری (Supraoccipital)، پس سری خارجی (Exoccipital) و قاعده‌ای پس سری (Basioccipital) است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). استخوان فوق پس سری پنج ضلعی بوده و در بخش میانی دارای یک زائده تیغه‌ای شکل می‌باشد. استخوان قاعده‌ای پس سری دارای یک زائده حلقی و یک صفحه خردکننده شکمی است. استخوان پس سری خارجی دیواره پشتی مجموعه را تشکیل داده و دارای یک حفره میانی بزرگ می‌باشد (شکل ۳). در بخش جانبی مجموعه عصبی دو فرورفتگی مفصلی جهت اتصال به استخوان فکی لامی مشاهده می‌شود.



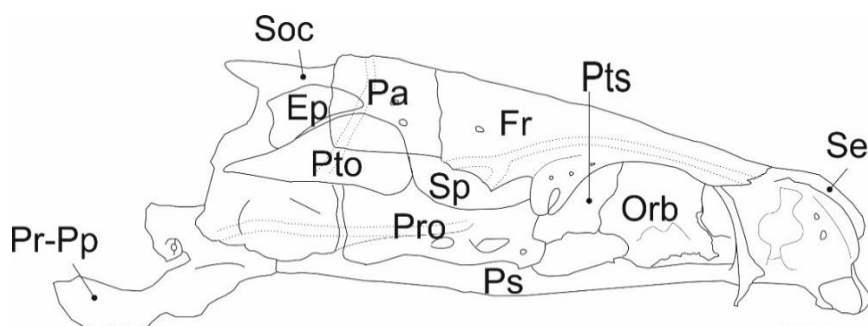
شکل ۳: نمای پشتی مجموعه عصبی گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی‌متر است).

Ep: epiotic (فوق گوشه یا اپی‌اتیک); Eo: exoccipital (پس سری خارجی); Fr: frontal (پیشانی); Le: lateral ethmoid (بالی گوشه یا اتموئید جانبی); Na: nasal (بینی); Pa: parietal (پیش‌اتمئید); Pto: pterotic (پیش‌اتمئید); Pe: preethmoid I (آهیانه‌ای); Se: supraethmoid (پروانه‌ای); Sp: sphenotic (سری) یا پتراتیک (ترقوه فوقانی); So: supraorbital (فوق چشمی); Soc: supraoccipital (فوق پس-پس); Scl: supracleithrum (اتمئید فوقانی);



شکل ۴: نمای شکمی مجموعه عصبی گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی متر است).

; Le: ethmoid lateral (پس سری خارجی یا برون پس سری); Eo: exoccipital (قاعده‌ای پس سری) Bo: basioccipital (پیش گوشه‌ای); Pro: prootic (پیش اتموئید); Pe: preethmoid I (I حدقه‌ای پروانه‌ای); Orb: orbitosphenoid (اتموئید جانبی) یا پرواتیک); Pts: pterosphenoid (اطراف پروانه‌ای); Ps: parasphenoid (بالی پرواتیک یا پرواتیک); Pto: pterotic (بالی پروانه‌ای); Vo: vomer (پروانه‌ای); Sp: sphenotic (فوق چشمی); So: supraorbital (پتراتیک) (ومر یا تیغه‌ای)

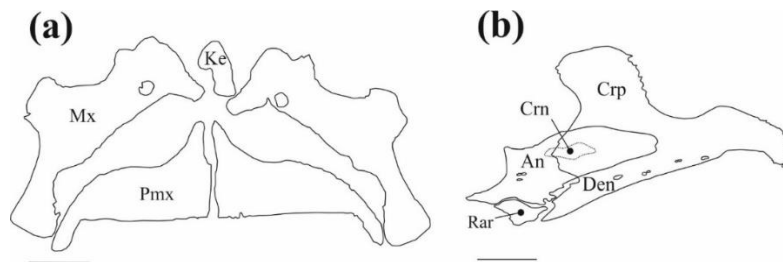


شکل ۵: نمای جانبی مجموعه عصبی گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی متر است).

; Pa: parietal (حدقه‌ای پروانه‌ای); Orb: orbitosphenoid (پیشانی); Fr: frontal (فوق گوشه‌ای یا اپی اتیک) Ep: epiotic (فوق گوشه‌ای یا اپی اتیک) Pts: pterosphenoid (اطراف پروانه‌ای); Ps: parasphenoid (بالی پرواتیک یا پرواتیک); Pro: prootic (آهیانه) یا پرواتیک); Pto: pterotic (پیش گوشه‌ای یا پرواتیک) یا پرواتیک); Sp: sphenotic (پس سری) (زائده خلفی قاعده‌ای پس سری); Se: supraethmoid (پروانه‌ای); Soc: supraoccipital (فوق پس سری) Pr-Pp: posterior process of basioccipital (اتموئید فوقانی)

فک بالا شامل سه استخوان فکی (Maxillary) و کاین اتموئید (Kinethmoid) و پیش فکی (Premaxillary) می‌باشد (شکل ۶a). استخوان فکی دراز بوده و در بخش قدامی باریک تر و متمایل به پایین و دارای حفراتی در بخش میانی است. استخوان کاین اتموئید استوانه‌ای شکل و کوچک بوده و در بخش قدامی جفت استخوان فکی واقع شده است. پیش فکی در بخش قدامی پهن و در بخش خلفی باریک و متمایل به پایین بوده و در بخش زیرین فکی واقع شده است. فک پایین شامل استخوان‌های دندانی (Dentary)، رتروآرتیکولار (Retroarticular) و زاویه‌ای (Angular) می‌باشد که غضروف کروئومکلین (Cronomeckelian) در سطح درونی آن قرار دارد (شکل ۶b). استخوان دندانی در قسمت میانی پهن بوده و در بخش خلفی به استخوان زاویه‌ای و رتروآرتیکولار متصل می‌گردد. استخوان زاویه‌ای در بخش قدامی به غضروف کروئومکلین متصل بوده و در بخش خلفی دارای

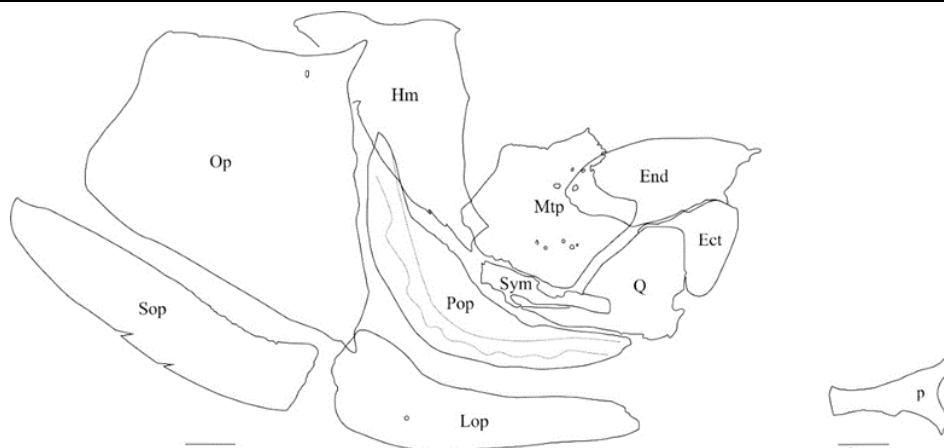
یک فرورفتگی مفصلی جهت اتصال به استخوان مربعی است. استخوان رتروآرتیکولار نیز کوچک بوده و بخش فوقانی آن به بخش شکمی خلفی زاویه‌ای و بخش قدامی آن به بخش خلفی دندان‌ی متصل می‌گردد.



شکل ۶: نمای داخلی استخوان‌های فک بالا (a) و فک پایین (b) گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی‌متر است).
 Max: maxillary (فکی) Pmax: premaxillary (فکی); Ke: kinethmoid (پیش‌فکی); Den: (کاین‌اتموتید یا خویش‌پرویزی); Crp: coronoid (زاویه‌ای); An: angular (رتروآرتیکولار) یا (پس‌مفصلی یا رتروآرتیکولار); Rar: retroarticular (دندانی) dentary
 process (زائده کروئید); Crn: cronomeckelian (غضروف کروئومکلین)

فک‌آویز (Suspensorium) شامل استخوان‌های فکی‌لامی (Hyomandibular)، مربعی (Quadrate)، ساده (Symplectic)، رجلی‌پشتی (Metaptrygoid)، رجلی‌خارجی (Ectoptrygoid)، رجلی‌داخلی (Endoptrygoid) و کامی (Palatine) می‌باشد (شکل ۷). استخوان فکی‌لامی در بخش قدامی باریک و دارای یک برآمدگی در حاشیه قدامی است. استخوان مربعی دارای یک زائده خلفی بوده که استخوان ساده بر روی آن قرار می‌گیرد. استخوان کامی در بخش خلفی به رجلی داخلی و در بخش قدامی به استخوان پیش‌اتموتید I و ورم متصل می‌شود. استخوان رجلی‌پشتی در بخش پشتی دارای یک زائده مثلثی شکل و حفرات متعدد است. در حاشیه پشتی این استخوان دو شیار کوچک وجود دارد. رجلی داخلی در بخش قدامی باریک‌تر از بخش خلفی است.

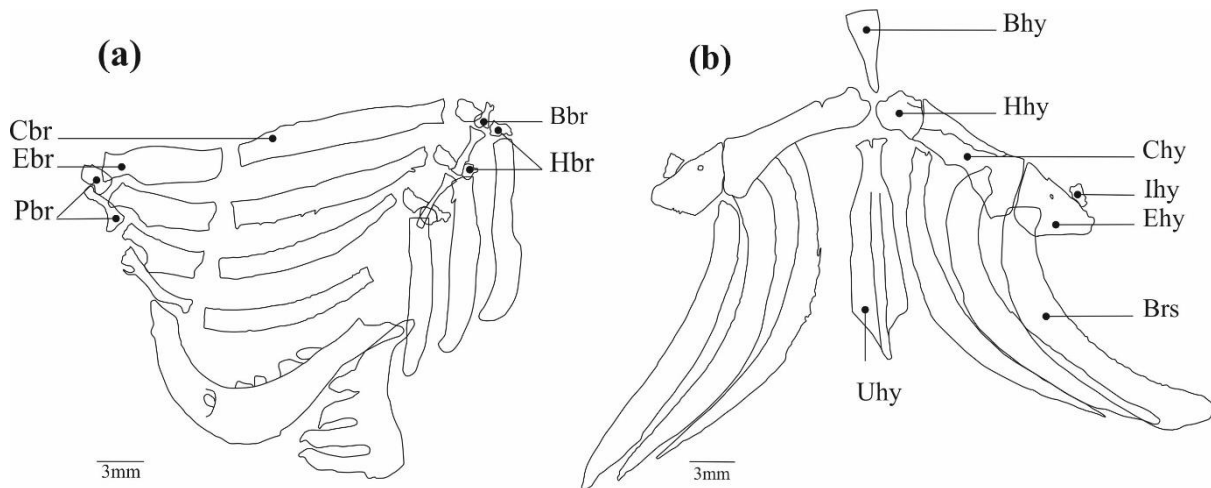
مجموعه سرپوش آبششی (Opercle) شامل مجموعه استخوان‌های سرپوش‌آبششی، پیش‌سرپوش آبششی (Preopercle)، زیرسرپوش آبششی (Subopercle) و سرپوش آبششی میانی (Interopercle) است (شکل ۷). سرپوش آبششی دارای یک فرورفتگی قدامی پشتی برای اتصال به فکی لامی بوده و در بخش پشتی کمی مقعر و باریک‌تر از بخش شکمی است. استخوان‌های سرپوش آبششی میانی و زیرسرپوش آبششی دراز و در امتداد هم می‌باشند. پیش‌سرپوش آبششی L شکل بوده و تا بخش قدامی مربعی امتداد دارد.



شکل ۷: نمای جانبی مجموعه استخوان های فک آویز و سرپوش آبششی گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی- متر است). Hm: hyomandibulare (فکی لامی) Iop: interopercle (سرپوش آبششی میانی) Mtp: metapterygoid (میان بالی یا رجلی پستی) Op: opercle (سرپوش آبششی) Q: quadrate (پیش سرپوش آبششی) Pop: preopercle (کامی) Pal: palatine (سرپوش آبششی) Sym: symplectic (زیر سرپوش آبششی) Sop: subopercle (مریعی) (ساده)

کمان آبششی (Branchial apparatus) شامل چهار جفت استخوان غضروفی آبششی (Ceratobranchial)، فوق آبششی (Epibranchial)، سه جفت استخوان زیرآبششی (Hypobranchial)، دو جفت استخوان حلقی آبششی (Pharyngobranchial) و سه استخوان منفرد قاعده‌ای آبششی (Basibranchial) می‌باشد (شکل ۸ a). این گونه دارای دندان حلقی با فرمول ۵،۳،۲-۲،۳،۵ می‌باشد.

مجموعه استخوان‌های کمان لامی (Hyoid arch) شامل استخوان‌های منفرد اوروهیال (Urohyal) و قاعده‌ای لامی (Basihyal)، جفت استخوان‌های تحت لامی (Hypohyal) و غضروفی لامی (Ceratohyal)، فوق لامی (Epihyal)، بین لامی و سه جفت شعاع پایه آبششی (Branchiostegal) واقع شده است. استخوان قاعده‌ای لامی دراز و باریک است. اوروهیال دارای دو بخش افقی و عمودی بوده که بخش خلفی قسمت افقی مقعر و پهن‌تر از بخش قدامی آن می‌باشد. بخش خلفی استخوان غضروفی لامی نیز پهن‌تر از بخش قدامی است. استخوان بین لامی گرد بوده و بر روی استخوان فوق لامی واقع شده است (شکل ۸ b).

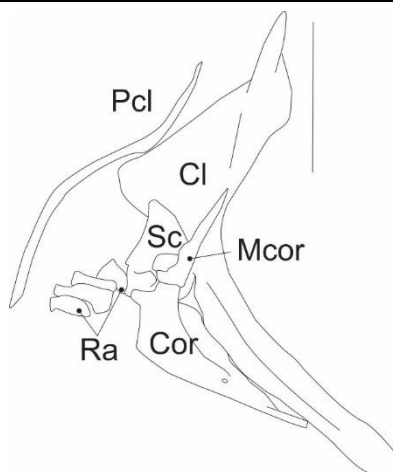


شکل ۸: نمای پشتی مجموعه استخوان های کمان آبششی (a) و کمان لامی (b) گونه *Schizothorax pelzami*

Bhy: basihyal (قاعدہ‌ای لامی); Brs: branchiostegal rays (لامی); Chy: ceratohyal (شعاع پایه آبششی); Ebr: epibranchial (فوق لامی); Hhy: dorsal and ventral hypohyal (تحت لامی یا زیر لامی پشتی و شکمی); Ihy: interhyal (بین لامی); Uhy: urohyal (لامی); Cbr: ceratobranchial (قاعدہ‌ای آبششی); Bbr: basibranchial (اوروهیال); Hbr: hypobranchial (فوق آبششی); Pbr: phrapparyngobranchial (زیر آبششی); (حلقی آبششی)

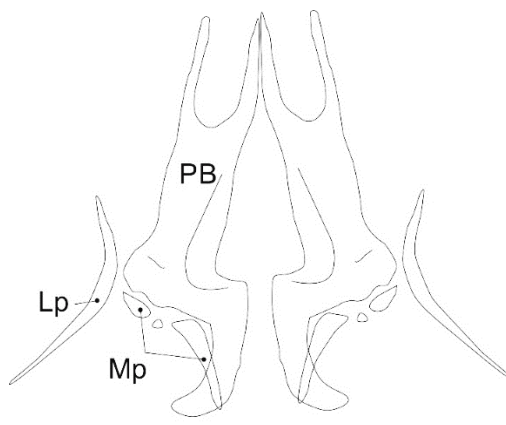
استخوان‌های کمر بند سینه‌ای (Pectoral girdle) شامل ترقوه (Cleithrum)، ترقوه فوقانی (Supracleithrum)، ترقوه

خلفی (Postcleithrum)، غرابی (Coracoid)، غرابی میانی (Mesocoracoid)، کتف (Scapula)، پشتی گیجگاهی (Posttemporal)، فوق گیجگاهی (Supratemporal) و رادیال‌ها (Radials) می‌باشد (شکل ۹). استخوان ترقوه L شکل بوده و بخش افقی آن پهن تر از بخش عمودی است. در این استخوان، انتهای بخش افقی محدب بوده و دارای یک زائده جانبی قدامی نوک تیز است که به استخوان غرابی متصل می‌گردد. در پشت این زائده، دو زائده مثلثی شکل وجود دارد که زائده قدامی مایل به بالا و زائده خلفی متمایل به پایین می‌باشد که ترقوه را به بخش خلفی استخوان غرابی متصل نگه می‌دارد. در بخش شکمی، محل اتصال دو بخش افقی و عمودی استخوان ترقوه یک برآمدگی تیغه‌ای شکل وجود دارد که این استخوان را به کتف متصل می‌کند. استخوان غرابی دراز بوده و دارای یک زائده جانبی داخلی است که از طریق آن به کتف و ترقوه متصل می‌گردد. استخوان غرابی همچنین دارای یک فرورفتگی پشتی، جهت اتصال به غرابی میانی و تعداد زیادی منفذ می‌باشد. استخوان دراز و باریک غرابی میانی در بخش شکمی به غرابی و در بخش پشتی به ترقوه متصل می‌گردد. استخوان کتف در بخش میانی دارای یک حفره بزرگ است. یک کانال عصبی از سه استخوان ترقوه فوقانی و پشتی گیجگاهی و فوق گیجگاهی عبور می‌کند. باله سینه‌ای دارای یک شعاع غیرمنشعب و سیزده شعاع منشعب و چهار استخوان رادیال است.



شکل ۹: کمر بند سینه‌ای گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی‌متر است).
Cl: cleithrum (ترقوه); **Cor: coracoid** (غرابی); **Mcor: mesocoracoid** (غرابی); **Pcl: postcleithrum** (غرابی میانی); **Ra: radials** (خلفی); **Sc: scapula** (شعاع‌ها); **کتف**)

جفت استخوان‌های بسی‌پتریگیوم (*Basipterygium*) و متاپتریگیوم (*Metapterygium*) و پتریگیوم جانبی (*Lateral- pterygium*) مجموعه استخوان‌های کمر بند شکمی (*Pelvic girdle*) را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۰). در حاشیه جانبی-داخلی استخوان بسی‌پتریگیوم یک برآمدگی وجود دارد که در کنار آن یک جفت استخوان پتریگیوم جانبی تقریباً L شکل مشاهده می‌شود. سه استخوان متاپتریگیوم در بخش خلفی بسی‌پتریگیوم واقع شده‌اند. داخلی‌ترین متاپتریگیوم منفرد، بزرگ و اندکی کمانی شکل می‌باشد. متاپتریگیوم خارجی و میانی کوچک بوده و به صورت جفت هستند.

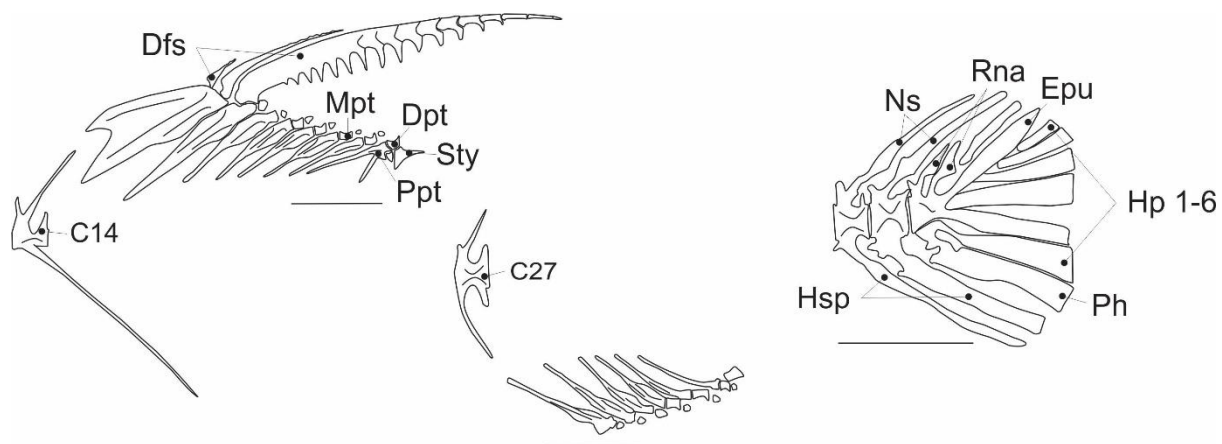


شکل ۱۰: کمر بند شکمی گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی‌متر است).
PB: basipterygium (پایه رجلی یا بسی‌پتریگیوم); **Lp: lateral pterygium** (رجلی جانبی یا پتریگیوم جانبی); **Mp: metapterygium** (میان رجلی یا متاپتریگیوم)

اسکلت محوری دارای ۴۴ جسم مهره می‌باشد که مانند سایر کپورماهیان (Rojo, 1991) ۴ مهره اول آن در تشکیل دستگاه وبر شرکت دارد. ناحیه سری (*Cranial*) دارای ۲۰ جسم مهره و ناحیه دم (*Caudal*) دارای ۲۴ جسم مهره می‌باشد. در باله منفرد دم، آخرین جسم مهره، شعاع‌های اصلی، *Procurrent* و مجموعه‌ای از زوائد استخوانی شامل استخوان‌های هیپورال

(Hypural) و ایپورال (Epural)، پارهیپورال (Parhypural)، پلئوراستیل (Pleurostile) و اورونئورال (Uroneural) اسکلت باله دمی را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۱). اولین مهره دم دارای دو زائده عصبی است. استخوان پارهیپورال در بخش جانبی داخلی دارای زائده هیپوراپوفیز (Hypurapophysis) می‌باشد. استخوان پارهیپورال در بخش میانی پهن تر شده و در بخش قدامی باریک است و به اولین استخوان هیپورال جوش می‌خورد. مهره‌های ناحیه سری برخلاف مهره‌های ناحیه دمی، دارای زایگاپوفیز عصبی قدامی و پشتی (Neural Postzygapophyses & Pre zygapophyses) توسعه یافته بوده و بالعکس مهره‌های ناحیه دمی دارای زایگاپوفیز خونی پشتی توسعه یافته بوده در حالی که در مهره‌های ناحیه سری این گونه نمی‌باشد.

باله منفرد پشتی دارای سه شعاع غیرمنشعب، ۷ شعاع منشعب و ۸ سری استخوان پتریگیوفور (Pterygiophor) و یک استخوان Stay بوده و از مهره ۱۴ شروع می‌شود. اولین استخوان پتریگیوفور بزرگ بوده و دو شعاع غیرمنشعب باله پشتی را حمایت می‌کند. باله مخرجی نیز دارای سه شعاع غیرمنشعب و ۵ شعاع منشعب و ۶ سری استخوان پتریگیوفور و یک استخوان Stay بوده و از مهره ۲۷ شروع می‌شود. اولین پتریگیوفور دو شعاع ابتدایی را حمایت می‌کند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: باله‌های پشتی، مخرجی و دمی در گونه *Schizothorax pelzami* (خط مقیاس ۳ میلی‌متر است).

C14-27: centrum 14-27 (مهره ۱۴-۲۷); Dfs: dorsal fin spine (خار باله پشتی); Dpt: distal pterygiophore (پرتوپایه یا پتریگیوفور بیرونی); Epu: epural (دمپره یا هیپورال); Hsp: hemal (دمپره یا هیپورال); Hp 1-6: hypural plates 1-6 (بالا پره یا ایپورال); Ns: neural spine (پرتوپایه یا پتریگیوفور میانی); Mtp: medial pterygiophore (خار خونی spine); Ppt: proximal pterygiophore (یا پتریگیوفور درونی پرتوپایه); Ph: parhypurale (پرتوپایه یا پارهیپورال); Rna: rudimentary (زیردمپره یا پارهیپورال); Sty: stay (کمان عصبی ابتدایی) (استی).

بحث و نتیجه گیری

مقایسه ساختارهای ریختی، خصوصاً ساختار اسکلتی، یک عنصر کلیدی در زیست‌شناسی تکاملی، آرایه‌شناسی و درک تنوع موجودات می‌باشد (Dean et al., 2004). تاکنون مطالعات استخوان‌شناسی اندکی بر روی اعضای خانواده کپورماهیان ایران از جمله *Garra typhlops* (Jalili et al., 2014)، *Alburnus mossulensis* (Jalili et al., 2015a) و *A. amirkabri* (Jalili et al., 2015a) انجام شده است.

(Jalili et al., 2015c) *Barbus cyri* و (Jalili et al., 2015d) *Cabdio morar* انجام شده است. به علاوه تاکنون در

مورد هیچ یک از گونه‌های این جنس *Schizothorax* در ایران مطالعه‌ای در زمینه استخوان‌شناسی صورت نگرفته است. ویژگی‌های مربوط به فرم و ساختار استخوان‌های پیش‌ومر، فوق پس‌سری، سرپوش‌آبششی، فک پایین، پیش فکی، رجلی خارجی، استخوان‌های قاعده‌ای آبششی، دملامی، کمربند سینه‌ای و استخوان لگنی به‌عنوان صفات استخوانی مناسب جهت تفکیک جنس‌های زیرخانواده Schizothoracine شناسایی بیان شده‌اند (Chen et al., 2001). Shabanum و همکاران (۲۰۱۶) نیز بیان داشت که ویژگی‌های استخوانی نقش مهمی در تفکیک و شناسایی اعضای متعلق به جنس *Schizothorax* ایفا می‌کنند. نتایج این مطالعه تفاوت‌هایی در شکل برخی استخوان‌ها نسبت به نتایج ارائه شده توسط چن و همکاران (۲۰۰۱) و شابانوم و همکاران (۲۰۱۶) برای اعضای جنس *Schizothorax* نشان داد. استخوان قاعده‌ای آبششی در گونه *S. pelzami* مورد مطالعه در بخش خلفی پهن‌تر از بخش قدامی است، درحالی که بر اساس چن و همکاران (۲۰۰۱)، این استخوان در بخش قدامی پهن‌تر از بخش خلفی است. در گونه *S. pelzami* لبه خلفی استخوان دملامی صاف بوده اما طبق مطالعات چن و همکاران (۲۰۰۱) لبه خلفی این استخوان در اعضای این جنس برآمده است. همچنین برای جنس *Schizothorax* یک یا دو جفت استخوان پیش‌کامی (Prepalatine) گزارش شده است که در این مطالعه برای گونه *S. pelzami* چشمه علی دامغان برخلاف سایر گونه‌های این جنس مشاهده نشد (Chen et al., 2001).

در مطالعه دیگری که بر روی جمعیت‌های مختلف *S. richardsonii* از انشعابات رودخانه بیس (Beas) واقع در شمال هند صورت پذیرفت (Shabanum et al., 2016)، بخش‌های مختلف ساختار اسکلتی این گونه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مقایسه نتایج این مطالعه با یافته‌های شابانوم و همکاران (۲۰۱۶)، تفاوت‌های قابل توجهی بین گونه *S. richardsonii* و *S. pelzami* وجود دارد. در گونه *S. pelzami* تعداد ۴۴ مهره در ستون مهره مشاهده شد درحالی که تعداد آنها در *S. richardsonii* به ۴۳ عدد می‌رسد. در هر دو گونه باله پشتی بر روی مهره ۱۴ یا ۱۵ قرار می‌گیرند، اما باله مخرجی در گونه *S. richardsonii* رودخانه بیس هند در موقعیت عقب‌تری (مهره ۲۹ یا ۳۰) نسبت به گونه *S. pelzami* (مهره ۲۷) قرار دارد. حاشیه خلفی استخوان اطراف پروانه‌ای در گونه *S. pelzami* به‌وسیله یک فرورفتگی به دو شاخه تقسیم می‌گردد درحالی که در گونه *S. richardsonii* انتهای خلفی این استخوان مسطح بوده و دنداندار است. همچنین استخوان بینی در گونه *S. pelzami* کشیده است، اما در گونه *S. richardsonii* داسی شکل است. علاوه بر این، زائده پوزه‌ای استخوان پیش فکی در گونه *S. stoliczkae* گزارش نشده است، در حالی که در گونه *S. pelzami* این زائده به خوبی توسعه یافته می‌باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان داشت که گونه *S. pelzami* بر اساس ویژگی‌های استخوانی شامل داشتن ۴۴ مهره در ستون مهره، استخوان بینی کشیده و بدون قوس، باله مخرجی با موقعیت قدامی‌تر (در نزدیکی مهره ۲۷)، پهن‌تر بودن بخش خلفی استخوان قاعده‌ای آبششی نسبت به بخش قدامی، صاف بودن لبه خلفی استخوان دملامی و عدم وجود استخوان

پیش‌گامی از سایر گونه‌های این جنس قابل شناسایی است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران به اجرا در آمد.

منابع

- Chen, Z. and Chen, Y. (2001) Phylogeny of the specialized schizothoracine fishes (Teleostei: Cypriniformes: Cyprininae). *Zoological Studies*, 40: 147-157.
- Coad, B.W. (2015) Fresh water fishes of Iran. Available at <http://www.briancoad.com>.
- Dean, C.A., Rholf F.J. and Dennis, E.S. (2004) Geometric morphometrics: Ten years of progress following the revolution. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Jalili, P., Eagderi, S. and Mousavi-Sabet, H. (2014) Description of skeletal structure and cranial myology of keyvani spined loach (*Cobitis keyvani*, Mousavi-Sabet et al., 2012) *International Journal of Aquatic Biology*, 2(6):337-345.
- Jalili, P., Eagderi, S., Azimi, H. and Mousavi-Sabet, H. (2015a) Osteological description of the southern king fish, *Alburnus mossulensis* from Iranian part of the Tigris River drainage. *Animal Biology and Animal Husbandry*, 7(2) 113-121.
- Jalili, P., Eagderi, S., Nasri, M. and Mousavi-Sabet, H. (2015b) Descriptive osteology of *Alburnus amirkabiri* (Cypriniformes: Cyprinidae), a newly described species from Namak Lake basin, Central of Iran. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum* (Accepted: 28 April 2015).
- Jalili, P., Eagderi, S. and Nikmehr, N. (2015c) Descriptive osteology of *Barbus cyri* (Teleostei: Cyprinidae) from southern Caspian Sea basin. *Iranian Society of Ichthyology*, 2(2): 105-112.
- Jalili, P., Eagderi, S. and Zamani Faradonbeh, M. (2015d) Comparative osteological study of Waspi, *Cabdio morar* (Hamilton, 1822) in Mashkil and Makran basins - southeast of Iran. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 3(2): 79-96. (In Persian)
- Jouladeh-Roudbar, A., Vatandoust S., Eagderi S., Jafari-Kenari S. and Mousavi-Sabet H. (2015) Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. *AAFL Bioflux*, 8(6): 855-909.
- Helfman, G.S., Collette, B.B., Facey, D.E and Bowen, B.W. (2009) *The diversity of fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. Blackwell Publishing, UK, Oxford.
- Rojo, A.L. (1991) *Dictionary of Evolutionary Fish Osteology*, CRC Press.
- Safari, O., Bagheri Dorbadam, J. and Naserizadeh, M. (2014) Study of plasma sex steroid hormones in female snow trout (*Schizothorax pelzami*) within a year. *Journal of Veterinary Research*, 69(4): 423-430. (In Persian)
- Sazgar, S., Safari, O., Danesh, S. and Yazdanimoghadam, F. (2017) Characterization of Chahu's Fish Comparison (*Schizothorax pelzami*) in the Kavir Area and Tajan using Truss and Morphometric system. The Fifth Iranian Conference of Ichthyology, Islamic Azad University of Babol, 13-14 December 2017. (In Persian)
- Shabanum, Sharma, I., and Dhanze, R. (2016) The significance of osteology in identification of *Schizothorax* species. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(1): 442-447.

Taylor, W.R. and Van Dyke, G.C. (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9: 107-119.

Skeletal structure of Shir mahi *Schizothorax pelzami* from Dasht-e-Kavir basin**P. Jalili¹, S. Eagderi^{2*}, S. Latifnezhad³, M. Seifali⁴****Received: 2017.10.07****Accepted: 2018.11.11****Abstract**

Schizothorax pelzami is a member of Cyprinid family in the Dahst-e-kavir and Hari River basins of Iran. According to importance of osteological characters for taxonomy of fish species and lacking any information regarding osteological features of *S. pelzami*, this study was conducted to provide the detailed osteological characters. For this purpose, specimens were cleared and stained by alcian blue and alizarin red. Their skeletal structures were photographed using a scanner equipped with a glycerol bath. Drawing and nomenclature of the skeletal elements were done and studied under a stereomicroscope. Base on the results, *S. pelzami* species is distinguished from other species of this genus by having (1) 44 vertebrae, (2) a long nasal bone, (3) an anal fin with anterior position (close to 27th centrum), (4) a broader posterior part of basibranchial, (5) a flat posterior margin of urohyal and (6) lack a pre-palatine.

Keywords: *Description, Inland water of Iran, Osteology, Taxonomy.*

1-Phd student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

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

*(Corresponding author: soheil.eagderi@ut.ac.ir)

3-BSc Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

4-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

بیان افزایش یافته پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده از محیط کشت بهینه سازی شده

زهرا حاجی حسن^{۱*}، نوید نظری^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

امروزه پروتئین اکتیوین A به دلیل کاربردهای بالینی فراوان در درمان زخم و بیماری‌های تحلیل عصبی، در میزبان های بیانی متفاوتی به صورت نو ترکیب تولید شده است. از آنجاکه یکی از راه‌های افزایش تولید، رسیدن به تراکم سلولی بالا می باشد، لذا بهینه‌سازی محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور در این پژوهش غلظت عصاره مخمر و گلیسرول به‌عنوان منابع نیتروژن و کربن محیط کشت با استفاده از روش آماری RSM (روش سطح پاسخ)، برای دست‌یابی به بالاترین تراکم سلولی باکتری (*E. coli* BL21 (DE3) ترانسفورم شده با وکتور pET21a: Activin A بهینه‌سازی شد. همچنین تأثیر نمک کلرید منیزیم ($MgCl_2$) بر روی میزان رشد باکتری مذکور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاضر نشان‌دهنده بالاترین تراکم سلولی (رشد) در غلظت ۴۲/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول، ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ می‌باشد. به‌علاوه نتایج دات بلات و آنالیز با نرم‌افزار Image J در این مطالعه نشان داد که میزان بیان پروتئین اکتیوین A نو ترکیب در شرایط بهینه‌شده نسبت به محیط کشت پایه افزایش قابل توجهی داشته است.

واژه‌های کلیدی: اکتیوین A، عصاره مخمر، گلیسرول، $MgCl_2$.

مقدمه

پروتئین اکتیوین A، پروتئینی از اعضای ابر خانواده‌ی فاکتورهای رشد تغییر شکل‌دهنده‌ی بتا (Transforming Growth Factor β) (TGF- β) می‌باشد. این پروتئین به‌صورت هومودایمیری از زیر واحدهای A و به‌صورت β_A/β_A می‌باشد که مونومرها در آن با پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند (Litwack, 2011; Stewar *et al.*, 1986). این پروتئین که توسط گنادها، جفت و سایر ارگان‌ها در بدن انسان تولید و ترشح می‌شود، در فرآیندهای سلولی متعددی از جمله رشد، تمایز، التهاب، آپوپتوز، حفظ و بقای سلول‌های عصبی شرکت می‌کند (Tsuchida *et al.*, 2009; Xia and Schneyer, 2009). از آنجاکه امروزه این پروتئین کاربردهای بالینی متعددی در ترمیم زخم، تمایز سلول‌های بنیادی و درمان بیماری‌های تحلیل عصبی پیدا کرده است (Shidaifat

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

* (نویسنده مسئول: Hajihasan@ut.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

آن به‌ویژه به‌صورت نوترکیب حائز اهمیت می‌باشد. *et al.*, 2001; Abdipranoto-Cowley *et al.*, 2009; Antsiferova *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014) لذا تولید مقادیر زیادی از

گزارش‌ها حاکی از بیان و تولید این پروتئین در میزبان‌های یوکاریوتی مثل CHO، مخمر پیکیا پاستوریس (Yam *et al.*, 2009) و میزبان باکتریایی *E. coli* می‌باشد (حاجی حسن و همکاران، ۱۳۹۵). از آنجاکه باکتری *E. coli* به دلیل سهولت کشت، بازده بالای بیان و ژنتیک شناخته‌شده، کاربرد گسترده‌ای در تولید پروتئین‌های نوترکیب پیدا کرده است، در این بررسی از سویه بیانی *E. coli* BL21 (DE3) استفاده گردید (Chen, 2012). بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط القا مثل غلظت القاگر، دما و زمان القا، تولید پروتئین نوترکیب تولیدی را در این باکتری به میزان قابل توجهی افزایش خواهد داد (Azaman *et al.*, 2010; Papaneophytou *et al.*, 2012; Gholami Tilko *et al.*, 2017). لذا در این بررسی به‌منظور دستیابی به بیشترین میزان تراکم سلولی و متعاقباً بیشترین میزان تولید پروتئین نوترکیب اکتیوین A، منابع کربن و نیتروژن (گلیسرول و عصاره مخمر) و نمک $MgCl_2$ با استفاده از روش آماری (Response Surface Methodology) RSM یا همان روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند.

مواد و روش‌ها

گلیسرول و عصاره مخمر به ترتیب از شرکت بیوبیسیک (Biobasic) کانادا و کیولب (Quelab) کانادا خریداری شدند. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، آنتی‌بادی ضد دنباله پلی‌هیستیدینی و H_2O_2 از شرکت سیگما (Sigma) آمریکا خریداری شدند. کاغذ نیتروسولوز از شرکت میلی‌پور (Millipore) آمریکا خریداری شد و بقیه مواد و بافرها از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شدند.

سویه باکتری و وکتور

در این تحقیق از سویه باکتریایی *E. coli* BL21 (DE3) و وکتور بیانی (+) pET21a ساخت شرکت نواژن (Novagene) آمریکا استفاده گردید. سنتز cDNA اکتیوین A انسانی (کد NM_002192=NCBI) و متعاقباً کلون آن در وکتور مذکور توسط شرکت شاین‌جین (Shinegene) انجام شد. وکتور نوترکیب حاصله به روش شوک حرارتی به باکتری مربوطه ترانسفورم گردید (Sambrook *et al.*, 2001).

تهیه محیط کشت

محیط کشت استفاده‌شده برای کشت شبانه، محیط SOB (Super Optimal Broth) (تریپتون ۲۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم بر لیتر، نمک NaCl ۰/۵ گرم بر لیتر، نمک $MgCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار و نمک KCl ۰/۲ گرم بر لیتر) بود که $\mu g/ml$

۱۰۰ آنتی بیوتیک آمپی سیلین به آن افزوده شد. کشت شبانه به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انجام شد.

تعیین بهترین غلظت $MgCl_2$

به منظور به دست آوردن بهترین غلظت نمک کلرید منیزیم از محیط SOB بدون نمک $MgCl_2$ استفاده گردید (نمونه کنترل). سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ به صورت جداگانه به محیط کنترل اضافه گردید. پس از تلقیح میزان مساوی از کشت شبانه به هریک از محیط‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انکوبه شدند و جذب نوری آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis (ترمو (Thermo))- ساخت آمریکا) در فواصل زمانی معین قرائت گردید.

بهینه‌سازی غلظت کربن (گلیسرول) و نیتروژن (عصاره مخمر) با استفاده از روش RSM

در این پژوهش برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی غلظت منابع کربن و نیتروژن محیط کشت از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده گردید. بهینه‌سازی دو متغیر (منبع کربن و نیتروژن) و آنالیز پاسخ (جذب در ۶۰۰ نانومتر یا همان تراکم سلولی^۱) با استفاده از نرم افزار ۷/۰ Design Expert (استاتناز^۲-آمریکا) انجام شد. معنی دار بودن مدل از طریق *F-test* ارزیابی شد. بدین منظور از غلظت‌های مختلف گلیسرول (۵ تا ۴۰ گرم بر لیتر) و عصاره مخمر (۵ تا ۸۰ گرم بر لیتر) طبق طراحی انجام شده توسط نرم‌افزار استفاده گردید. به هریک از محیط‌های کشت ۳۰ میلی مولار نمک $MgCl_2$ ، ۰/۵ گرم بر لیتر نمک NaCl و ۰/۲ گرم بر لیتر نمک KCl اضافه گردید و پس از تنظیم pH در ۷/۴، تلقیح باکتری از کشت شبانه (۱ درصد حجمی-حجمی) به هر یک صورت پذیرفت. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ به مدت ۱۲ ساعت انجام شد و میزان رشد یا تراکم سلولی با قرائت جذب در ۶۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A و تأیید آن با استفاده از تکنیک دات بلات (Dot Blot)

میزان ۱ درصد از کشت شبانه‌ی سویه *E. coli* BL21 (DE3) حاوی وکتور pET21a::Activin A به‌طور جداگانه به محیط SOB و محیط کشت بهینه‌شده توسط روش RSM اضافه گردید. کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ تا رسیدن به $OD=0/6$ در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد. پس از آن القای پروموتور T7 توسط غلظت ۱ میلی مولار IPTG صورت پذیرفت و انکوباسیون ۴ ساعت دیگر ادامه یافت. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، سلول‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و جمع‌آوری شدند. سپس کل محتوای پروتئینی با افزودن اوره ۸ مولار استخراج گردید. به‌منظور

¹ Cell Density

² Statease

³ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

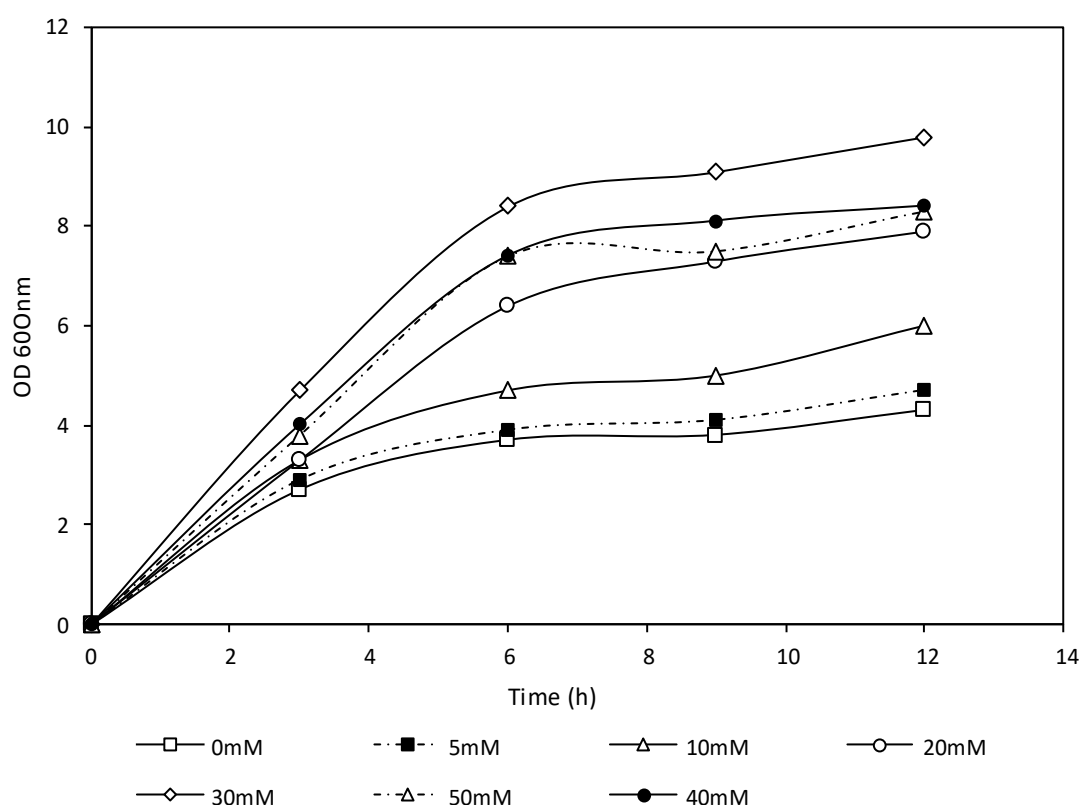
شکست سلولی از روش سونیکاسیون (۱۰ سیکل تکرار به فواصل ۱ دقیقه استراحت) استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی استخراج شده به مقدار مساوی بر روی کاغذ نیتروسلولوز لکه‌گذاری شدند. کاغذ توسط بافر بلوکه کننده TBS-T (نمک NaCl و Tris-HCl) و Tween 20 (حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی^۱ بلوکه شد. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد دنباله پلی‌هیستیدینی متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) با رقت ۱:۱۰۰۰ به کاغذ اضافه گردید. در پایان، کاغذ با DAB و پراکسید هیدروژن به‌عنوان سوبستراهای آنزیم HRP انکوبه گردید.

نتایج

تأثیر $MgCl_2$ بر رشد باکتری‌ها

گزارش‌ها حاکی از آن است که وجود نمک $MgCl_2$ برای رشد باکتری‌ها ضروری است (Lusk *et al.*, 1968; Hanlon *et al.*, 1982; Walker 1994; J. Cao *et al.*, 2009; Nierhaus 2014). لذا به‌منظور به دست آوردن بهترین غلظت $MgCl_2$ ، هفت غلظت مختلف از آن (۰ تا ۵۰ میلی‌مولار) تهیه و به محیط کشت SOB (نمونه کنترل بدون $MgCl_2$) اضافه گردید. پس از کشت باکتری‌ها در هر یک از محلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت و قرائت جذب در ۶۰۰ نانومتر، منحنی رشد در هر یک از حالات ترسیم شد (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود، کمترین میزان رشد در غلظت صفر میلی‌مولار از نمک $MgCl_2$ اتفاق می‌افتد ($nm=۴/۳$) و بهترین رشد در غلظت ۳۰ میلی‌مولار از نمک $MgCl_2$ می‌باشد ($nm=۹/۸$ OD ۶۰۰).

^۱ Skimmed Milk



شکل ۱: منحنی‌های رشد باکتری *E. coli* در غلظت‌های مختلف نمک کلرید منیزیم.

شایان ذکر است که غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ نه تنها تأثیر مثبتی بر روی کشت باکتری‌ها نداشته، بلکه آفت رشد را نیز باعث شده است. لذا در بقیه مراحل کار غلظت ۳۰ میلی‌مولار نمک $MgCl_2$ به محیط کشت اضافه گردید.

بهینه‌سازی غلظت گلیسرول و عصاره مخمر با استفاده از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) RSM

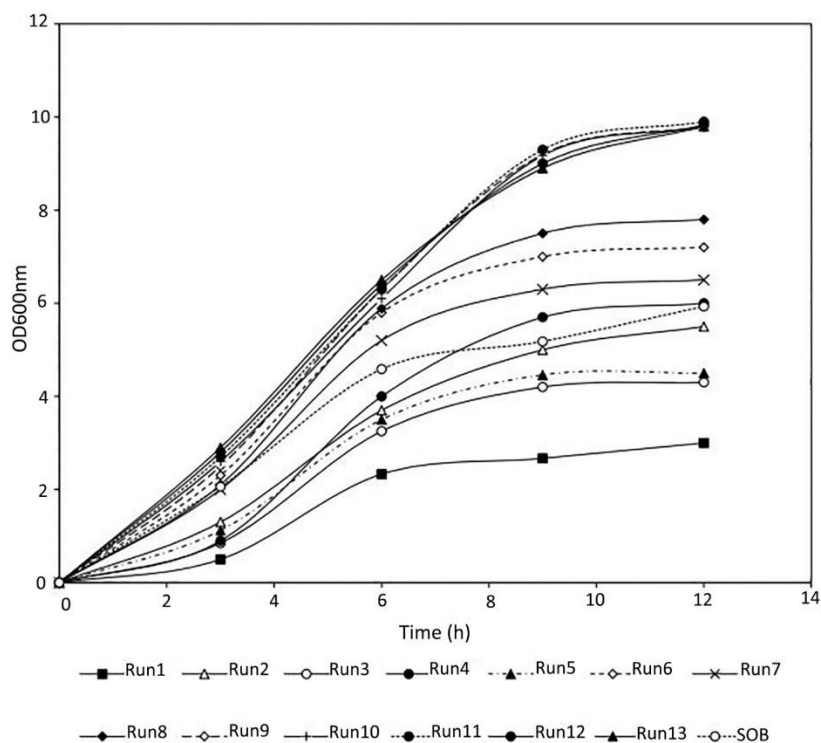
به منظور دستیابی به تراکم سلولی بالا در *E. coli*، به دست آوردن غلظت مناسبی از منابع کربن و نیتروژن از عوامل کلیدی و ضروری می‌باشد. بدین منظور در این مطالعه به ترتیب غلظت‌های ۵ تا ۸۰ و ۵ تا ۴۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر و گلیسرول به عنوان منابع نیتروژن و کربن انتخاب شدند و تأثیر هم‌زمان این دو متغیر بر روی تراکم سلولی یا همان رشد به عنوان پاسخ، به کمک نرم‌افزار Design Expert مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: آزمایش‌های طراحی شده توسط CCD برای بهینه‌سازی منبع کربن و نیتروژن.

آزمایش	غلظت عصاره مخمر (گرم بر لیتر)	غلظت گلیسرول (گرم بر لیتر)	پاسخ (۱) OD_{600nm}
۱	-۱	۵/۰ g/l	۳
۲	+۱	۸۰/۰ g/l	۵/۵
۳	-۱	۴۰/۰ g/l	۴/۳
۴	+۱	۴۰/۰ g/l	۶
۵	-۱	۲۲/۵۰ g/l	۴/۵

۶	+۱	۸۰/۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۷/۲
۷	۰	۴۲/۵۰ g/l	-۱	۵/۰ g/l	۶/۵
۸	۰	۴۲/۵۰ g/l	+۱	۴۰/۰ g/l	۷/۸
۹	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸
۱۰	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۷۸
۱۱	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۹
۱۲	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸۳
۱۳	۰	۴۲/۵۰ g/l	۰	۲۲/۵۰ g/l	۹/۸

با مشاهده جدول ۱ و شکل ۲ که منحنی ترسیم شده در هر یک از غلظت‌ها است، می‌توان چنین استنباط کرد که در غلظت‌های ۴۲/۵ گرم بر لیتر از عصاره مخمر و ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول بالاترین تراکم سلولی یا رشد اتفاق افتاده است؛ در این شرایط $OD_{600nm}=9/9$ می‌باشد. از طرف دیگر کمترین تراکم سلولی مربوط به کمترین غلظت در دو متغیر یعنی ۵ گرم بر لیتر می‌باشد.



شکل ۲: منحنی‌های رشد باکتری *E. coli* در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و گلیسرول مطابق با جدول یک

همچنین منحنی‌های برجسته ترسیم شده (شکل ۳) نشان می‌دهند که با افزایش غلظت عصاره مخمر و گلیسرول به ترتیب تا ۴۲/۵ گرم بر لیتر و ۲۲/۵ گرم بر لیتر تراکم سلولی افزایش می‌یابد و پس از آن با بالا رفتن غلظت دو متغیر تراکم سلولی کاهش می‌یابد.

Design-Expert®Software

OD600nm

● Design Points

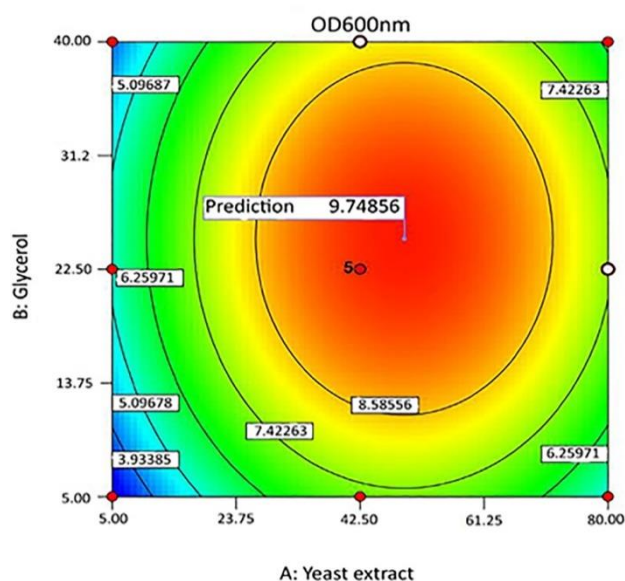
9.9

3

X1=A: Yeast extract

X2=B: Glycerol

(A):



Design-Expert®Software

OD600nm

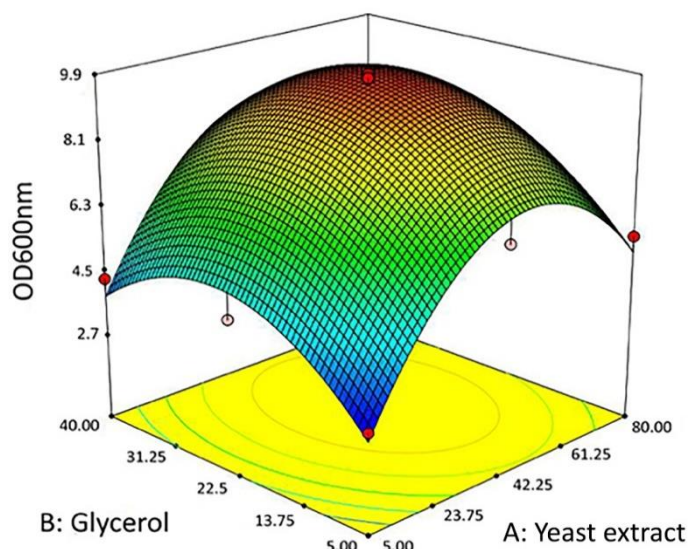
9.9

3

X1=A: Yeast extract

X2=B: Glycerol

(B):



شکل ۳: تأثیر هم‌زمان غلظت‌های مختلف گلیسرول و عصاره مخمر بر رشد سلولی باکتری *E. coli* A: نمایش دوبعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری (تراکم سلولی). B: نمایش سه‌بعدی تأثیر غلظت‌های عصاره مخمر و گلیسرول بر میزان چگالی نوری.

مقدار p -Value برای اصطلاح‌های غلظت عصاره مخمر (A)، غلظت گلیسرول (B) و توان دوم غلظت عصاره مخمر و گلیسرول (A^2) و (B^2) کمتر از ۰/۰۵ است که نشان‌دهنده اهمیت این اصطلاح‌ها در تولید بهینه تراکم سلولی می‌باشد (جدول ۲). همچنین مقدار $R^2=۰/۹۷۳۴$ (ضریب تشخیص^۱) برای معادله به‌دست‌آمده که عددی بزرگ‌تر از ۰/۸۰ می‌باشد، نشان‌دهنده همپوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار برای تولید بالاترین تراکم سلولی می‌باشد.

^۱ Coefficient of Determination

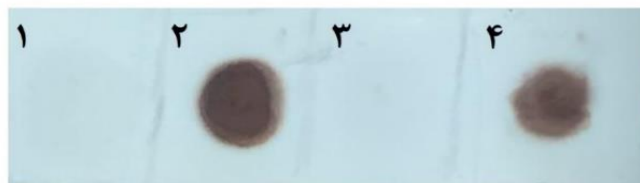
جدول ۲: تحلیل واریانس جهت ارزیابی مدل‌های پیشنهاد شده.

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی (df)	F-Value	P-Value (Probe>F)
A	۷/۹۳	۱	۳۲/۷۳	۰/۰۰۰۱
B	۱/۶۰	۱	۶/۶۱	۰/۰۳۳۱
A ^۲	۲۸/۹۴	۱	۱۱۳/۸۴	۰/۰۰۰۱
B ^۲	۱۰/۳۷	۱	۴۰/۷۷	۰/۰۰۰۴

بررسی بیان پروتئین اکتیوین A

به منظور بررسی تأثیر محیط کشت بهینه شده بر روی میزان بیان پروتئین اکتیوین A، سوبه باکتری BL21 (DE3) ترانسفورم شده با وکتور pET21a::Activin A در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۴۲/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۲/۵ گرم بر لیتر گلیسرول، ۳۰ میلی مولار نمک MgCl₂، ۰/۵ گرم بر لیتر نمک NaCl، ۰/۲ گرم بر لیتر نمک KCl کشت داده شد. از محیط SOB به عنوان محیط کنترل استفاده گردید. پس از اتمام مدت زمان بیان پروتئین و استخراج کل محتوای پروتئینی، میزان بیان در هر دو نمونه با کمک روش دات بلات و آنالیز با نرم افزار Image J (Liu *et al.*, 2012) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). همان طور که مشاهده می شود تولید پروتئین اکتیوین A در محیط کشت بهینه بیشتر از محیط کشت استاندارد SOB می باشد.

A:



B:

	محیط کشت SOB	محیط کشت بهینه
درصد تولید پروتئین اکتیوین A	۴۵/۱	۵۴/۹

شکل ۴: مقایسه میزان بیان در دو محیط کشت استاندارد و بهینه با کمک روش دات بلات و آنالیز آن با نرم افزار Image J. A: نتیجه آزمایش دات بلات با استفاده از آنتی بادی ضد His-tag. لکه‌های ۱ تا ۴ به ترتیب کنترل منفی (*E. coli* وحشی بدون وکتور رشد داده شده در محیط بهینه شده)، *E. coli* ترانسفورم شده با وکتور و رشد داده شده در محیط بهینه، کنترل منفی (*E. coli* وحشی بدون وکتور رشد داده شده در محیط SOB) و *E. coli* ترانسفورم شده با وکتور و رشد داده شده در محیط استاندارد SOB. B: جدول به دست آمده از آنالیز لکه‌های دات بلات با استفاده از نرم افزار Image J.

بحث و نتیجه گیری

امروزه استفاده از باکتری *E. coli* به منظور تولید پروتئین های دارویی نو ترکیب بسیار رواج پیدا کرده است. ترکیب محیط کشت، شرایط رشد، غلظت القاگر و شرایط القاء از عوامل تأثیرگذار بر بازده نهایی تولید پروتئین نو ترکیب می باشد. کشت باکتری *E. coli* در تراکم سلولی بالا با استفاده از محیط های کشت متفاوت، غلظت های مختلف القاگر، دما و زمان های پس از القای متفاوت برای تولید پروتئین های متنوعی گزارش شده است (Larentis *et al.*, 2011; Papanephytou *et al.*, 2013; Gholami *et al.*, 2017). شایان ذکر است که در مورد هر پروتئین، بهینه شرایط ذکر شده در بالا متفاوت می باشد و بهتر است که بهینه سازی عوامل تأثیرگذار بر میزان تولید برای هر پروتئینی انجام شود. به طور مثال در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ توسط حاجی حسن و همکاران انجام شد، بهترین غلظت القاگرهای لاکتوز و IPTG، بهترین زمان و دمای پس از القا برای دستیابی به بیشترین میزان تولید اکتیوین A به دست آمد (Hajihassan and Biroonro, 2018). در سال ۲۰۰۸، ولنته و همکاران علاوه بر بررسی تأثیر محیط های کشت متفاوت LB^۱، TB^۲، SB^۳ و TY^۴ بر روی میزان رشد باکتری *E. coli* و تولید پروتئین نو ترکیب، تأثیر غلظت نمک NaCl را نیز بر میزان تولید، مورد مطالعه قرار دادند (Volontè *et al.*, 2008). همچنین در مطالعه ای که توسط سواری و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، تأثیر گلیسرول و اتانول بر میزان تولید پروتئین نو ترکیب هورمون رشد در *E. coli* بررسی شد. این افراد نشان دادند که گلیسرول و اتانول می توانند در غلظت های ۰/۶ مولار و ۳ درصد به عنوان چارپون های مصنوعی عمل کرده و تولید پروتئین محلول را افزایش دهند (Savari *et al.*, 2015). به علاوه در گزارش ارائه شده توسط لین گلیسرول به عنوان یک منبع کربن مناسب ارائه شده است (Lin, 1976). لازم به ذکر است که در بعضی از مطالعات از محیط کشت های مرکب و ارزان قیمت به منظور رسیدن به تراکم سلولی بالا و تولید پروتئین نو ترکیب استفاده شده است (جابری انصاری و همکاران، ۱۳۹۴). گزارش های بسیاری نیز نشان می دهد که عصاره مخمر هم به عنوان منبع کربن و هم به عنوان یک منبع نیتروژن عمل کرده و علاوه بر تأثیر بر رشد باکتری ها، بازده بیان و تولید پروتئین را نیز افزایش می دهد (Lee *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 1997). Cao *et al.*, 2013). لذا در مطالعه حاضر گلیسرول و عصاره مخمر به عنوان منابع کربن و نیتروژن انتخاب شدند و بهترین غلظت آن ها برای رسیدن به تراکم سلولی بالا با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) به دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت گلیسرول و عصاره مخمر به ترتیب تا ۲۲/۵ گرم بر لیتر و ۴۲/۵ گرم بر لیتر رشد افزایش می یابد و پس از آن با افزایش غلظت، رشد کاهش می یابد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر دانشمندان نیز مطابقت دارد، زیرا این افراد به اثر مهاری منابع کربن و نیتروژن در غلظت های بالا اشاره کرده اند (Vuillemin *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012). به علاوه برای رسیدن به تراکم

¹ Luria-Bertani medium

² Terrific Broth

³ Super Broth

⁴ Tryptone Yeast Extract

سلولی بالا حضور یون منیزیم ضروری است، به طور مثال نیرهاوس در سال ۲۰۱۴ در مقاله خود به تأثیر یون منیزیم بر پروتئین سازی اشاره کرده است. شایان ذکر است که وی در مطالعه خود تنها به این نکته اشاره کرده که در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میلی‌مولار یون منیزیم، تولید پروتئین بسیار کند خواهد بود، اما مناسب‌ترین غلظت این یون برای دستیابی به بالاترین رشد و تولید را به دست نیاورده است (Nierhaus, 2014).

لذا با توجه به اهمیت این یون، در مطالعه حاضر بهترین غلظت یون $MgCl_2$ برای رسیدن به بالاترین تراکم سلولی و بالطبع آن بیشترین میزان تولید پروتئین، به دست آورده شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۳۰ میلی‌مولار از این نمک بهترین رشد باکتری *E. coli* را خواهیم داشت و افزایش غلظت بیشتر تأثیر مثبتی بر رشد نخواهد داشت. به علاوه نتایج حاصل از دات بلات و نرم‌افزار Image J در بررسی میزان بیان پروتئین اکتیوین A نشان داد که در محیط بهینه‌شده از نظر غلظت گلیسرول، عصاره مخمر و یون منیزیم تولید پروتئین نو ترکیب اکتیوین A در مقایسه با محیط استاندارد SOB افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تهران تحت شماره گرنت ۲۸۶۶۹/۰۶/۰۸ به دکتر زهرا حاجی حس انجام شده است. همچنین نویسنده‌گان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی با شماره طرح ۹۱۰۰۰۴۷۰ به منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Abdipranoto-Cowley, A., Park, J. S., Croucher, D., Daniel, J., Henshall, S., Galbraith, S. and Vissel, B. (2009) Activin A Is Essential for Neurogenesis Following Neurodegeneration. *Stem Cells*, 27: 1330–46.
- Antsiferova, M. and Werner, S. (2012) The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *Journal of Cell Science*, 125: 329–37.
- Azaman, S. N. A., Ramakrishnan, N. R., Tan, J. S., Rahim, R. A., Abdullah, M. P., and Ariff, A. B. (2010) Optimization of an induction strategy for improving interferon- $\alpha 2b$ production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 56: 141–150.
- Cao, J., Zhang, G., Mao, Z., Fang, Z., Yang, C., and Han, B. (2009) Influence of Mg^{2+} on the growth and activity of sulfate reducing bacteria. *Hydrometallurgy*, 95: 127–134.
- Cao, W., Li, H., Zhang, J., Li, D., Acheampong, D. O., Chen, Z., and Wang, M. (2013) Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study. *Protein Expression and Purification*, 90: 55–66.
- Chen, R. (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30: 1102–1107.

- Gholami Tilko, P., Hajihassan, Z., and Moghimi, H. (2017) Optimization of recombinant β -NGF expression in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47: 406–413.
- Hajihassan, Z. and Biroonro, N. (2018) Enhanced Expression of Recombinant Activin A in *Escherichia coli* by Optimization of Induction Parameters. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 29: 105 - 111.
- Hajihassan, Z., Hosseini, S. K. and Zomorodipour, A. (2016) Codon Optimization and Comparison of Recombinant Human Activin A Expression in BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3) Rosetta gami and BL21(DE3) Bacterial Hosts. *Modares Journal of Biotechnology*, 7: 50-60. (Persian)
- Hanlon, G. W., Hodges, N. A. and Russell, A. D. (1982) The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *Journal of General Microbiology*, 128: 845–851.
- Jaberi Ansari, F., Hajihassan, Z. and Jalili, H. (2015) Recombinant β -NGF production in *E.coli* using date syrup. *Modares Journal of Biotechnology*, 6: 60-70. (Persian)
- Larentis, A. L., Argondizzo, A. P. C., Esteves, G. dos S., Jessouron, E., Galler, R., and Medeiros, M. A. (2011) Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expression and Purification*, 78: 38–47.
- Lee, C., Sun, W.-J., Burgess, B. W., Junker, B. H., Reddy, J., Buckland, B. C., and Greasham, R. L. (1997) Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli* : effect of medium composition and induction timing on protein expression. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18: 260–266.
- Lin, E. C. C. (1976) Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 30: 535–578.
- Litwack, G. (2011) Activins and inhibins. Vol. 85, Academic Press, pp: 349. New york.
- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J. and Casaccia, P. (2012) Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nature Neuroscience*, 15: 1621–23.
- Lusk, J. E., Williams, R. J. P., and Kennedy, E. P. (1968) Magnesium and the Growth of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Biochemistry* 243: 2618-24.
- Nierhaus, K. H. (2014) Mg²⁺, K⁺, and the ribosome. *Journal of Bacteriology* 196: 3817–9.
- Papakonstantinou, T., Harris, S. J., Fredericks, D., Harrison, C., Wallace, E. M., and Hearn, M. T. W. (2009) Synthesis, purification and bioactivity of recombinant human activin A expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 64: 131–138.
- Papaneophytou, C. P. and Kontopidis, G. A. (2012) Optimization of TNF- α overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies. *Protein Expression and Purification*, 86: 35–44.
- Papaneophytou, C. P., Rinotas, V., Douni, E., and Kontopidis, G. (2013) A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in *Escherichia coli*: Purification and characterization of the protein. *Protein Expression and Purification*, 90: 9–19.
- Sambrook, J., Russell, D. W. and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp: 2100. LosAngeles

- Savari, M., Zarkesh Esfahani, S. H., Edalati, M., and Biria, D. (2015) Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method. *Protein Expression and Purification*, 114: 128–135.
- Shidaifat, F., Khamas, W., and Hailat, N. (2001) Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells. *Research in Veterinary Science*, 71: 23–25.
- Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S., and Lee, J. (1997) Enhanced Production of Human Mini-Proinsulin in Fed-Batch Cultures at High Cell Density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, 13: 249–57.
- Silva, A. W. B., Bezerra, F. T. G., Costa, J. J. N., Rossi, R. O. D. S., Passos, M. J., Vasconcelos, G. L. and Silva, J. R. V. (2014) Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*, 160: 199–207.
- Stewart, A., Milborrow, H., Ring, J., and Crowther, C. (1986) Human inhibin genes: genomic characterisation and sequencing. *FEBS Letters*, 206: 329-34.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Hitachi, K., Uezumi, A., Sunada, Y., Ageta, H., and Thomson, J. (2009) Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Communication and Signaling*, 7: 15-26.
- Volontè, F., Marinelli, F., Gastaldo, L., Sacchi, S., Pilone, M. S., Pollegioni, L., and Molla, G. (2008) Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 61: 131–137.
- Vuillemin, M., Malbert, Y., Laguerre, S., Remaud-Siméon, M., and Moulis, C. (2014) Optimizing the production of an α -(1→2) branching sucrose in *Escherichia coli* using statistical design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5173–84.
- Walker, G. M. (1994) The Roles of Magnesium in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14: 311–354.
- Xia, Y. and Schneyer, A. L. (2009) The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *The Journal of Endocrinology*, 202: 1–12.
- Yam, K., Yu, K., and Ge, W. (1999) Cloning and characterization of goldfish activin β A subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 154: 45-54.
- Yang, Y., Zhang, D., Liu, S., Jia, D., Du, G., and Chen, J. (2012) Expression and fermentation optimization of oxidized polyvinyl alcohol hydrolase in *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 99–104.

Increased expression of recombinant activin A using optimized cell culture medium

Z. Hajihassan^{1*}, N. Nazari²

Received:2017.09.06

Accepted:2019.01.02

Abstract

Nowadays recombinant activin A has been produced in different expression hosts because of its vast clinical applications. As obtaining the highest cell density is one way to increase the production, optimization of cell culture medium is necessary. So in this study, glycerol and yeast extract concentration as carbon and nitrogen sources of medium was optimized by using RSM (response surface methodology) in order to achieve the highest cell density of *E. coli* DE3 (21BL) strain transformed with pET21a:activin A vector. Furthermore, the effect of MgCl₂ on the growth of mentioned bacterium was studied. The results showed that the highest cell density (growth) was achieved in 42.5 g/L of yeast extract, 22.5 g/L of glycerol and 30 mM of MgCl₂. Also, dot blot results and data analysis with Image J in this study showed that the expression level of recombinant activin A in the optimized medium has been increased in comparison to standard cell culture medium.

Keywords: Activin A, Glycerol, Yeast extract, MgCl₂.

1-Assistant professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
* (Corresponding author: Hajihasan@ut.ac.ir)

2-M.Sc. student, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

تولید اسیدهای چرب با قابلیت سوخت زیستی توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا از گلوکز

فرشاد درویشی^{۱*}، ناهیده سلمانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۷

چکیده

چربی‌های میکروبی قابلیت استفاده در سوخت‌های زیستی، صنایع دارویی و غذایی دارند. تولید و کاربرد این چربی‌های میکروبی در مقایسه با روغن‌های گیاهی در حال افزایش است. هدف این تحقیق تولید چربی میکروبی توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا CBS6303 از گلوکز و بررسی نیم‌رخ اسیدهای چرب آن برای تعیین قابلیت سوخت زیستی بود. بیشترین مقدار تولید چربی و وزن خشک به ترتیب با مقدار ۱/۴۲ و ۷ گرم در لیتر پس از سه روز بدست آمد. چربی تولید شده توسط یاروویا لیپولیتیکا از گلوکز دارای اسیدهای چرب با قابلیت استفاده به عنوان سوخت زیستی می‌باشد که شامل اسید اولئیک (۳۴/۷۱ درصد)، اسید لینولئیک (۱۹/۴۵ درصد)، اسید پالمیتیک (۱۷/۰۵ درصد)، اسید استئاریک (۶/۱۲ درصد) و اسید میریستیک (۰/۸۲ درصد) بود.

واژه های کلیدی: چربی، روغن، میکروبی، نیم‌رخ.

مقدمه

صنعتی شدن دنیای کنونی، بحران انرژی و افزایش تقاضای انرژی موجب کاهش منابع سوخت‌های فسیلی مانند ذغال سنگ، نفت و گازهای طبیعی شده است. استفاده‌ی فراگیر از این سوخت‌ها مشکلاتی متعدد مانند کمبود منابع سوختی، آلودگی‌ها و مسائل زیست محیطی مانند اثرات گلخانه‌ای، سوراخ شدن لایه‌ی اوزون دارد. تجدیدنپذیر بودن و هزینه‌ی بالای از دیگر مشکلات استفاده از این سوخت‌ها می‌باشد. در همین راستا و در سال‌های اخیر، توجهات زیادی به سمت استفاده از سوخت‌های زیستی پاک به عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی، معطوف شده است (Christophe et al., 2012; Ghaly et al., 2010; Katre et al., 2012; Huang et al., 2010; Matsakas et al., 2015; Tchakouteu et al., 2015).

نسل اول سوخت زیستی شامل تولید آن از طریق ترانس‌استریفیکاسیون تری‌گلیسیریدها می‌باشد که در مقیاس صنعتی در حال تولید است. وابستگی این نسل سوخت زیستی به چربی‌های حیوانی، ضایعات روغن و دانه‌های روغنی مانند آفتابگردان،

۱- استاد میکروبیولوژی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

* (نویسنده مسئول: f.darvishi@maragheh.ac.ir)

۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

کلزا و سویا و بحران جهانی غذا موجب تحقیقات برای تولید نسل دوم سوخت‌های زیستی شده است که از مواد خام لیگنوسلولوزی و پساب‌های صنایع تولید می‌شوند. در سال‌های اخیر تحقیقات بر روی تولید بیودیزل از چربی میکروبی صورت گرفته است که از نظر اقتصادی بسیار کارآمدتر می‌باشد (Koutinas & Papanikolaou, 2011).

چربی‌ها یا لیپیدهای میکروبی، لیپیدهایی هستند که توسط میکروارگانیسم‌های روغنی تولید می‌شوند که به علت ترکیب اسید چرب مشابه با روغن‌های گیاهی، جایگزین‌هایی مناسب برای تولید سوخت زیستی می‌باشند (Christophe *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013; Papanikolaou *et al.*, 2012). میکروارگانیسم‌هایی که توانایی ذخیره‌ی لیپید بیشتر از ۲۰ درصد وزن خشک خود را دارا هستند، به عنوان میکروارگانیسم روغنی (Oleaginous microorganisms) شناخته می‌شوند که در شرایط کمبود نیتروژن مقدار آن می‌تواند به حدود ۷۰ درصد وزن زیست توده یا بیشتر نیز برسد. این میکروارگانیسم‌ها به دلیل چرخه‌ی کوتاه رشد، محتوی لیپید بالا و راحتی تغییرات با روش‌های بیوتکنولوژی بیشتر مورد توجه هستند (Huang *et al.*, 2013; Mattanna *et al.*, 2014; Tsigie *et al.*, 2011).

مخمرها میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی تک سلولی هستند که در تحقیق حاضر از مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) که قارچی دی‌مورف و نامتعارف است استفاده گردید که در ابتدا با نام *کاندیدا لیپولیتیکا* (*Candida lipolytica*) شناخته می‌شد ولی در سال ۱۹۸۰ وان در والت و آرکس (Van der walt & Von Arx)، به دلیل توانایی بالای این قارچ در تجزیه‌ی آن-پارافین‌ها و روغن‌ها اسم *یارروویا لیپولیتیکا* را برای این قارچ انتخاب کردند (Bankar *et al.*, 2009; Darvishi, 2012; Nicaud, 2014).

یارروویا لیپولیتیکا که توانایی ذخیره‌ی لیپید تا حدود ۴۰ درصد وزن خشک خود را دارد و میکروارگانیسمی مهم با کاربردهای بیوتکنولوژیکی فراوان است. پروتئین تک سلولی، اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، آنزیم‌ها (پروتازها، لیپازها، استرازها و فسفاتازها) و چربی میکروبی از فرآورده‌های اصلی دارای ارزش اقتصادی تولید شده توسط این مخمر است (Nicaud, 2014; Darvishi, 2012; Darvishi *et al.*, 2009; Darvishi *et al.*, 2011; Darvishi, 2012; Darvishi, 2014). اسید لینولئیک از جمله اسیدهای چرب ضروری ذخیره شده در *یارروویا لیپولیتیکا* که نقش مهمی در سلامتی دارد (Choque *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2014).

هدف این تحقیق تولید چربی میکروبی توسط مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* از گلوکز به عنوان منبع کربن و بررسی پروفایل اسید چرب و چربی تولید شده برای تعیین قابلیت مصرف آن به عنوان سوخت زیستی است.

مواد و روش‌ها

سویه‌ی مخمر

در این تحقیق از مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* سویه‌ی CBS6303 (Yarrowia lipolytica CBS6303) استفاده گردید که از کلکسیون CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)) هلند خریداری شده بود.

مواد شیمیایی

همه‌ی مواد استفاده شده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

تهیه‌ی مایه تلقیح

از محیط YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) برای تهیه‌ی کشت تازه و فعال‌سازی مخمر استفاده گردید. سویه‌ی مورد نظر پس از کشت، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۹ درجه‌ی سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس یک کلنی از مخمر فعال شده به ۲۰ میلی‌لیتر محیط پیش تولید که حاوی گلوکز ۱۵ گرم بر لیتر، پپتون ۱ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۱ گرم بر لیتر و سولفات منیزیم ۰/۵ گرم بر لیتر بود و در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شده بود منتقل گردید. ارلن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتیگراد و ۲۰۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد (Li-Xia *et al.*, 2009).

تهیه‌ی محیط تولید

۵۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه‌ی مخمر در محیط پیش تولید در شرایط استریل به محیط تولید که به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر، در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شده بود منتقل گردید و به مدت چهار روز در شرایط گرمخانه‌گذاری مشابه محیط پیش تولید گرمخانه‌گذاری شد. ترکیبات محیط تولید شامل گلوکز ۳۰ گرم در لیتر، پپتون ۱ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم در لیتر، سولفات منیزیم ۱/۵ گرم در لیتر، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۷ گرم در لیتر، فسفات دی‌هیدروژن سدیم ۲ گرم در لیتر بود که پس از حل کردن در آب مقطر استریل شد (Pan *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری وزن خشک زیست توده

برای اندازه‌گیری وزن خشک زیست توده‌ی تولیدی، یک میلی‌لیتر از محیط کشت به ویال از قبل وزن شده منتقل با چرخش ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده بعد از دو بار شستشو با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت در آون با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد که در این مدت توده‌ی مخمری

کاملاً خشک و بدون آب گردید. بعد از ۲۴ ساعت و بال‌ها مجدداً وزن شدند که اختلاف وزن حاصل نشان‌دهنده‌ی مقدار زیست توده بر حسب گرم در لیتر بود (Chi *et al.*, 2007).

سنجش میزان تولید چربی میکروبی

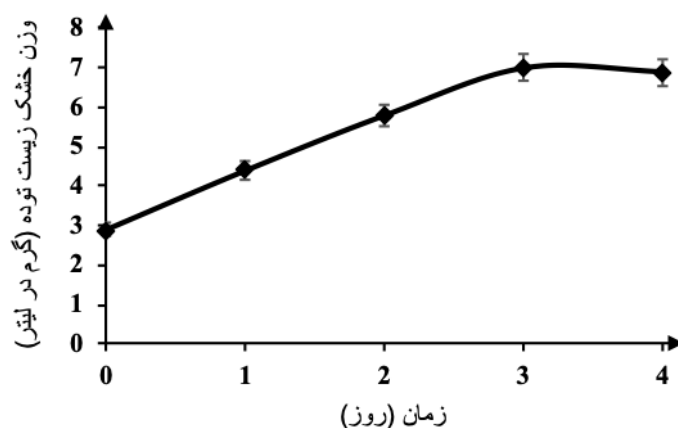
برای سنجش میزان چربی تولیدی روش اصلاح شده بلیق و دایر (Bligh & dyer) به کار رفت (Nambou *et al.*, 2014). ابتدا برای به دست آوردن رسوب مخمری، مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت در شرایط استریل به فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل شده و در سانتریفیوژ یخچال‌دار ۴۰۰۰ دور در دقیقه و با دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. هفت میلی‌لیتر از محلولی شامل اسید کلریدریک و آب (۶۰:۸۰) به رسوب حاصل اضافه و جوشانده شد و بعد از جوشیدن، بلافاصله ارلن درون آب یخ قرار گرفت و سپس ۳۰ میلی لیتر محلول مخلوط کلروفرم-متانول با نسبت ۲:۳ اضافه و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. با گذشت یک ساعت دو فاز، فاز بالایی آبی و فاز زیرین آلی تشکیل می‌شود که محلول زیرین جدا شده و در آون ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد تا خشک شده و به وزن ثابت برسد. اختلاف وزن قبل و بعد از خشک شدن محلول، میزان لیپید تولیدی را نشان می‌دهد (Nambou *et al.*, 2014).

تعیین نیم‌رخ اسید چرب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی

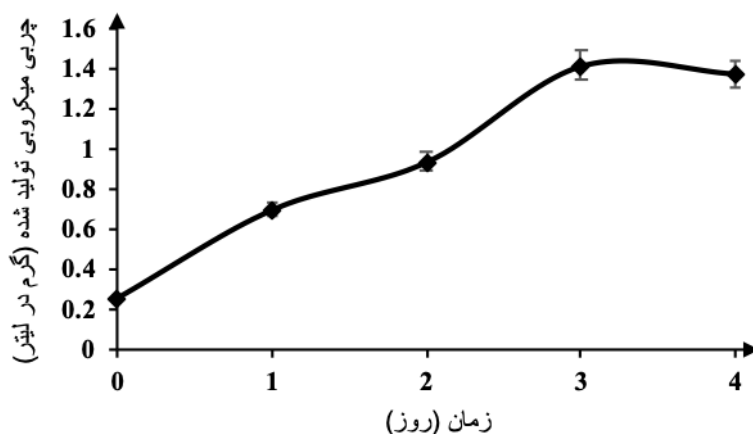
برای تعیین پروفایل اسیدهای چرب سازنده‌ی چربی میکروبی حاصل روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا چربی میکروبی در بنزن و متانولیک کلرید هیدروژن پنج درصد حل گردید و به مدت دو ساعت رفلکس شد. سپس محلول کلرید سدیم پنج درصد به محلول اضافه گردید و متیل استرهای اسیدهای چرب با هگزان استخراج شد. لایه‌ی حاوی هگزان با محلول پتاسیم بی‌کربنات پنج درصد شسته شد و توسط سولفات سدیم بی‌آب، آگیری آن انجام شد (Ranga *et al.*, 2007). یک میکرولیتر از متیل استر اسید چرب تهیه شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی مدل 7890B ساخت شرکت Agilent آمریکا، با ستون EZ-Guard TM: Capillary colum VF-5ms, (30m × 0.25mm × 0.50) با ستون (μm +10m) و برنامه‌ی دمایی ۱۳۰ تا ۱۸۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۳ °C/min تزریق شد و طیف‌های بدست آمده جهت بررسی اسیدهای چرب موجود، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از وزن خشک و تولید چربی میکروبی در مخمر *Yarrowia* (CBS6303) *lipolytica* CBS6303 در محیط حاوی گلوکز به ترتیب در شکل‌های (۱) و (۲) نشان داده شده است.

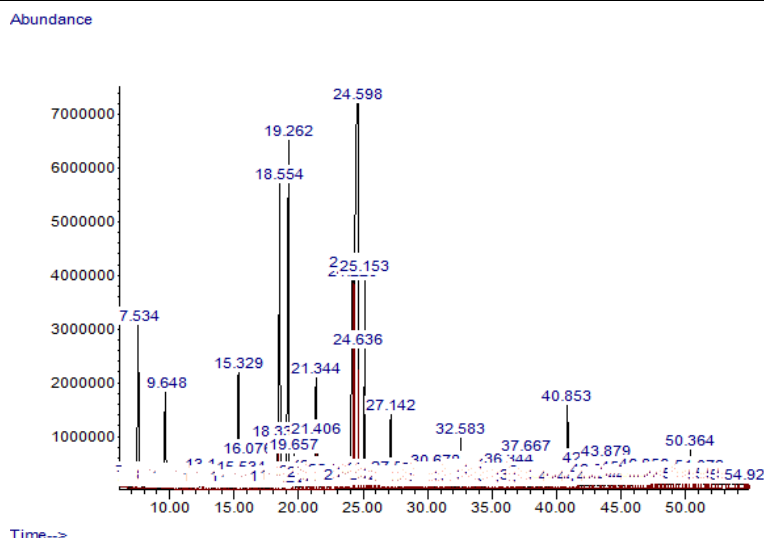


شکل ۱: نمودار وزن خشک زیست توده‌ی مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* سویه CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303) بعد از خشک شدن در آون با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در محیط تولید چربی میکروبی حاوی گلوکز در چهار روز



شکل ۲: نمودار تولید چربی میکروبی توسط *یارروویا لیپولیتیکا* سویه CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303) در محیط تولید حاوی گلوکز طی چهار روز

در روز سوم بعد از تلقیح بیشترین تولید چربی میکروبی با میزان ۱/۴۲ گرم در لیتر بدست آمد و وزن خشک زیست توده‌ی حاصل در همان روز برابر با ۷ گرم بود. بعد از به دست آوردن میزان تولید و نقطه‌ی اوج تولید چربی میکروبی در مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن، چربی تولید شده جهت بررسی اسیدهای چرب موجود با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی متیله شد که دیاگرام آن در شکل (۳) و نتایج حاصل در جدول (۱) نشان داده شده است.

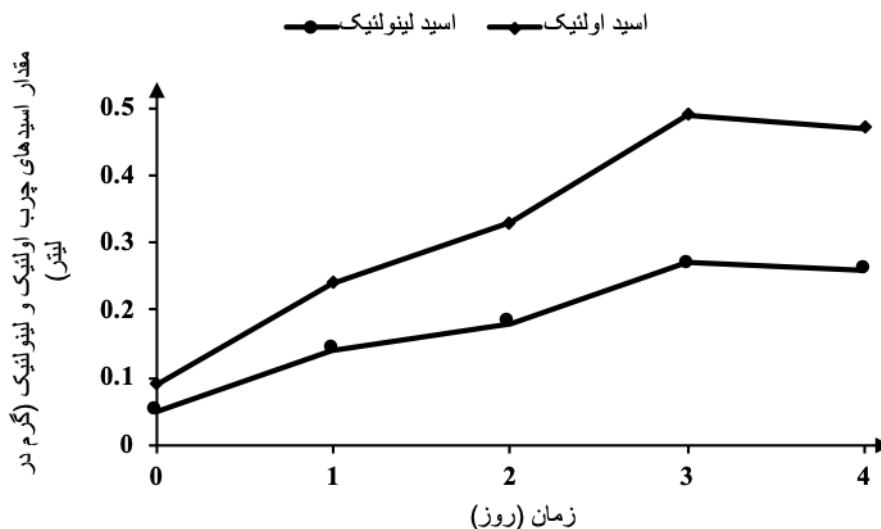


شکل ۳: دیاگرام نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی چربی میکروبی تولید شده توسط یاروویا لیپولیتیکا سویه CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303)

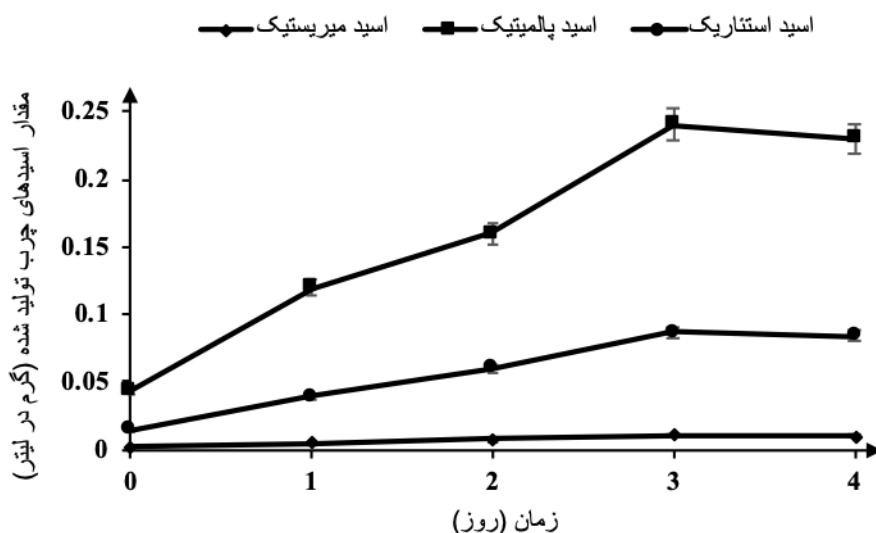
جدول ۱: اسیدهای چرب تولید شده توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303) در محیط کشت حاوی گلوکز

شماره	نام علمی اسید چرب	نام عمومی اسید چرب	تعداد کربن	زمان بازداری (دقیقه)	درصد
۱	Tetradecanoic acid	اسید میریستیک	۱۴:۰	۱۳/۱۰	۰/۸۲
۲	Pentadecanoic acid	اسید پنتادکانوئیک	۱۵:۰	۱۶/۵۹	۰/۸
۳	Hexadecanoic acid	اسید پالمیتیک	۱۶:۰	۱۸/۳۳	۱۷/۰۵
۴	9-Hexadecanoic acid	اسید پالمیتولئیک	۱۶:۱	۱۸/۵۳	۱۲/۶۴
۵	Heptadecanoic acid	اسید مارگاریک	۱۷:۰	۲۰/۲۸	۰/۴۲
۶	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک	۱۸:۲	۲۴/۱۴	۱۹/۴۵
۷	9-Octadecenoic acid	اسید اولئیک	۱۸:۱	۲۴/۵۸	۳۴/۷۱
۸	Octadecanoic acid	اسید استئاریک	۱۸:۰	۲۵/۱۵	۶/۱۲
۹	Eicosanoic acid	اسید آراشیدیک	۲۰:۰	۳۰/۵۷	۰/۴۵
۱۰	Docosanoic acid	اسید بهنیک	۲۲:۰	۳۵/۰۹	۰/۵۹
۱۱	Tetracosanoic acid	اسید لیگنوسریک	۲۴:۰	۴۰/۵۶	۲/۰۵
۱۲	Hexacosanoic acid	اسید سروئیک	۲۶:۰	۴۵/۴۰	۰/۴۷
۱۳	Nonahexacontanoic acid	اسید نوناهاگزاکونتانوئیک	۶۹:۰	۵۱/۰۷	۴/۴۲
درصد کل اسیدهای چرب با قابلیت سوخت زیستی					۷۸/۱۵ درصد
مقدار کل اسیدهای چرب با قابلیت سوخت زیستی بر حسب گرم					۱/۱۱ گرم در لیتر

تجزیه و تحلیل داده‌های گاز کروماتوگرافی جرمی نشان دهنده‌ی تولید اسیدهای چرب با قابلیت استفاده در سوخت زیستی است که مقدار آن ۷۸/۱۵ درصد از کل اسید چرب تولید شده است که مقدار قابل توجهی بوده و برابر ۱/۱۱ گرم در لیتر از کل اسید چرب تولید شده است. مقدار این اسیدهای چرب در شکل‌های (۴) و (۵) نشان داده شده است که بیشترین آن اسید اولئیک با مقدار ۰/۴۹ گرم در لیتر با احتساب کل اسیدهای چرب تولید شده است.



شکل ۴: نمودار تولید اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک توسط *یارروویا لیپولیتیکا* CBS6303 (*Yarrowia lipolytica*) (CBS6303)



شکل ۵: نمودار اسیدهای چرب پالمیتیک، اسید استئاریک و اسید میریستیک توسط *یارروویا لیپولیتیکا* CBS6303 (*Yarrowia lipolytica*) (CBS6303)

بحث و نتیجه گیری

مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* سویه CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303) توانایی تولید چربی میکروبی در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن دارا می باشد که بالاترین تولید آن با میزان ۱/۴۲ گرم در لیتر و محتوی لیپیدی ۲۰/۲۸ درصد در روز سوم پس از کشت، به دست آمد. این مخمر به دلیل توانایی در تجمع مقادیر بالایی از چربی به عنوان مخمر روغنی شناخته می شود (Beopoulos *et al.*, 2009).

کاتر (Katre) و همکارانش پنج سویه از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* را مطالعه و مشاهده نمودند که هر پنج سویه‌ی مورد استفاده در آزمایش دارای توانایی تولید چربی میکروبی به میزان بیشتر از ۲۰ درصد وزن خشک سلولی می‌باشند (Katre *et al.*, 2012). راکیکا (Rakicka) و همکارانش با مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه‌ی JMY4086 با استفاده از ملاس و گلیسرول خام که از محصولات جانبی صنایع می‌باشند و تحت شرایط کشت مختلف، چربی میکروبی تولید نمودند که مقدار آن تا ۳۱ درصد وزن خشک نیز رسید (Rakicka *et al.*, 2015). پاپانیکولاو (Papanikolaou) و همکارانش با کشت سویه‌ی مخمر بر روی چربی صنعتی شامل اسیدهای چرب اشباع مشاهده نمودند که تجمع چربی تحت تاثیر pH و دمای محیط بوده و مقدار زیست توده به ۹-۱۲ گرم در لیتر و مقدار چربی میکروبی حاصل به ۰/۴۴-۰/۵۴ گرم در هر گرم از زیست توده رسید (Papanikolaou *et al.*, 2002).

اسیدهای چرب اشباع فاقد پیوند دوگانه بوده و اسیدهای چرب غیراشباع دارای پیوند دوگانه در ساختارشان می‌باشند که بر اساس تعداد این پیوندها در ساختارشان به اسیدهای چرب غیراشباع منفرد و اسیدهای چرب پلی غیراشباع تقسیم‌بندی می‌شوند (Sales-Campos *et al.*, 2013). اسیدهای چرب غیراشباع به دلیل حضور در ساختار و عملکرد غشاهای سلولی، نقش اساسی در فرآیندهای زیستی دارند (Choque *et al.*, 2014).

اسیدهای چرب اشباع نیز به دلیل پایداری برای کاربرد در سوخت‌های زیستی مناسب می‌باشند. اگر چه لازم به ذکر است که از اسیدهای چرب غیراشباع نیز می‌توان به عنوان سوخت زیستی استفاده کرد و مهم‌ترین اسیدهای چرب تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های مولد چربی شامل اسید میریستیک، اسید پالمیتیک، اسید استئاریک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک می‌باشد که اجزای اصلی سوخت زیستی هستند که این اسیدهای چرب با کاتالیز توسط لیپاز یا کاتالیز شیمیایی می‌توانند به عنوان سوخت زیستی مصرف شوند (Katre *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008).

همانطور که جدول (۱) نشان می‌دهد میزان کل اسیدهای چرب اشباع ۳۳/۱۹ درصد است که اسید چرب اشباع اسید پالمیتیک دارای بیشترین مقدار است و درصد کل اسیدهای چرب غیراشباع تولید شده ۶۶/۸ درصد بوده که اسید اولئیک با ۳۴/۷۱ درصد بیشترین مقدار را دارد. شایان ذکر است که پروفایل اسید چرب بر حسب شرایط محیط کشت مانند اکسیژن، pH و دما می‌تواند متغیر باشد (Mattanna *et al.*, 2014).

اسید اولئیک در بین اسیدهای چرب تولید شده، علاوه بر قابلیت استفاده به عنوان سوخت زیستی جزء اسیدهای چرب امگا نه C18:1 است و در غشای سلولی دارای نقش ساختاری می‌باشد. همچنین این اسید چرب در بیماری‌های سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی، خودایمنی و التهابی و فشار خون بالا دارای نقش می‌باشد و مشتقات آن با داشتن نقش تنظیمی بر روی غشای سلولی، به عنوان داروی ضد سرطان که باعث القای آپوپتوز و تفرق سلولی می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Choque *et al.*, 2014; Funari *et al.*, 2003; Sales-Campos *et al.*, 2013).

بر اساس جدول (۱)، اسید پالمیتیک C16:0 با ۱۷/۰۵ درصد همراه با اسید چرب ۱۸ کربنه‌ی اسید استئاریک با ۶/۱۲ درصد به‌دست آمد که برای مصرف در سوخت‌های زیستی به‌خوبی مطالعه شدند (Papanikolaou *et al.*, 2004). اسید لینولئیک از فراوان‌ترین اسیدهای چرب غیر اشباع است که در سوخت زیستی و در رژیم غذایی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این اسید چرب از اسیدهای چرب امگا شش بوده و به مقدار ۱۹/۴۵ درصد در این تحقیق به‌دست آمد. همچنین این اسید چرب دارای نقش فعال در رشد و سلامت عمومی بدن انسان است (Choque *et al.*, 2014).

بر اساس تجزیه و تحلیل اسیدهای چرب تولید شده، اسیدهای چربی با کاربرد در مصارف سوخت زیستی توسط مخمر *یارروویا لیپولیتیکا* سویه CBS6303 (*Yarrowia lipolytica* CBS6303) در محیط حاوی گلوکز تولید شدند. بر اساس نیاز و کاربرد می‌توان با روش‌های بهینه سازی محیط کشت و شرایط تخمیر و همچنین با روش‌های پیشرفته مهندسی متابولیت مسیرهای متابولیکی را تغییر داد تا بتوان محصول مورد نظر را با مقادیر بیشتر در این مخمر تولید نمود.

سپاسگزاری

از ستاد توسعه زیست فناوری و معاونت آموزشی - پژوهشی دانشگاه مراغه به خاطر حمایت‌های مادی و معنوی

سپاسگزاریم.

منابع

- Bankar, A.V., Kumar, A.R. and Zinjarde S.S. (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 847-865.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.L., Molina-Jouve, C. and Nicaud, J.M. (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48: 375-387.
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C. and Chen, S. (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, 42:1537-1545.
- Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A., Ricardo soccol, C. and Larroche, C. (2012) Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55: 29-46.
- Choque, B., Catheline, D., Rioux, V. and Legrand, P. (2014) Linoleic acid: Between doubts and certainties. *Biochimie*, 96:14-21.
- Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2009) Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009: 1-7.
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. and Zarkesh-Esfahani, H. (2011) High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *New Biotechnology*, 28: 756-760.
- Darvishi, F. (2012) Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 5: 634-641.

- Darvishi, F. (2014) *Yarrowia lipolytica* in biotechnological applications. Heidelberg, Springer.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I. and Madani, M. (2012) Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *Journal of Cell Molecular Research*, 4: 68-75.
- Funari, S.S., Barceló, F. and Escribá, P.V. (2003) Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *Journal of Lipid Research*, 44: 567-575.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Brooks, M.S. and Budge, S. (2010) Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6: 54-76.
- Gonçalves, F.A.G., Colen, C. and Takahashi, J.A. (2014) *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-14.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. and Chen, G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87: 38-46.
- Huang, C., Chen, X.f., Xiong, L., Chen, X.d., Ma, L. and Chen, Y. (2013) Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, 31: 129-139.
- Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S. and RaviKumar, A. (2012) Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2: 1-14.
- Koutinas, A.A. and Papanikolaou, S. (2011) Biodiesel production from microbial oil. Pages 177-198 in: Campelo J and Clark J, ed. *Handbook of Biofuels Production*. Cambridge, Woodhead Publishing.
- Li, Q., Du, W. and Liu, D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 749-756.
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E.A., Rova, U. and Christakopoulos, P. (2015) High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 8: 1-6.
- Mattanna, P., da Rosa, P.D., Poli, J., Richards, N.S.P.S., Daboit, T.C. and Scroferneker, M.L. (2014) Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociencias*, 12: 121-126.
- Nambou, K., Zhao, C., Wei, L., Chen, J., Imanaka, T. and Hua, Q. (2014) Designing of a “cheap to run” fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, 173: 324-333.
- Nicaud, J.M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29: 409-418.
- Pan, L.X., Yang, D.F., Shao, L., Li, W., Chen, G.G. and Liang, Z.Q. (2009) Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*, 47: 215-220.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. (2002) Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 308-312.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 95:287-291.

-
- Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P. and Nicaud, J.M. (2015) Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 8: 1-10.
- Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. and Ravishankar, G.A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98: 560-564.
- Sales-Campos, H., de Souza, P.R., Peghini, B.C., da Silva, J.S. and Cardoso, C.R. . (2013) An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 13: 201-210.
- Tchakouteu, S.S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. (2015) Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 118: 911-927.
- Tsigie, Y.A., Wang, C.Y., Truong, C.T. and Ju, Y.H. (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 102:9216-9222.

The production of fatty acids with biofuel potential by *Yarrowia lipolytica* from glucose

F. Darvishi ^{1*}, N. Salmani ²

Received: 2018.02.14

Accepted: 2019.01.27

Abstract

Microbial lipids have a capacity to use in biofuels, pharmaceutical and nutrition industries. The production and application of these lipids are increasing in compare with vegetable oils. The production of microbial lipid by *Yarrowia lipolytica* CBS6303 from glucose and investigation of its fatty acids profile to determine its biofuel potential were the aims of this study. Maximum lipid production and dry weight were obtained 1.42 and 7 g/L after three days, respectively. The produced lipid by *Y. lipolytica* from glucose contains fatty acids that can be used as biofuel like oleic acid (34.71%), linoleic acid (19.45%), palmitic acid (17.05%), stearic acid (6.12%) and myristic acid (0.82%).

Keywords: Fat, oil, Microbial, Profile.

1-Professor of Microbiology, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

* (Corresponding author: f.darvishi@maragheh.ac.ir)

2- MSc of Microbial Biotechnology, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

بررسی تمایل اتصال داروی ضد سرطان وینکریستین به پروتئین های هیستونی

کروماتین با استفاده از روشهای اسپکتروسکوپی

آزاده محمدقلی^۱، عذرا ربانی چادگانی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۵

چکیده

وینکریستین داروی ضد سرطانی از خانواده وینکالکالوئید ها است که در درمان بسیاری از سرطان ها کاربرد دارد. کروماتین از واحد های نوکلئوزومی که ترکیبی از DNA و پروتئین های هیستونی است تشکیل یافته است. مطالعات قبلی نشان داده است که وینکریستین تمایل اتصال قوی به ترکیب نوکلئوپروتئینی کروماتین دارد تا DNA که نقش پروتئین های هیستونی را در این فرآیند روشن میسازد. لذا در این تحقیق تاثیر داروی وینکریستین بر پروتئین های هیستونی کروماتین در محلول با استفاده از روشهای مختلف اسپکتروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اتصال دارو به کروماتین موجب خاموشی کروموفور های مربوط به آمینواسیدهای حلقوی هیستون ها میشود. اتصال دارو به هیستون های H1 بسیار قویتر از اتصال آن به هیستون های Core بوده بطوریکه ثابت اشترن ولمر و EC₅₀ نیز آنرا تأیید مینماید طیف هیستون H1 دارای یک پیک منفی در طول موج ۱۹۸ نانومتر بوده که مربوط به پیچه های نامنظم در ساختار پروتئین است. طیف هیستون Core دارای یک پیک منفی در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر می باشد که مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار پروتئین ها است که با افزایش غلظت دارو به شدت پیک منفی در هیستون H1 و Core اضافه می شود. همچنین کاهش جذب در طول موج ۲۱۰ نانومتر در هیستون H1 به صورت الگوی وابسته به غلظت می باشد. نتایج حاکی از اتصال قوی تر داروی وینکریستین به هیستون H1 نسبت به Core است که میتواند بدلیل اینکه در بخش رابط قرار دارد بیشتر در دسترس باشد.

واژه های کلیدی: کروماتین، هیستون H1، هیستونهای Core، وینکریستین، اسپکتروسکوپی

مقدمه

خانواده دارویی وینکالکالوئید دارای ترکیبات ضد توموری قوی هستند که از منابع طبیعی گرفته می شوند. در قرن هفدهم وینبلاستین و وینکریستین دو داروی طبیعی این خانواده از برگهای گیاه periwinkle از خانواده پرپوش (*Cathartus roseus*)

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: عذرا ربانی چادگانی (arabbani@ut.ac.ir)

استخراج و مشخص شد دارای خواص ضد توموری و ضد میکروبی هستند (Sen and Maiti 1994; Chen et al, 2005).

ساختار شیمیایی گروه دارویی وینکا آلکالوئید دارای دو ساختار چند حلقه ای ویندولین و کاتارانتین می باشد. وینکا آلکالوئیدها ترکیباتی ضد سرطانی هستند که سبب بر هم خوردن میکروتوبولهای دوک میتوزی می شوند (Dumontet and Jutras et al, 2018; Jordan, 2010; Shati and Elsaid, 2018). در سال ۲۰۰۳ گروه Tang و همکاران با کمک بررسی میکروسکوپی بر روی سلول دیپلوئیدی هپاتوسیت موشی نشان دادند که اتصال وینکریستین به DNA سلولی موجب جا به جایی باز های DNA می شود (Tang et al, 2003). بسیاری از داروهای ضد سرطان دارای حلقه اندولی هستند که از طریق اتصال با شیار کوچک و یا وارد شدن بین جفت بازهای DNA عمل می کنند (Kumar et al, 2012). وینکریستین و وینبلاستین از طریق میانکنش با DNA دو رشته ای عملکرد خود را انجام می دهند (Gupta et al, 2011). هنگامی که DNA پلاسمید pBSK همراه با وینکریستین بر روی ژل آگارز قرار گرفت مشاهده شد که با افزایش غلظت وینکریستین میزان اتصال نیز افزایش مییابد. بدین ترتیب این یافته ها نشان می دهند که آلکالوئیدها اتصال خود به DNA را از طریق قرار گیری بین جفت بازها انجام می دهند (Kumar et al, 2012). میانکنش داروی وینکریستین با پلاسمید pET28 سبب تبدیل فرم خطی دارو به فرم لوپ مانند شده به طوریکه با افزایش غلظت دارو DNA به قطعات کوچکی تبدیل می شود (Zhu et al, 2004). اتصال DNA با وینکریستین توسط اسپکتروسکوپی infrared نیز بررسی شده و نشان می دهد که میانکنش بین DNA و وینکریستین از طریق جفت بازهای گوانین و سیتوزین انجام می شود. همچنین اتصال بین وینکریستین با فسفات اسکلت DNA نیز مشاهده شده است. مطالعات اسپکترسکوپی UV/Vis نشان داده است که اتصال DNA با وینکریستین سبب جابه جایی های کرومیک شده که نشان دهنده اینتر کاله شدن وینکریستین به داخل DNA دو رشته ای است (Tyagi et al, 2010).

کروماتین یک ترکیب نوکلئوپروتئینی متشکل از DNA و پروتئین های بسیار قلیایی به نام هیستون (Histone) است که شامل پنج نوع اصلی H1، H2A، H2B، H3، H4 می باشند. کروماتین از واحدهای تکرار شونده نوکلئوزومی ساخته شده است. هر نوکلئوزوم شامل اکتامر هیستونی، DNA و هیستون رابط همراه با H1 می باشد (Ordu et al, 2016; Cutter and Hayes, 2017). اکتامر هیستونی شامل دو دایمر H2B-H2A و یک تترامر H3-H4 و DNA که ۱/۷ دور حول اکتامر پیچ می خورد. هیستون H1 که به DNA رابط اتصال دارد سبب فشرده شدن نوکلئوزوم ها و ایجاد ساختارهای بالاتر کروماتین میگردد (Kowalski 2016; Rapkin et al, 2012; Bradbury et al, 2004). هیستونهای ناحیه اکتامری به هیستونهای Core معروفند. این هیستونها وزن مولکولی بین ۱۱ الی ۱۶ کیلو دالتون داشته، بسیار قلیایی بوده بطوریکه حاوی بیش از ۲۰ درصد از آمینواسیدهای لیزین و آرژنین هستند (Luger et al, 2012). از انجایی که در سلول ساختار کروماتین اساسا از DNA و پروتئین های هیستونی ساخته شده است بنابراین کروماتین موجود در هسته می تواند به عنوان جایگاه هدف برای اتصال این دارو باشد. در مطالعات قبلی ما نشان داده شده که وینکریستین نه تنها با DNA بلکه با ترکیب نوکلئوپروتئینی کروماتین تمایل اتصال دارد و حتی

اتصال به کروماتین بسیار قوی تر از اتصال به DNA است (Mohammadgholi et al, 2013). اتصال قویتر دارو به کروماتین میتواند ناشی از درگیر شدن دارو با پروتئین های هیستونی باشد. لذا در این تحقیق تمایل اتصال این دارو به پروتئین های هیستونی کروماتین H1 و Core، مورد بررسی قرار گرفته است تا بتوان اطلاعات بهتری در خصوص مکانیسم عمل این دارو در سلول بدست آورد که میتواند در طراحی داروهای ضد سرطان مفید باشد.

مواد و روش ها

داروی وینکریستین سولفات از هلال احمر ایران خریداری و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شد. دارو قبل از استفاده در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ رقیق گردید. پروتئین های هیستونی H1 و Core از بافت تیموس گوساله مطابق روش Johns (1964) استخراج و تخلیص شده و خلوص آنها با استفاده از ژل SDS و وسترن بلات در مقابل آنتی بادی های ضد H1 و Core تعیین گردید. پروتئین های خالص شده در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ و محلول ذخیره یک میلی گرم در میلی لیتر از آنها تهیه شد.

تهیه کروماتین محلول

برای تهیه کروماتین محلول، هسته ها با روش برگن و همکارانش از کبد موش های صحرایی نر نژاد ویستار (vistar) تهیه شدند (Burgoyne et al, 1970). هسته های خالص شده در مقدار مناسبی از بافر هضم به صورت سوسپانسیون در آورده شد و مقدار DNA با استفاده از میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. پس از تعیین غلظت، با استفاده از بافر هضم شامل ۰/۱ مولار کلرید پتاسیم، ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ و ۱ میلی مولار کلرید کلسیم، محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه تهیه و محلول حاصل به مدت ۵-۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به ازای هر میلی گرم از DNA، ۴ واحد آنزیم میکروکوکال نوکلئاز (Sigma) به نمونه اضافه گردید و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از تمام زمان نمونه ها فوراً نمونه به روی یخ منتقل و با استفاده از محلول ۱۰۰ میلی مولار EDTA، محلول ۱۰ میلی مولار EDTA از نمونه تهیه گردید. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب در مقدار مشخصی از محلول ۰/۲۵ میلی مولار EDTA به صورت سوسپانسیون در آورده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد مخلوط شد و سپس به مدت ۵-۴ دقیقه در ۱۰۰۰۰ در همین دما سانتریفوژ گردید. در نهایت محلول رویی حاصل یا همان کروماتین محلول به یک ظرف استریل منتقل و برای انجام آزمایش های مختلف ذخیره گردید (Rabbani et al, 1999).

اسپکتروسکوپی UV-Vis

پروتئین های هیستونی H1 و مرکزی بطور جداگانه با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه (ابتدا زمان های مختلف بکار برده شد و مشخص گردید ۶۰ دقیقه کافی است) و سپس مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis انجام شد. میزان جذب حاصل از میانگینش داروی وینکریستین و هیستونها در طول موج ۲۱۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-210, Shimadzu (Japan) ثبت شد. همچنین میزان جذب نمونه های استاندارد دارو در طول موج ذکر شده نیز ثبت و از نمونه های تیمار شده با دارو کسر گردید.

اسپکتروسکوپی فلورسانس

محلول کروماتین در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl تهیه و میانگینش آن با داروی وینکریستین در دمای اتاق و به دور از نور انجام گرفت. به منظور مطالعات فلورسانس غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از کروماتین استفاده شد. محلول حاصل از میانگینش کروماتین با داروی وینکریستین در طول موج ۲۷۸ نانومتر که مربوط به آمینو اسید های حلقوی پروتئین است، تهییج و طیف نشر فلورسانس آنها در محدوده ۳۵۰-۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه فلورسانس (Cary Eclipse, Varian, Australia) رسم شد. همچنین طیف نشر فلورسانس نمونه های استاندارد دارو در محدوده ذکر شده نیز رسم گردید و از نمونه کروماتین با دارو کسر گردید.

پروتئین های هیستونی (H1 و مرکزی بطور جداگانه) با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. نمونه های تیمار شده با دارو و کنترل در طول موج ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف نشر فلورسانس آنها در محدوده ۳۵۰-۲۹۰ نانومتر رسم شد. در طول انجام آزمایشات از کوت کوارتز با عرض یک سانتی متر استفاده شد. شدت نشر فلورسانس نمونه های دارو از کمپلکس پروتئین های هیستونی و دارو کسر شد. پس از انجام محاسبات و کسراتر خاموشی احتمالی دارو، منحنی های $I_0/I \times 100$ بر علیه غلظت های مختلف دارو رسم گردید بطوریکه I_0 و I به ترتیب شدت نشر فلورسانس پروتئین ها در غیاب و حضور غلظت مورد نظر دارو است. همچنین نمودار استرن-ولمر که نشان دهنده اثر خاموش کنندگی فلورسانس وینکریستین است نیز رسم شد. معادله استرن-ولمر به صورت $I_0/I = 1 + K_{sq}[Q]$ نمایش داده می شود که در آن I_0 و I به ترتیب شدت فلورسانس در غیاب و حضور غلظت مورد نظر دارو، K_{sq} ثابت خاموش کنندگی فلورسانس و $[Q]$ غلظت دارو به عنوان خاموش کننده می باشد (Gentili et al, 2008).

اسپکتروسکوپی CD

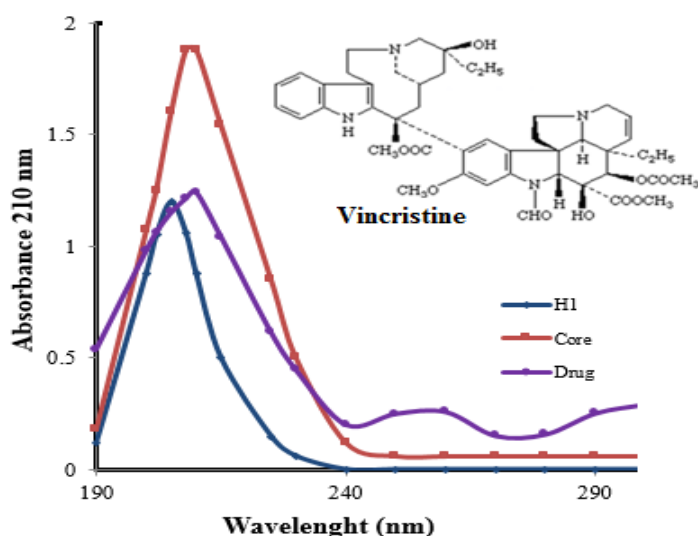
پروتئین های هیستونی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار

Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. محلول حاصل از میانکنش برای مطالعه تغییرات ساختارهای دوم استفاده گردید. مطالعه CD در ناحیه ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر (Far-UV) با استفاده از کورت کوارتز با عرض یک سانتی متر و تحت جریان مداوم گاز ازت و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با کمک دستگاه CD (AVIV 215, USA) انجام شد. طیف نمونه ها از طیف نمونه های استاندارد دارو که در شرایط یکسان رسم گردید کسر و داده ها تحت عنوان θ (molar ellipticity) گزارش شد.

نتایج

جهت بررسی های اسپکتروسکوپی ابتدا لازم بود طیف جذبی پروتئین های H1 و مرکزی و همچنین دارو رسم شود. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود این پروتئین ها دارای یک قله جذبی در محدوده طول موجهای ۱۹۰-۲۳۰ نانومتر می باشند. داروی وینکریستین نیز دارای یک قله جذبی بلند در ۲۱۰ نانومتر و یک قله جذبی کوتاه در ناحیه ۲۹۵ و ۲۶۰ نانومتر می باشد.

همچنین فرمول شیمیائی وینکریستین نیز در شکل نشان داده شده است.



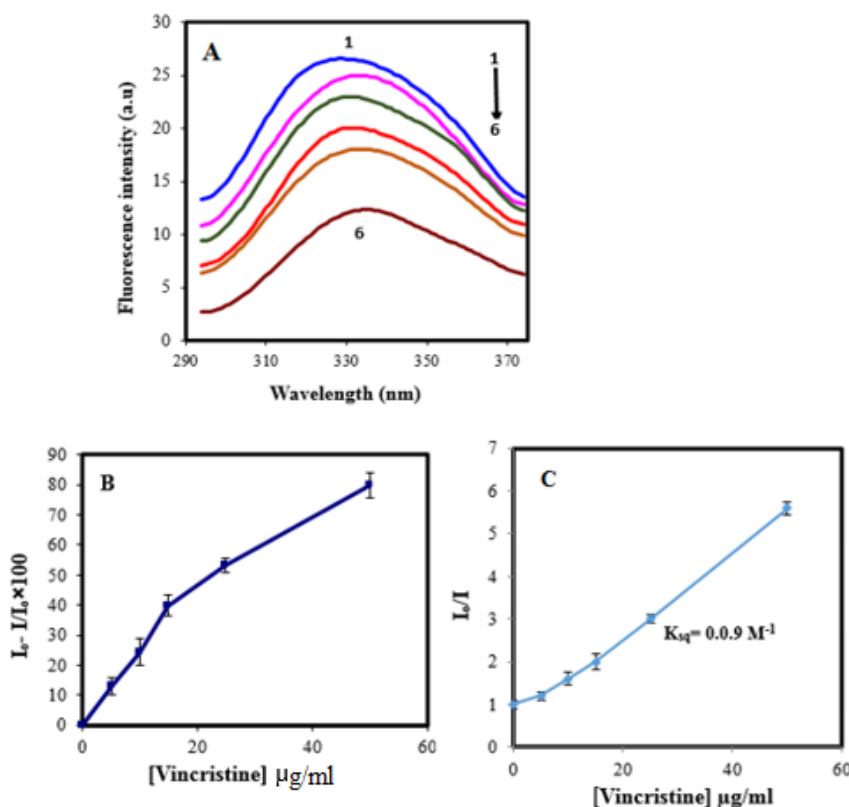
شکل ۱: ساختار شیمیائی، طیف جذبی داروی وینکریستین و طیف جذبی پروتئین های هیستونی H1 و Core بین ۱۹۰ تا ۲۹۰ نانومتر در محلول ۱۰ میلی مولار $\text{pH} = 7/2$ Tris-HCl.

بررسی اتصال دارو از طریق فلورسانس

اسپکتروسکوپی فلورسانس یک روش کارآمد در مطالعه لیگاند به بیوماکرومولکول هاست. بدین منظور نمونه های تیمار شده با دارو و کنترل در طول موج ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف تفاضلی آنها در محدوده ۲۹۰-۳۵۵ نانومتر رسم گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود کروماتین (شکل ۲A) دارای یک قله نشی در ۳۳۰ نانومتر است که مربوط به آمینو اسیدهای

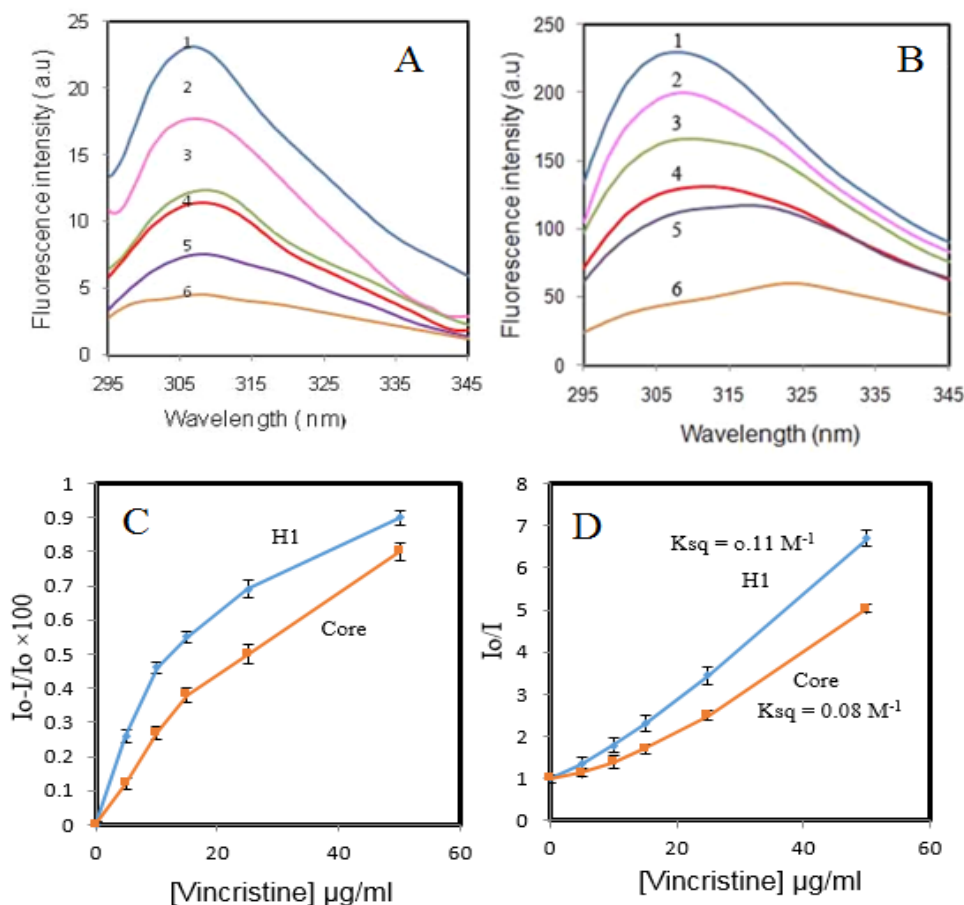
حلقوی در ساختار پروتئین های هیستونی می باشد. وینکریستین به صورت وابسته به غلظت، بدون آنکه در طیف کروماتین جابجایی ایجاد نماید موجب کاهش فلورسانس یا در واقع خاموشی فلورسانس کروماتین می گردد. شکل B

۲ تغییرات شدت فلورسانس به صورت $I_0/I \times 100$ برای کروماتین در غیاب و حضور غلظت های مختلف دارو نمایش داده شده است. این شکل به خوبی نمایانگر آن است که تمایل اتصال دارو تا غلظت ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر با شیب تند و سریع است و پس از آن روند تا حدودی کند می گردد. شکل C نمودار استرن-ولمر که نشان دهنده اثر خاموش کنندگی لیگاند وینکریستین است ارائه شده است. معادله استرن-ولمر به صورت $I_0/I = 1 + K_{sq}[Q]$ نمایش داده می شود که در آن غلظت I_0 و I به ترتیب شدت نشر فلورسانس در غیاب و در حضور غلظت مورد نظر دارو، K_{sq} ثابت خاموش کنندگی فلورسانس و $[Q]$ غلظت خاموش کننده می باشد. در واقع ثابت استرن-ولمر K_{sq} بیان کننده حساسیت یک فلوئورفور نسبت به خاموش کننده می باشد. برای رسم نمودار استرن-ولمر مقادیر I_0/I محاسبه و سپس تغییرات I_0/I نسبت به غلظت خاموش کننده یا همان وینکریستین رسم گردید. شیب این نمودار در واقع K_{sq} است که به صورت مولار بیان می شود. K_{sq} برای کروماتین 0.09 می باشد.



شکل ۲: A) تغییرات طیف نشری کروماتین پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف داروی وینکریستین شماره ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین. I_0/I B) $100 \times I_0/I$ کروماتین در غلظت های مختلف دارو و C) نمودار استرن ولمر کروماتین.

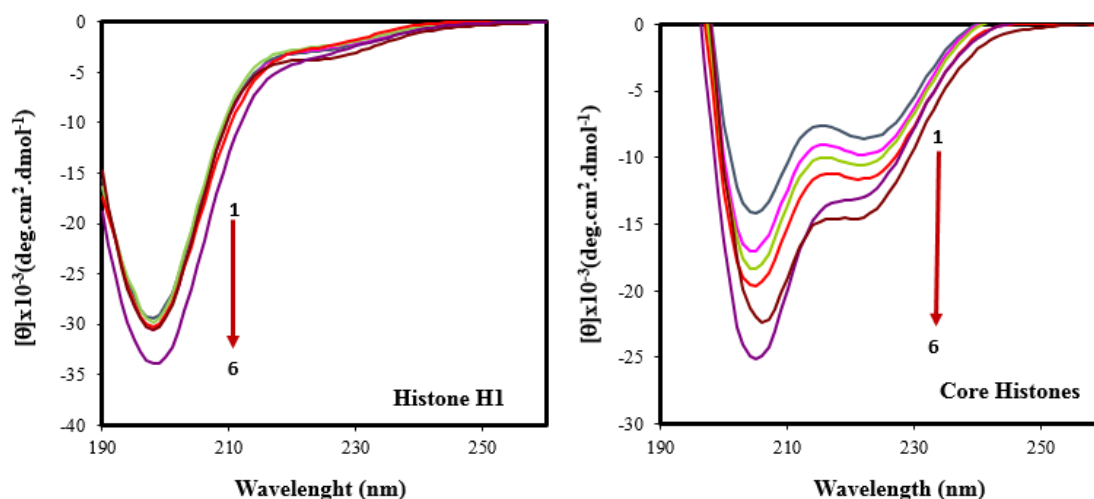
تغییرات شدت نشر فلورسانس کروماتین نشان دهنده این است که پروتئین های کروماتین در اتصال دارو به کروماتین دخالت دارند. بدین سبب میانکنش دارو با پروتئین های H1 و Core در محلول با استفاده از روش فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. هیستون های H1 (شکل ۳ A) و Core (۳ B) دارای یک قله منفرد در ۳۰۵ یا ۳۰۶ نانومتر می باشد که به آمینواسیدهای تیروزین موجود در ناحیه مرکزی این پروتئین ها مربوط است. وینکریستین به صورت وابسته به غلظت، بدون آنکه در طیف H1 و Core جایی ایجاد نماید و موجب کاهش فلورسانس یا در واقع خاموشی فلورسانس H1 و Core می گردد. شکل ۳ C تغییرات شدت فلورسانس به صورت $I_0 - I/I_0 \times 100$ و شکل ۳ D. نیز نمودار استرن-ولمر را برای پروتئینهای هیستونی نمایش میدهد. بطوریکه مشاهده میشود برای هر دو پروتئین، تمایل اتصال دارو در غلظت های پائین دارو با شیب تند همراه بوده و سپس در غلظت های بالای دارو کند میشود که نشان دهنده اشباع شدن است جایگاه های اتصال است. همچنین K_{sq} برای هیستون H1 و Core به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می باشد که نشان دهنده خاموش کنندگی قویتر دارو با H1 است.



شکل ۳: تغییرات نشر فلورسانس H1 (A) و Core (B) پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف داروی وینکریستین. شماره ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین. (C) $I_0 - I/I_0 \times 100$ و (D) نمودار استرن ولمر برای هیستون H1 و Core در غلظت های مختلف دارو میباشد.

بررسی اتصال دارو به هیستون های H1 و Core با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی CD و UV

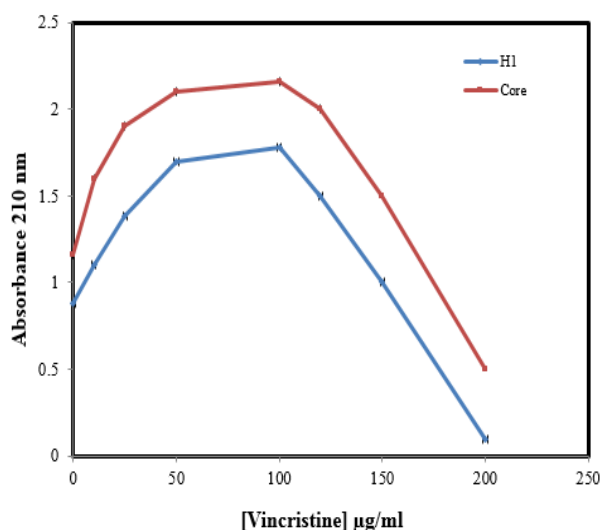
روش دو رنگ نمایی حلقوی (CD) یک روش بسیار ارزشمند برای بررسی ساختارهای ثانویه پروتئین ها است. با توجه به اینکه پیوندهای موجود در ساختار پروتئین ها در ناحیه Far-UV جذب دارند طیف CD ثبت شده در این ناحیه اطلاعات مفیدی را در زمینه ویژگی های ساختار ثانویه پروتئین ها نظیر مارپیچ آلفا و صفحات بتا فراهم می آورد. اتصال یک لیگاند به یک مولکول پروتئین می تواند از طریق ایجاد تغییرات در ساختار دوم پروتئین موجب ایجاد تغییرات مشخصی در طیف CD پروتئین گردد. بنابراین استفاده از دو رنگ نمایی حلقوی (CD) به منظور بررسی تغییرات ایجاد شده در ساختار دوم پروتئین هادر نتیجه اتصال به لیگاند بسیار مرسوم است (Kelly and Price, 2000). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، طیف CD هیستون H1 دارای یک ناحیه منفی در طول موج ۱۹۸ نانومتر می باشد که مربوط به پیچ های نامنظم در ساختار پروتئین می باشد. شدت ناحیه منفی در این پروتئین در حضور غلظت های مختلف تغییر چندانی نمی کند ولیکن در غلظت های بالاتر مقدار آن منفی تر میشود. طیف هیستون Core دارای ناحیه منفی در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر می باشد میزان تغییرات با θ نمایش داده می شود که در دو محدوده مثبت و منفی متغیر بوده و مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار است (Clark et al, 1988., Bradbury et al, 1975). با افزایش غلظت وینکریستین ناحیه منفی در موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر به شدت منفی تر می شود.



شکل ۴: طیف CD هیستون H1 (A) و Core (B) در حضور غلظت های مختلف داروی وینکریستین در محدوده Far-UV شماره های ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی وینکریستین

بمنظور بررسی تغییرات جذب UV هیستون ها در حضور دارو، غلظت معینی از پروتئین H1 و Core باغلظت های مختلف دارو انکوبه و جذب نمونه ها در ناحیه ۲۱۰ نانومتر ثبت گردید. شکل ۵ تغییرات میزان جذب تفاضلی حاصل از میانکنش پروتئین H1 و Core با داروی وینکریستین را نشان می دهد. بطوریکه مشاهده می شود تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر

میزان جذب به شدت افزایش مییابد و با افزایش غلظت داروکاهش چشمگیری در جذب کمپلکس H1 و دارو حاصل میشود. بنابراین می توان نتیجه گرفت در غلظت های پائین تر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین تا حد زیادی سبب باز شدن پروتئین H1 شده و در حضور غلظت بالاتر دارو، پروتئین تا حدی فشرده می شود. این کاهش برای داروی وینکریستین به گونه ای است که میزان جذب H1 در نمونه کنترل (بدون دارو) ۰/۸۸ بوده که در حضور دارو تا حد ۱/۸ افزایش و سپس کاهش مییابد در صورتی که میزان جذب Core در نمونه کنترل (بدون دارو) ۱/۱۶ بوده که در حضور دارو به ۲/۳ افزایش و سپس به ۰/۱ کاهش مییابد.



شکل ۵: تغییرات میزان جذب پروتئین H1 و Core در طول موج ۲۱۰ نانومتر حاصل از میانکنش با داروی وینکریستین

بحث

کروماتین بعنوان یک ترکیب نوکلئوپروتئینی متشکل از DNA و پروتئین های هیستونی در هسته سلول، امروزه یکی از اهداف اصلی داروهای ضد سرطان می باشند و تا کنون اتصال برخی از داروها به کروماتین و هیستون ها مورد بررسی قرار گرفته است (Chaires et al. 1983; Rabbani et al, 2004a,b). مطالعات قبلی نشان میدهد که وینکریستین به DNA و کروماتین متصل می شود ولی تمایل اتصال به کروماتین بیشتر از DNA است (Mohammadgholi et al, 2013). لذا چنین بنظر رسید که احتمالاً ترکیبات هیستونی کروماتین در این اتصال نقش داشته باشند این رفتار با اتصال آنتراسایکلین ها به DNA و کروماتین کاملاً متفاوت است زیرا این داروها تمایل بیشتری به DNA نسبت به کروماتین دارند (Rabbani et al, 2004b; Rabbani et al, 1999). اما این رفتار مشابه با اثر داروی میتوزانترون است که تمایل بیشتری برای اتصال به کروماتین از خود نشان می دهد

(Hajihassan et al, 2011). بدین منظور در این مطالعه اثر دارو بر روی پروتئین های هیستونی HI , Core در محلول مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از تمایل اتصال دارو به این پروتئین ها خصوصا هیستون HI است.

تغییرات جذب در ۲۱۰ نانومتر هیستون ها در حضور وینکریستین وابسته به غلظت دارو بوده و بالا رفتن جذب در غلظت های پائین نشان دهنده نفوذ حلقه های دارو به درون بخش گلوبولار پروتئین شده و موجب باز شدگی یا شل شدن در ساختار میشود ولی در غلظت های بالا فشردگی در ملکول ایجاد شده و باعث میشود تا جذب کاهش یابد. این تغییر با شدت کمتر در اتصال دانوماپسین به هیستون ها نیز مشاهده شده است (Rabbani et al, 2004b).

کاهش شدت نشر فلورسانس ، بررسی قدرت اتصال با کمک I_0-I/I_0 و همچنین ضریب استرن ولمر نشان دهنده خاموشی کروموفورهای هیستون ها با دارو می باشد به طوریکه وینکریستین تمایل بالاتری به HI نسبت به Core دارد طیف نشری ساطع شده از پروتئین های هیستونی HI و Core دارای یک قله منفرد در ۳۰۵ یا ۳۰۶ نانومتر می باشد که به آمینواسید های حلقوی خصوصا تیروزین موجود در ناحیه مرکزی این پروتئین ها مربوط است (Cowgill et al 1976). هیستون HI محتوی یک تیروزین (تیروزین ۷۲) است که در قسمت هیدروفوب پروتئین می باشد (Jordano et al, 1983) هیستونهای مرکزی حاوی تیروزین های بیشتری هستند بطوریکه هیستون H3 و H4 دو تیروزین و هیستون H2A و H2B دارای ۴-۳ تیروزین هستند که این آمینواسیدهای آروماتیک بیشتر در ناحیه هیدروفوب یا ناحیه گلوبولار هیستونها قرار گرفته اند (Isenberg et al, 1979) کاهش نشر فلورسانس و بررسی قدرت اتصال (EC_{50}) با کمک I_0-I/I_0 و همچنین ضریب استرن- ولمر نشان دهنده خاموشی اسید آمینه تیروزین می باشد به طوریکه وینکریستین تمایل بالاتری به هیستون HI نسبت به Core دارد تخمین EC_{50} دارو برای HI برابر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای Core مساوی ۱۸ میکروگرم در میلی لیتر است. این رفتار مشابه با اثر داروی میتوزانترون است که تمایل بیشتری برای اتصال به هیستون HI دارد (Rabbani et al, 1999).

مطالعات اسپکتروسکوپی CD به منظور بررسی ساختار دوم پروتئین های HI و Core در اتصال با دارو نشان می دهد که در حضور دارو بر شدت پیک منفی هیستون HI در ناحیه ۱۹۸ نانومتر افزوده می شود و از آنجا که این پیک مربوط به پیچ های نامنظم در ساختار پروتئین می باشد (Clark et al, 1988; Bradbury et al, 1975) تغییرات خصوصا ر غلظت های پائین بسیار کم است که مشابه میانکنش هیستون HI با داروهای دانوماپسین و آدریامایسین نشان داده است که اثر کمی بر روی ساختار دوم پروتئین HI دارند (Rabbani et al, 2004a,b) است. بررسی های انجام شده بر روی هیستونهای Core نیز نشان دهنده افزایش پیک منفی در طول موجهای ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر که مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار این پروتئین ها بوده و این امر نشان دهنده تغییر ساختار دوم پروتئین های مرکزی و افزایش ساختارهای آلفا هلیکس در آنها می باشد.

بطور کلی از نتایج فوق چنین بنظر میرسد که داروی وینکریستین که یک وینکا آلکالوئید است ، با پروتئین های هیستونی نیز میانکنش دارد و ترجیحا بخش آب گریز یا گلوبولار آنها را هدف قرار میدهد. تمایل بیشتر دارو به هیستون HI

میتواند باین دلیل باشد که این پروتئین نسبت به سایر هیستون ها در معرض محیط اطراف است. هیستون های Core با هم اکتامر هیستونی را میسازند که بوسیله DNA پوشیده شده و دسترسی به محیط اطراف محدود میگردد.

تشکر

منبع مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران طرح شماره ۱۷۰۱۰۶۴/۶/۰۷ می باشد که بدینوسیله تشکر می شود.

منابع

- Bradbury, E.M; Cary, P.D., Chapman, G.E., Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Boublik, M., Palau, J., Aviles, F. (1975) Histone Nomenclature, The structure and function of Chromatin. *Eur. J. Biochem.* 52: 605–613.
- Bradbury, E.M., Van Holde, K.E. Zlatanova, J., Leuba, S.H. (2004) Chromatin Structure and Dynamics: A Historical Perspective in Chromatin Structure and Dynamics. *New Compart Biochem.* 39: 1-11.
- Burgoyne, L.A., Wager, M.A., Atkinson, M.R. (1970) Calcium- dependent priming of DNA synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39: 254 -259.
- Chaires, J.B., Dattagupta, N., Crothey, D.N. (1983) Binding of daunomycin to calf thymus nucleosomes. *Biochemistry* 22: 284-292.
- Chen, WH., Qin, Y., Cai, Z., Chan, CL., Luo, GA., Jiang, ZH. (2005) Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double stranded DNA, *Bioorg. Med. Chem.* 13: 1859–1866.
- Clark, D.J., Hill, C.S., Martin, S.R., Thomas, J.O. (1988) Alpha- helix in carboxy-terminal domains of histones H1 and H5. *EMBO J.* 7: 69–75.
- Cowgill, R.W., Chen, R.F., Edelhoch, H. (1976) Tyrosyl Fluorescence in *Biochemical Fluorescence Concepts*, Marcel Dekker Inc. 2: 441–486.
- Dumontet, C., Jordan, MA. (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9: 790-803.
- Cutter, A.R. and Hayes, JJ. (2017) Linker histones: novel insights into structure-specific recognition of the nucleosome. *Biochem Cell Biol.* 95(2): 171-178.
- Gentili, P.L., Ortica, F., Favaro, G. (2008) Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B.* 112: 16793–16801.
- Gupta, S.P, Pandav, K., Pandya, P., Kumar, G.S, Barthwal, R. and Kumar, S. (2011) Methylene linker assisted DNA binding of Vinblastine and simpler analogs: Purine-pyrimidine specificity of indole derivatives. *Chem. Biol. Interface.* 1: 297–309.
- Hajihassan, Z., Rabbani-Chadegani, A. (2011) Interaction of mitoxantrone, as an anticancer drug, with chromatin proteins, core histones and H1, in solution. *International Journal of Biological Macromolecules.* 48: 87–92.
- Isenberg, I. (1979) Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 159–191.
- Jordano, J., Barbero, J.L., Montero, F., Franco, L. (1983) Fluorescence of histones H1. A tyrosinate-like fluorescence emission in *Ceratitis capitata* H1 at neutral pH values. *J. Biol. Chem.* 258: 315–320.

- Jutras, G., Belanger, K., Letarte, N., Adam, J.P., et al. (2018) Procarbazine, lomustine and vincristine toxicity in low-grade gliomas. *Current Oncol.* 25: e33-e39.
- Kelly, S. M., Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* 1: 349-384.
- Kowalski, A.(2016) Nuclear and nucleolar activity of linker histone variant H1.0. *Cell Mol Biol Lett.* 21:15.
- Kumar, S., Pandya, P., Pandav, K., Gupt, S. and Chopra, A. (2012) Structural studies on ligand–DNA systems: A robust approach in drug design. *J. Biosci.* 37(3): 553–561.
- Luger k., L. Dechassa M., J. Tremethic D. (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 13: 436-447.
- Mohammadgholi, A., Rabbani- Chadegani, A., Fallah, S. (2013) Mechanism of interaction of plant alkaloid vincristine in chromatin context: Spectroscopic study and comparison with DNA. *DNA and Cell Biology.* 32: 228-235.
- Ordu, O, Lusser, A, Dekker, NH. (2016) Recent insights from in vitro single-molecule studies into nucleosome structure and dynamics. *Biophys Rev.* 8: 33-49.
- Pandya, P., Gupta, S.P., Pandav, K., Barthwal, R., Jayaram, B., and Kumar, S. (2012) DNA binding studies of vinca alkaloids: experimental and computational evidence. *Nat Prod Commun.* 7: 305–309.
- Rabbani, A., Iskandar, M., Ausio, J. (1999) Daunomycin-induced unfolding and aggregation of chromatin, *J. Biol. Chem.* 274:18401-18406.
- Rabbani, A., Finn, R.M., Ausio, J. (2004a) The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bio Essays.* 27: 50–56.
- Rabbani, A., Finn, R.M., Thambirajah, A., Ausio, J. (2004b) Binding of antitumor antibiotic daunomycin to histones in chromatin and in solution. *Biochemistry.* 43:16497–16504.
- Rapkin, L.M., Anchel, D.R., Li R., Bazell-Jones, D.P. (2012) A view of the chromatin landscape. *Micron.* 43: 150-158.
- Sen, A., Maiti M. (1994) Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochem. Pharmacol.* 48: 2097–2102.
- Shati, A.A. and Elaid F.G. (2018) Hepatotoxic effect of subacute vincristine administration activates necrosis and intrinsic apoptosis in rats. *Arch Physiol biochem* 1: 1-11.
- Tang, H., Ye, Y., Li, T., Zhou, J., Chen, G. (2003) Study on Schiff base complexes-cellular DNA interactions by a novel system of Hadamard transforms fluorescence image microscopy. *Analyst.* 128: 974–979.
- Tyagi, G., Jangir, D K., Singh, P., Mehrotra, R. (2010) DNA Interaction Studies of an Anticancer Plant Alkaloid, Vincristine, Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *DNA and Cell Biology.* 29: 693-699.
- Zhu, Y., Zeng, H., Xie, J., Ba, L., Gao, X. and Lu, Z. (2004) Atomic Force Microscopy Studies on DNA Structural Changes Induced by Vincristine Sulfate and Aspirin. *Microsc Microanal.*, 10: 286–290.

Study of the binding affinity of anticancer drug, vincristine, to chromatin histone proteins by using spectroscopic methods

A. Mohammadgholi^{1,2}, A. Rabbani-Chadegani¹

Received:2017.09.17

Accepted:2018.11.26

Abstract

Vincristine is the most effective anticancer drug, widely used in the treatment of various cancers. Chromatin is composed of nucleosome units consisted of DNA and histone proteins. In the present study, for the first time the interaction of anticancer drug vincristine with histone H1 and core histone proteins in solution was investigated using fluorescence, UV and CD spectroscopy techniques. The results showed that in the presence of vincristine, fluorescence emission intensities were reduced in a dose dependent manner, representing quenching of the drug with aromatic residues located in the globular head domain of histone proteins. Stern-Volmer constant and binding affinity of the drug to histone H1 was higher than core histone proteins. The binding of vincristine to histones induced structural changes in circular dichroism spectra revealing increase of α -helix content of the histones. Moreover, vincristine increased UV absorbance of H1 and core histones at 210 nm (hyperchromicity). In conclusion it is suggested that vincristine, by its domains, can penetrate into globular head domain of histones. Also the binding affinity of vincristine to histone H1 is higher than to core histones, possibly because H1 is located in linker region which is more exposed and accessible to environment.

Keywords: Chromatin, Histone H1, Core histones, Vincristine, Spectroscopy

1- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 - Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran,

*(Corresponding authr:arabbani@ut.ac.ir)

بررسی ساختار میوه در گونه‌های اندمیک و نیمه اندمیک (*Veronica L.* (Plantaginaceae) در ایران

صغری رمزی^۱، شهریار سعیدی مهرروز^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷

چکیده

سرده *Veronica* از تیره *Plantaginaceae* یکی از سرده‌های بزرگ با حدود ۴۵۰ گونه در جهان است. این سرده با ۶۱ گونه در مناطق مختلف ایران پراکنش دارد. بنابر مطالعات گذشته، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی که در این سرده از اهمیت تاکسونومیک برخوردارند. از اینرو در این پژوهش سعی شده تا با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و تشریحی میوه در گونه‌های اندمیک و نیمه اندمیک ایران که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته اند، به حل روابط سیستماتیک این سرده کمک شود. پس از آماده‌سازی، میوه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (*SEM*) تصویربرداری شد. جهت مطالعات تشریحی نیز برش‌گیری به روش دستی و رنگ‌آمیزی مضاعف انجام گرفت. در این پژوهش صفات مختلف از جمله، اندازه، رنگ، شکل و سطح کپسول و همچنین صفات تشریحی همچون تعداد و نوع سلول لایه‌های مختلف پریکارپ بطور مقایسه‌ای بین گونه‌های مختلف بررسی شد. شکل کلی کپسول از تخم مرغی و نوک تیز تا واژقلبی و کاملاً فرورفته در راس متغیر بود. اغلب دارای پوشش کرک غده‌ای یا غیرغده‌ای بوده و فقط در *V. viscosa* سطح کپسول عاری از زوائد کرک و مو مانند بوده است. اندوکارپ عموماً لیگنینی شده و سلول‌های مزوکارپ از مدور تا تقریباً چهار گوش و از یک تا چهار لایه متغیراند. اپی‌کارپ اغلب شامل یک ردیف سلول کشیده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اندمیک، ریزریخت‌شناسی، کپسول، *SEM*

مقدمه

Veronica یک سرده با تنوع بسیار بالا و دارای حدود ۴۵۰ گونه در سطح جهان است. به طور عمده در مناطق معتدل نیمکره شمالی و استرالیا پراکنش دارد (Albach et al., 2004a). رویشگاه‌های آن از مناطق آبی، علفزارهای مرطوب و زمین‌های شهری تا دامنه‌های صخره‌ای متغیر است. مرکز تنوع این سرده شرق خاورمیانه و قفقاز معرفی شده است (Albach & chase, 2001).

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم گیاهی - سیستماتیک اکولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول (saeidimz@guilan.ac.ir)

سرده *Veronica* قبلاً در تیره Scrophulariaceae وجود داشت. مطالعات اولمستد و ویرز (۱۹۹۵) نشان داد که تیره Scrophulariaceae چندنیایی (Polyphyletic) است و برطبق این یافته‌ها سرده *Veronica* با *Plantago* قرابت بیشتری را نشان داد (APG, 2003; Olmsted & Reeves, 1995). مطالعات آلباخ و همکاران (Albach *et al.*, 2004a) نیز تعلق این سرده به تیره Plantaginaceae را تایید نمود. او با توجه مطالعات فیلوژنتیکی برپایه نشانگرهای مولکولی ITS و TrnL-F به معرفی رده‌بندی جدیدی برای این سرده و ادغام برخی سرده‌های دیگر در آن پرداخت. آنها این سرده بزرگ را تحت طایفه Veroniceae، تیره Plantaginaceae، راسته Lamiales رده‌بندی کرده‌اند و همچنین با ارائه یک رده‌بندی فراسرده‌ای برای *Veronica*، ۱۳ زیرجنس را برای آن معرفی نمودند.

این سرده متشکل از گیاهان علفی یکساله و چندساله، با برگ‌های متقابل یا متناوب و گل آذین منفرد یا خوشه‌ای است. اغلب گونه‌های این سرده در سطح اندام‌های خود پوشیده از کرک‌های ساده، غده‌ای، پشمی، نمدی، نرم و کوتاه، یک تا چند سلولی، گسترده، کم و بیش خمیده، به پشت برگشته و مجعد هستند. (Albach *et al.*, 2004b)

نوع میوه در این سرده کپسول است و شکوفایی و شکل آنها از ارزش تاکسونومیکی برخوردار است. کپسول در گونه‌های این سرده تخت (اکثر گونه‌ها) یا متورم، در رأس دارای فرورفتگی نسبتاً عمیق (اغلب گونه‌های بخشه *Pocilla*)، با فرورفتگی نسبتاً کم (تمامی گونه‌های بخشه *Beccabunga*)، دارای فرورفتگی کم مانند گونه‌های بخشه *Veronica* و یا فاقد فرورفتگی می‌باشد. از ویژگی‌های مهم دیگر می‌توان به ابعاد کپسول، پوشش کرکی سطح کپسول، فرورفتگی سینوس و زاویه آنها اشاره نمود. پایک میوه در این گونه‌ها، افراشته، درون‌گرا، پایین‌گرا، کمانی شکل، کم و بیش برگشته می‌باشد. طول خامه و کوتاهی یا بلندی آن نسبت به سینوس کپسول در شناسایی گونه‌ها تعیین کننده است (Albach *et al.*, 2004a & Juan *et al.*, 1996).

تکامل میوه در Veroniceae به صورت متورم به فشرده، نوک تیز به نوک کند تا فرورفته و قلبی شکل است (Yamazaki, 1957, Hong, 1984 & Albach *et al.*, 2004a).

فیشر (Fischer, 1981) در شماره ۱۴۷ فلور ایرانیکا بعنوان یکی از مهمترین منابع شناسایی گیاهان ایران، ۶۳ گونه از این سرده را برای محدوده مطالعاتی فلات ایران ذکر نمود که تعداد ۵۶ گونه از آن برای ایران نام برده شده است. پارسا (Parsa, 1949) با جمع‌بندی منابع به وجود ۵۹ گونه از *Veronica* در ایران اشاره می‌کند که ۳۸ گونه آن مشابه با گونه‌های فلور ایرانیکا است و چهار گونه مترادف می‌باشد.

اخیراً ۶۱ گونه و ۱۲ زیرگونه برای این سرده شناسایی کرد که دو گونه جدید *V. longipedicelata* و *V. daranica* و سه گزارش جدید *V. davisii*، *V. filiformis* و *V. kopetdaghensis* برای اولین بار از ایران است (Saeidi-Mehrvarz *et al.*, 2001a, Saeidi-Mehrvarz 2003, 2005).

تعداد گونه‌های انحصاری (*Veronica* (Endemic) در ایران ۱۸ گونه است (Saeidi-Mehrvarz, 2003)، بزرگترین رشته کوه‌های ایران مانند البرز و زاگرس، مرکز مهم گونه‌زایی *Veronica* هستند و اکثر گونه‌های انحصاری این سرده مانند *V. chionantha francispetae*، *V. siaretensis*، *V. rechingeri*، *V. mirabilis* و *V. mazanderana* در البرز وجود دارند. دامنه‌های کپه داغ در شمال شرقی ایران هر چند مرکز مهم گونه‌زایی این سرده نمی‌باشد اما گونه‌هایی مانند *V. kopetdaghensis*، *V. Khorassanica* و *V. czerniakowskiana* انحصاری این منطقه هستند. (Saeidi-Mehrvarz, 2005).

سعیدی مهرروز و همکاران (Saeidi-Mehrvarz et al. 2001b) ساختار میوه در ۱۰ تاکسون مختلف از سرده *Veronica* در ایران را از لحاظ ریخت‌شناسی و تشریحی مورد مطالعه قرار داد که طی آن شرح کامل مشخصات میوه برای هر تاکسون گزارش شد و کلید شناسایی براساس آن تهیه گردید.

با توجه به اهمیت سیستماتیک صفات ریزریخت‌شناسی در سرده *Veronica* و همچنین وجود ابهامات زیاد در رده‌بندی این سرده به ویژه در گونه‌های آسیای غربی، در این مطالعه سعی شده تا با تمرکز بر صفات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی میوه در گونه‌های اندمیک و نیمه اندمیک ایران علاوه بر ارائه اولین گزارش آنها، اهمیت هر یک نیز بررسی شود.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این مطالعات، گونه‌های مورد نظر از نمونه‌های هرباریومی دانشگاه گیلان (Guilan University Herbarium (GUH) و هرباریوم دانشگاه تهران (Tehran University Herbarium, (TUH) انتخاب شدند و کلیه صفات کیفی و کمی با اهمیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشخصات این نمونه‌های در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: مشخصات منطقه جمع آوری نمونه

گونه ها	مشخصات محل جمع آوری
<i>V. Khorassanica</i> Czerniak.	گرگان: آزادشهر، ۱۸۰۰ متری، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۷۷ خراسان: اسفراین، ۲۰۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۶۱
<i>V. microcarpa</i> Boiss.	سمنان: شاه پسند به شاهرود، ۱۸۰۰ متر، TUH، سعیدی مهرورز ۲۸۸۹۰ جلقا، ۱۸ کیلومتری جاده مرند، ۱۲۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۹۱ آذربایجان غربی: بین مرند و جلقا، ۱۷۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۱۸
<i>V. czerniakowskina</i> Monjuschko	آذربایجان غربی: شمال غربی ارومیه، ۱۷۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۱۵ خراسان: کپه داغ، ۲۴۰۰ متری، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۱۱
<i>V. Chionantha</i> * Bornm.	تهران: جاده چالوس، ۲۲۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۰۵ تهران: نزدیک به طالقان، ۱۸۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۰۸
<i>V. acrotheca</i> * Bornm & Gauba.	تهران: دماوند، ۱۳۰۰ متر، سعیدی، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۵۳ لشکرک، منطقه قرق شده، ۲۰۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۴۰ تهران: شیب شرقی دماوند، ۲۵۰۰ متری، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۵۵
<i>V. aucheri</i> * Boiss.	تهران: شیب جنوبی دماوند، ۴۵۰۰ متر، TUH، امیر طالبی ۴۳۶۱۸ مازندران: کلاردشت، ۱۲۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۶۸ کیاسر، دودانگه، ۲۲۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۲۰۵
<i>V. rechingeri</i> * M. A. Fischer	مازندران: جاده کرج به چالوس، ۲۰۰۰ متری، TUH، نقی نژاد ۲۸۹۵۷ مازندران: نوشهر، جنگل خیررود، ۲۲۰۰ متری، TUH، مرادی و ساداتی ۲۸۹۵۶ مازندران: جاده چالوس، ۲۵۰۰-۲۲۰۰ متری، TUH، نقی نژاد ۳۳۵۲۳
<i>V. gaubae</i> * Bornm	مازندران، کیاسر، ۲۲۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز
<i>V. viscosa</i> Boiss.	کرمانشاه: سنقر، ۱۴۵۰ متری، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۳۰۵
<i>V. intercedens</i> Bornm.	خراسان شمالی: شیروان، ۱۷۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۷۲ تهران: فیروز کوه، ۱۵۰۰ متر، GUH، سعیدی مهرورز؟
<i>V. rubrifolia</i> subsp. <i>respectatissima</i> M. A. Fischer	چهارمحال و بختیاری: زرک، علی آبادی، GUH، ۲۴۲۲۱
<i>V. rubrifolia</i> subsp. <i>rubrifolia</i> * Boiss.	تهران: به سمت درکه، ۲۵۰۰ متری، TUH، نقی نژاد ۲۸۹۵۵ کرمان: کوه جوپار، ۲۶۰۰ متری، کوچکی
<i>V. mazanderana</i> * Wendelbo	مازندران، دودانگه، ۲۰۰۰ متری، GUH، قلی زاده ۲۴۰۸۰ مازندران، آمل، روستای فیلبند، ۲۳۰۰ متری، GUH، سعیدی مهرورز ۲۴۰۸۱

* نمونه‌های ستاره‌دار انحصاری ایران هستند.

اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی میوه

با استفاده از استریوسکوپیک میکروسکوپ مطالعه بر روی سطح نمونه‌های خشک و جامد صورت می‌گیرد. در این بررسی نیز اندازه‌گیری برخی خصوصیات مانند طول و عرض میوه و بذر، رنگ بذر، نوع و تراکم کرک‌ها در سطح میوه، شکل کلی میوه و بذر با استفاده از استریوسکوپیک میکروسکوپ مدل Leica/Wild Z برای نمونه‌های مورد بررسی انجام گرفت. اندازه‌ها برحسب میکرومتر گزارش شد. در نهایت با استفاده از دوربین Canon مدل A322 از میوه و بذر عکسبرداری شد.

مطالعات ریزریخت‌شناسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (Scanning Electron Microscope)

جهت مطالعه آرایش سطح میوه و بذر، نمونه‌های سالم و رسیده از گونه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شدند و سپس میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

برای آماده‌سازی نمونه‌های مورد مطالعه با SEM، میوه‌های رسیده از نمونه‌ها انتخاب شد، تعداد لازم از بذرها و میوه‌ها در جعبه مخصوص قرار گرفت تا برای اسکن با میکروسکوپ الکترونی SEM به مرکز پژوهش‌های متالورژی رازی در تهران منتقل شدند. نمونه‌ها بر روی پایه آلومینیومی الصاق شده و توسط دستگاه Sputter coater مدل EMITECH K 450X سطح آن با لایه نازکی از طلا پوشانده می‌شود. پس از آن اسکن نمونه‌ها بوسیله دستگاه SEM مدل VEGA TESCAN در ولتاژ ۱۵KV انجام شد. بکارگیری واژه‌ها در تبیین الگوی تزئینات و شکل کلی براساس خوان و همکاران (Juan *et al.*, 1996) انجام شده است.

مطالعات تشریحی

جهت بررسی تشریحی در این پژوهش کپسول‌های رسیده از نمونه‌های موجود انتخاب شد، به نحوی که از هر گونه ۲ تا ۳ نمونه از رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. کپسول‌های جدا شده به مدت دو هفته در محلول FAA تثبیت شد تا جهت برش‌گیری آماده شوند. محلول FAA حاصل از ترکیب کردن ۵ درصد اسید استیک، ۵ درصد فرمالین و ۹۰ درصد اتانول می‌باشد.

برش‌گیری از نمونه‌ها به صورت دستی انجام گرفت. رنگ‌آمیزی نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی مضاعف با استفاده از رنگ‌های سبز متیل و قرمز کنگو صورت گرفت.

نتایج

بررسی ریخت‌شناسی و ساختار تشریحی میوه در سرده *Veronica*

در نمونه‌های مورد مطالعه کپسول‌ها از دو حجره تقریباً مساوی که توسط یک دیواره سلولی مجزا شده تشکیل می‌شوند. کپسول دارای تقارن دو طرفی است. شکل کلی کپسول از تخم مرغی و نوک تیز تا واژقلبی و کاملاً فرورفته در رأس متغیر بود. اغلب دارای پوشش کرک غده‌ای یا غیرغده‌ای بوده و فقط در *V. viscosa* سطح کپسول عاری از زوائد کرک و مو مانند بوده است. پریکارپ در همه موارد شامل سه لایه اپی‌کارپ، مزوکارپ و اندوکارپ است. اندوکارپ عموماً لیگنینی شده و طی رنگ‌آمیزی مضاعف به صورت لایه سبز رنگ مشهود است. سلول‌های مزوکارپ از مدور تا تقریباً چهار گوش و از یک تا چهار لایه متغیراند. اپی‌کارپ اغلب شامل یک ردیف سلول کشیده کوچک می‌باشد.

جدول ۲: ویژگی های صفات میوه در گونه‌های مورد مطالعه از *Veronica L.*

نام گونه ها	زیرجنس	طول (mm)	عرض (mm)	شکل	فشردگی	شکل رأس	کوتیکول	کرک	صفات تشریحی کپسول			
									قطر پریکارپ (µm)	سلول-های اپی کارپ	اندوکار پ	
<i>V. Khorassanica</i>	<i>pentasepala</i>	۲/۵ (۲/۷۵±۰/۳) ۳	۲/۵ ۲±۱/۰۶ (۳/۵) ۴	واژقلب ی	نسبتاً فشرده	نسبتاً فرورفته	چروکیده	غیرغده- ای، زگیل دار	۱۳۱/۵۳	مستطیلی ، تک لایه	چهار گوش ۲ لایه	۲ لایه لیگنینی
<i>V. microcarpa</i>	<i>pentasepala</i>	۲ (۲/۱±۰/۱) ۲/۲	۱/۲ ۴۵±۰/۳ (۱/) ۱/۷	واژقلب ی	نسبتاً فشرده	نسبتاً فرورفته	چروکیده	غیرغده- ای، زگیل دار	۸۹/۳۵	مستطیلی ، تک لایه	منظم ۱-۲ لایه	۲ لایه لیگنینی
<i>V. Czerniakowskiana</i>	<i>pentasepala</i>	۳ (۳/۳±۰/۴) ۳/۶	۳/۸ ۹۵±۰/۲ (۳/) ۴/۱	واژتخم مرغی تا واژقلب ی	فشرده	نسبتاً فرورفته	مخطط- دانه دار	غیرغده- ای، زگیل دار	۱۱۶/۵۵	کشیده، تک لایه	تقریباً مدور ۱-۲ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. chionantha</i>	<i>pentasepala</i>	۳/۴ /۴۵±۰/۰۷ (۳)	۳/۲ ۴±۰/۰۷ (۳/۵)	واژقلب ی	فشرده		چروکیده	غیرغده- ای، صاف	۱۰۷/۳۹	کشیده، تک لایه	مدور ۲ لایه	۲-۳ لایه لیگنینی
<i>V. acrotheca</i>	<i>pentasepala</i>	۳ (۴±۱/۴) ۵	۳ /۵±۰/۴ (۳) ۴	تخم- مرغی	متورم	نوک تیز	چروکیده	غیرغده- ای، زگیل دار	۱۷۳/۷۱	مستطیلی کوچک، ۳ تا ۲ لایه	مدور ۳-۴ لایه	۳ لایه، ضخیم لیگنینی
<i>V. aucheri</i>	<i>pentasepala</i>	۲ (۲/۵±۰/۷) ۳	۳ /۵±۰/۷ (۳) ۴	کلیوی	فشرده	عمیقاً فرورفته		غده- ای(نادر) غیرغده ای، زگیل دار	۱۰۳/۲۳	کشیده، ۲ لایه	نامنظم ۱-۲ لایه	۲ لایه لیگنینی
<i>V. rechingeri</i>	<i>pentasepala</i>	۲ (۲/۵±۰/۷) ۳	۳ (۴±۱/۴) ۵	کلیوی	فشرده	فرورفته	دانه دار	غده‌ای کوتاه	۱۴۱/۵۲	کشیده و باریک، تک لایه	مدور ۳ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. gaubae</i>	<i>pentasepala</i>	۴ (۴/۵±۰/۷) ۵	۴/۵ (۵±۰/۷) ۵/۵	کلیوی	فشرده	عمیقاً فرورفته	صاف	غیرغده- ای، صاف	۱۸۱/۴۸	مستطیلی ، تک لایه	نامنظم ۲-۳ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. viscosa</i>	<i>Pocilla</i>	۴/۵ /۷۵±۱/۰۶ (۴) ۵	۷ /۵±۰/۷ (۷) ۸	کلیوی	فشرده	عمیقاً فرورفته	دانه دار	-	۸۴/۳۵	نامنظم، تک لایه	نامنظم و کوچک ۱-۲ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. intercedens</i>	<i>Pocilla</i>	۵ (۵/۵±۰/۳) ۵/۵	۴ /۵±۰/۷ (۴) ۵	کلیوی	فشرده	فرورفته	چروکیده	غیرغده- ای(کم) غده‌ای	۸۶/۵۸	تقریباً چهار گوش ، تک لایه	نامنظم ۲ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. rubrifolia</i> subsp. <i>respectatissima</i>	<i>Pocilla</i>	۲/۵ (۲/۷۵±۰/۳) ۳	۳/۵ (۴±۰/۷) ۴/۵	کلیوی	فشرده	عمیقاً فرورفته	مخطط	غده‌ای، در حاشیه	۱۶۲/۳۲	کشیده، تک لایه	مدور ۲ لایه	تک لایه لیگنینی
<i>V. rubrifolia</i> subsp. <i>rubrifolia</i>	<i>Pocilla</i>	۲/۵ (۲/۸±۰/۴) ۳/۱	۳/۳ (۴±۰/۹) ۴/۷	کلیوی	نسبتاً فشرده	عمیقاً فرورفته	مخطط	غده‌ای، در حاشیه غیرغده- ای، کوتاه، زگیل دار	۱۹۵/۱۳	کوچک و نامنظم، تک لایه	مدور ۲ لایه	۲ لایه لیگنینی
<i>V. mazanderana</i>	<i>Pellidosperma</i>	۳/۵ /۵۲±۱/۰۶ ۵ (۴)	۳ /۵±۰/۷ (۳) ۴	واژ قلبی	نسبتاً فشرده	فرورفته	مخطط	غده‌ای، زگیل دار	۸۷/۱۱	کشیده، تک لایه	نامنظم ۱-۲ لایه	۲ لایه لیگنینی

V. khorassanica

کپسول‌های واژ قلبی با طول و عرضی به ابعاد $۲/۵-۳ \times ۲/۴-۵$ میلی‌متر، کمی فشرده، در رأس تقریباً فرورفته (شکل ۱)، سلول‌های سطح کپسول تقریباً برآمده و با حاشیه سینوسی و کوتیکول در آن چروکیده می‌باشد. سرتاسر کپسول به صورت همگن پوشیده از کرک‌های غیرغده‌ای می‌باشد. کرک‌ها یک یا دو سلولی و در سطح خود زگیل‌دار می‌باشند (شکل ۲). پریکارپ در این گونه دارای ضخامت $۸۳/۲۵-۱۵۹/۸۴$ میکرومتر با اپی‌کارپ دولایه متشکل از سلول‌های مستطیلی کشیده، مزوکارپ با دو تا سه ردیف سلول‌های منظم و تقریباً چهارگوش، اندوکارپ دو لایه با دیواره‌های لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. microcarpa

کپسول‌های واژ قلبی با ابعاد $۲-۲/۲ \times ۱/۱-۲/۷$ میلی‌متر، نسبت به سایر نمونه‌های دارای کمترین مقدار است؛ تقریباً فشرده و در رأس تقریباً فرورفته می‌باشد (شکل ۱). سلول‌های سطح مقعر با حاشیه سینوسی بوده، کوتیکول چروکیده و تمامی سطح کپسول پوشیده از کرک‌های غیرغده‌ای دو تا سه سلولی است. کرک‌ها زگیل‌دار می‌باشند (شکل ۲). ضخامت پریکارپ $۱۱۶-۹۷$ میکرومتر است. اپی‌کارپ شامل یک ردیف سلول‌های مستطیلی، مزوکارپ یک تا دو ردیف از سلول‌های نامنظم، اندوکارپ از دو لایه سلول با دیواره لیگنینی شده تشکیل شده است (شکل ۳).

V. Czerniakowskiana

تقریباً واژ قلبی با ابعاد $۳/۳-۳/۹۵$ میلی‌متر، کاملاً فشرده، در رأس کمی فرورفته (شکل ۱)، سلول‌های سطح چندضلعی و مقعر، کوتیکول مخطط-دانه‌دار، پوشیده از کرک‌های غیرغده‌ای یک تا چند سلولی و زگیل‌دار می‌باشد (شکل ۲). ضخامت پریکارپ $۱۳۳-۱۱۹$ میکرومتر، اپی‌کارپ متشکل از سلول‌های کشیده، مزوکارپ یک یا دو لایه با سلول‌های تقریباً مدور، اندوکارپ یک لایه از سلول با دیواره‌های لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. chionantha

کپسول واژ قلبی به ابعاد $۳/۴-۳/۵ \times ۳/۳-۲/۸$ میلی‌متر، فشرده، در رأس کاملاً فرورفته (شکل ۱)، کوتیکول چروکیده و سلول‌های سطح مقعر با حاشیه سینوسی است. سطح کپسول بصورت پراکنده پوشیده از کرک‌های غیرغده‌ای صاف، اغلب دو سلولی می‌باشد. تراکم کرک‌ها در حاشیه کپسول بیشتر است (شکل ۲). پریکارپ دارای ضخامتی حدود $۸۶/۵-۱۴۰$ میکرومتر می‌باشد. سلول‌های اپی‌کارپ مستطیلی کشیده در یک ردیف قرار گرفته‌اند. مزوکارپ دو ردیف از سلول‌های مدور و اندوکارپ در آن دو تا سه لایه می‌باشد (شکل ۳).

V. acrotheca

کپسول در این گونه تخم مرغی شکل و با ابعاد $3-5 \times 3-4$ میلی‌متر می‌باشد. غیر فشرده و رأس آن بصورت نوک تیز است (شکل ۱)، سلول‌های اپیدرم نامنظم و مقعر و کوتیکول در آن چرکیده است. کرک‌های غیرغده ای بطور یکنواخت تمام سطح کپسول را می‌پوشانند. کرک‌ها یک تا چند سلولی و زگیل‌دار هستند (شکل ۲). پریکارپ با ضخامت ۱۵۰-۱۲۰ میکرومتر متشکل از سه لایه اپی‌کارپ با سلول‌های مستطیلی کوچک، مزوکارپ سه تا چهارلایه‌ای از سلول‌های مدور و اندوکارپ ضخیم سه لایه‌ای می‌باشد (شکل ۳).

V. aucheri

کپسول‌ها کلیوی شکل، به ابعاد $2-3 \times 3-4$ میلی‌متر، از دو سو کاملاً فشرده و در رأس دارای فرورفتگی می‌باشد (شکل ۱). سلول‌های اپیدرم برآمده و با حاشیه سینوسی، کوتیکول مخطط، سطح کپسول بطور یکنواخت پوشیده از کرک‌های چندسلولی بلند و زگیل‌دار، اغلب کرک‌ها غیرغده‌ای و به ندرت کرک‌های غده‌ای با سر تخم مرغی شکل وجود دارد (شکل ۲). پریکارپ دارای ضخامت ۱۱۶-۸۶ میکرومتر مشتمل بر سه لایه؛ اپی‌کارپ با دو تا سه ردیف از سلول‌های کشیده، مزوکارپ با سلول‌های نامنظم و اندوکارپ متشکل از دو لایه سلول لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. rechingeri

کپسول در این گونه کلیوی شکل، با ابعاد $3-4 \times 3-5$ میلی‌متر، فشرده، در رأس فرورفته (شکل ۱)، دارای سلول‌های سطحی مقعر با حاشیه سینوسی و کوتیکول در آن بصورت دانه‌دار می‌باشد. سطح کپسول بصورت پراکنده پوشیده از کرک‌های غده‌ای کوتاه با سر فنجانی شکل و پایه دو یا چند سلولی است (شکل ۲). دارای پریکاریبی به ضخامت ۱۷۰-۱۰۷ میکرومتر، اپی‌کارپ تک لایه‌ای از سلول‌های کشیده و باریک، مزوکارپ متشکل از سه لایه سلول‌های مدور و سلول‌های اندوکارپ لیگنینی شده و در یک ردیف کنار هم قرار دارند (شکل ۳).

V. gaubae

کپسول کلیوی شکل به ابعاد $4-5 \times 4/5-5/5$ میلی‌متر، از دو سو کاملاً فشرده، در رأس دارای فرورفتگی زیاد می‌باشد (شکل ۱). سلول‌های سطح کپسول نامنظم، محدب و با حاشیه تقریباً سینوسی بوده و کوتیکول در آن صاف است. تمام سطح کپسول پوشیده از کرک است، کرک‌ها چند سلولی، غیر غده‌ای و یا غده‌ای و صاف (فاقد هر نوع زگیل یا تزئینات دیگری) هستند. کرک‌های غده‌ای دارای پایه دو یا سه سلولی و یک سر تخم‌مرغی شکل‌اند (شکل ۲). پریکارپ در این گونه از ضخامت حدود ۱۵۶-۲۰۶ میکرومتر برخوردار است. اپی‌کارپ شامل یک ردیف سلول مربع تا مستطیلی شکل، مزوکارپ دو تا سه ردیف از سلول‌های نامنظم و اندوکارپ با ضخامت کم متشکل از یک ردیف سلول کوچک با دیواره‌های لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. viscosa

کپسول بزرگ به ابعاد $۴/۵-۵ \times ۷-۸$ میلی‌متر، کلیوی شکل، فشرده و در رأس دارای فرورفتگی عمیق است (شکل ۱). سلول‌های اپیدرم مستطیلی شکل با حاشیه سینوسی و تقریباً تخت، کوتیکول دانه‌دار، سطح کپسول عاری از هرگونه کرک می‌باشد (شکل ۲). ضخامت کوتیکول در آن به $۷۰-۱۰۶$ میکرومتر می‌رسد. اپی کارپ شامل یک لایه از سلول‌های نامنظم، مزوکارپ دارای ضخامت کم و با یک یا دو لایه از سلول‌های نامنظم و کوچک، اندوکارپ تک ردیفی متشکل از سلول‌های مدور با دیواره لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. intercedens

کپسول‌ها کلیوی شکل، فشرده و در راس دارای فرورفتگی (شکل ۱)، دارای ابعاد $۵-۴ \times ۵-۵/۵$ میلی‌متر، سلول‌های اپیدرم نامنظم با حاشیه سینوسی، کوتیکول چروکیده و سطح کپسول دارای کرک‌های غده‌ای و غیر غده‌ای، به نحوی که کرک‌های غیرغده‌ای فقط در قسمت حاشیه‌ای در بریدگی رأسی کپسول دیده می‌شود و کرک‌های غده‌ای کوتاه به‌طور یکنواخت پراکنده است، همچنین یک‌سوم انتهایی کپسول عاری از هرگونه کرک است. کرک‌های غیرغده‌ای دارای بیش از یک سلول، و کرک‌های غده‌ای دارای پایک دو یا سه سلولی و یه سر فنجان‌ی شکل می‌باشد (شکل ۲). پریکارپ به ضخامت $۱۲۳-۵۷$ میکرومتر متشکل از سه لایه‌ی اپی کارپ شامل یک ردیف سلول تقریباً چهار گوش، مزوکارپ با دو لایه از سلول‌های نامنظم و لایه اندوکارپ حاصل از یک ردیف سلول‌های مدور با دیواره لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. rubrifolia subsp. respectatissima

کپسول کلیوی شکل به ابعاد $۲/۵-۳ \times ۳/۴-۵/۵$ میلی‌متر، در رأس دارای فرورفتگی، بطور جانبی فشرده (شکل ۱)، سلول‌های اپیدرم منظم و کمی برآمده، و دارای کوتیکول مخطط می‌باشد. حاشیه کپسول دارای کرک‌های غده‌ای بلند و سایر نواحی عاری از کرک می‌باشد. کرک‌ها دارای یک پایه سه سلولی با تزئینات زگیل‌دار و یک سر تک سلولی فنجان‌ی شکل می‌باشد (شکل ۲). پریکارپ تقریباً ضخیم با اندازه $۱۲۳-۲۰۳$ میکرومتر، اپی کارپ متشکل از یک ردیف سلول کشیده، مزوکارپ اغلب دو لایه با سلول‌های مدور، اندوکارپ یک لایه از سلول‌های مدور با دیواره چوبی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. rubrifolia subsp. rubrifolia

کپسول کلیوی شکل با ابعاد $۲/۵-۳ \times ۳/۴-۵/۵$ میلی‌متر، در رأس کاملاً فرورفته، تقریباً فشرده (شکل ۱)، سلول‌های اپیدرمی با مرز نامشخص، کوتیکول مخطط، سطح کپسول پوشیده از کرک می‌باشد. کرک‌های غده‌ای بلند، با پایک‌های چند سلولی و سر تک سلولی فنجان‌ی شکل فقط در حاشیه کپسول جای گرفته‌اند. کرک‌های غیرغده‌ای از انواع غده‌ای کوتاه‌تر و در تمامی نواحی کپسول پراکنده‌اند، دو یا چند سلولی و زگیل‌دار هستند (شکل ۲). ضخامت پریکارپ با اندازه $۱۶۷-۲۲۶$ میکرومتر

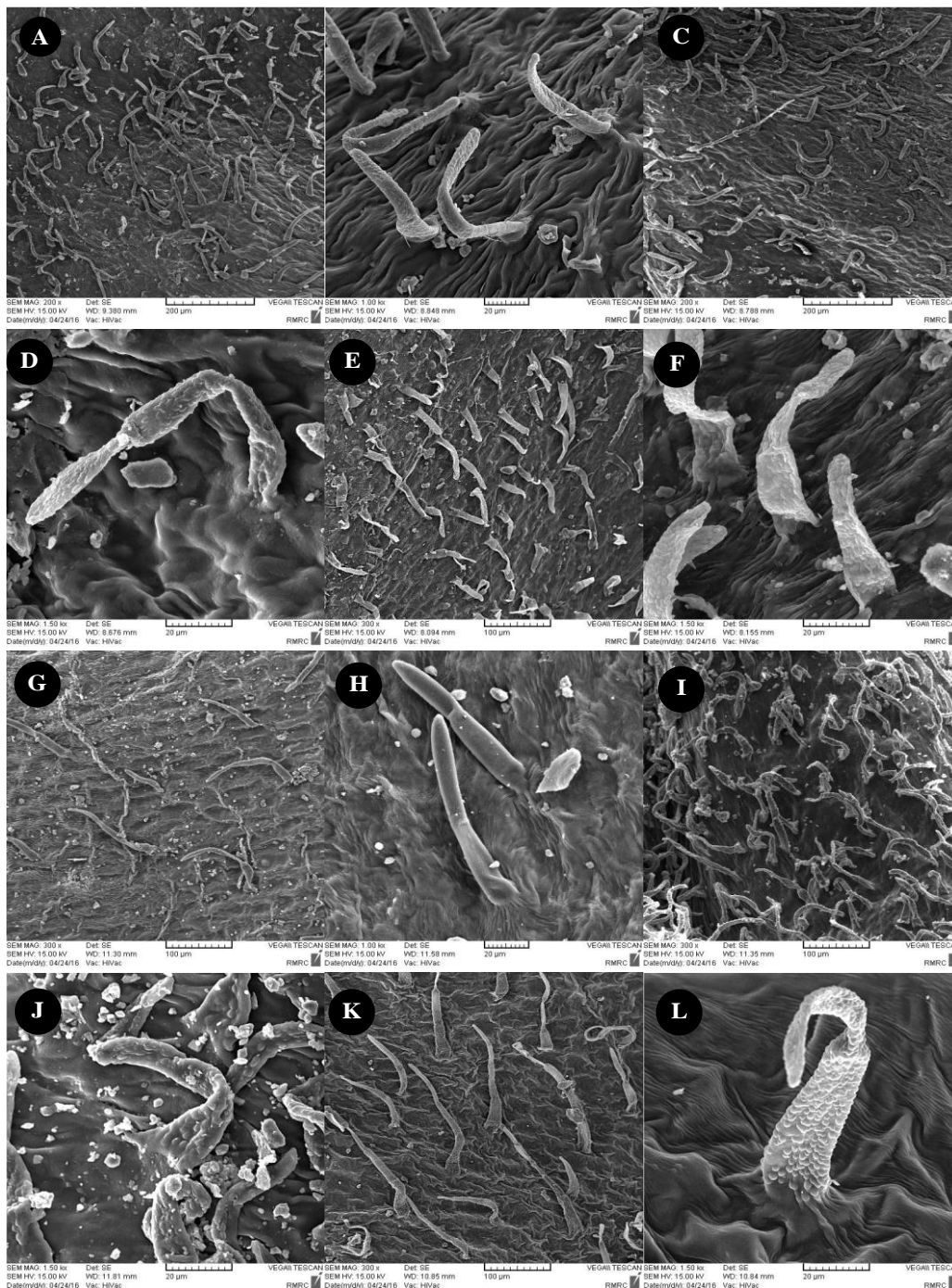
نسبت به سایرین از مقدار بیشتری برخوردار است. اپی‌کارپ متشکل از یک ردیف سلول‌های کوچک نامنظم، مزوکارپ اغلب شامل دو ردیف از سلول‌های مدور و اندورکارپ یک لایه نازک از سلول با دیواره لیگنینی شده می‌باشد (شکل ۳).

V. mazanderana

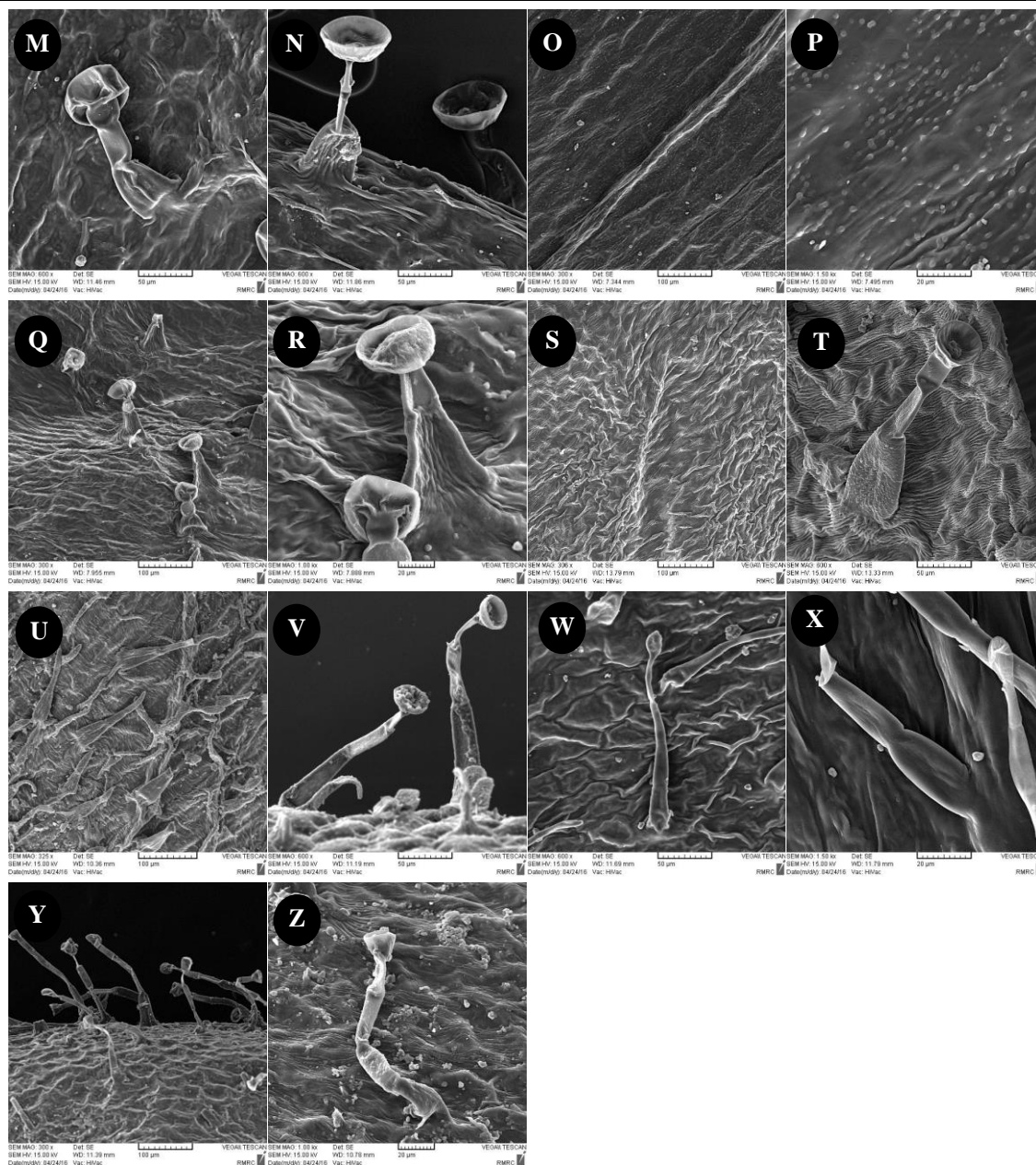
کپسول در این گونه واژقلبی با ابعاد $3-4 \times 3/5-5$ ، بطور جانبی فشرده و در راس دارای فرورفتگی است (شکل ۱). سلول‌های اپیدرمی چندوجهی، مقعر با حاشیه سینوسی و کوتیکول مخطط می‌باشد. سراسر کپسول پوشیده از کرک‌ها غده‌ای، پایک‌ها چند سلولی و سر تک سلولی واژ تخم‌مرغی شکل است (شکل ۲). ضخامت پریکارپ نسبت به سایر نمونه‌ها کمتر و حدود $109-57$ میکرومتر است. اپی‌کارپ یک ردیف از سلول‌های کشیده، مزوکارپ یک یا دو ردیف از سلول‌های نامنظم و اندورکارپ معمولاً متشکل از دو ردیف سلول با دیواره‌های چوبی شده می‌باشد (شکل ۳).



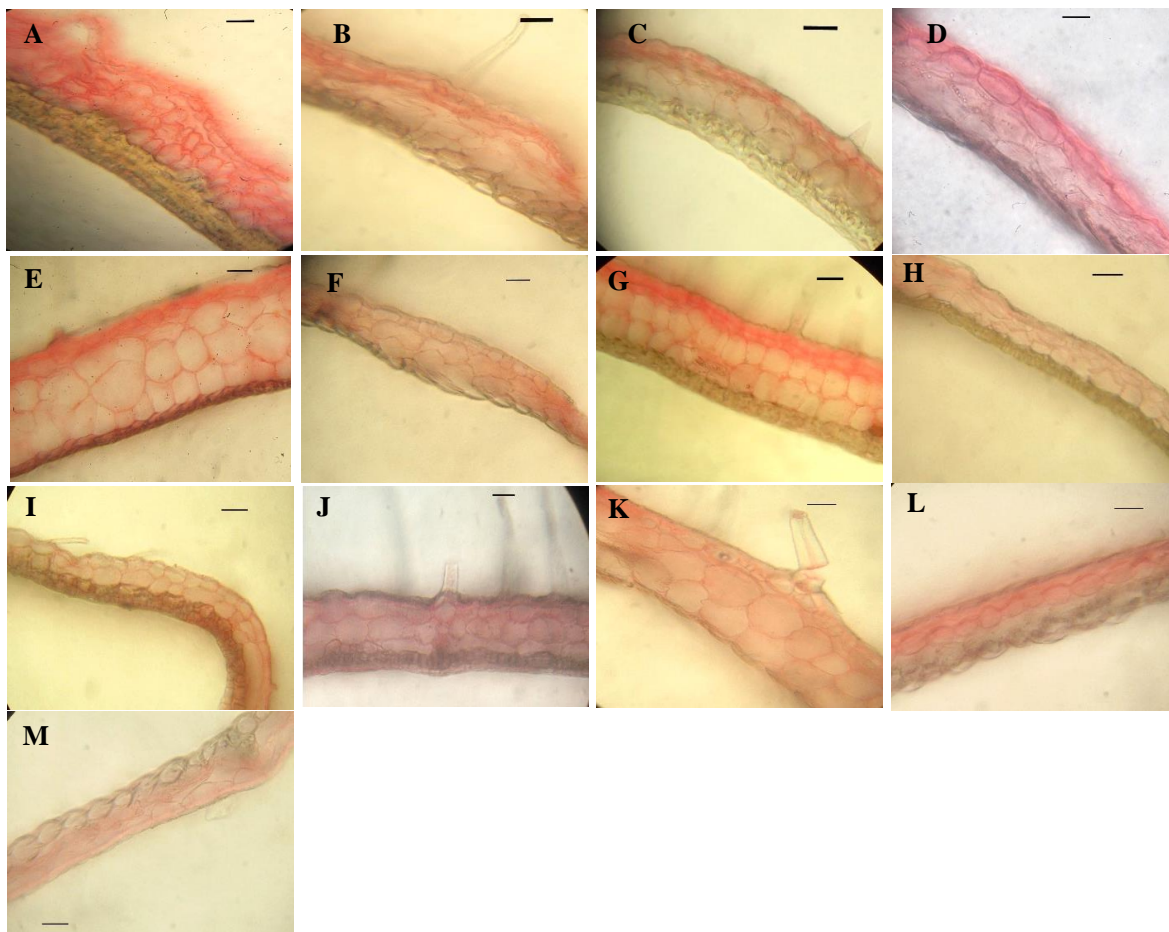
شکل ۱: شکل کپسول در نمونه‌های مورد مطالعه از سرده *Veronica* (A) *V. khorassanica* (B) *V. microcarpa* (C) *V. Czerniakowskiana* (D) *V. chionantha* (E) *V. acrotheca* (F) *V. aucheri* (G) *V. rechingeri* (H) *V. viscosa* (I) *V. intercedens* (J) *V. rubrifolia* subsp. *rubrifolia* (K) *V. rubrifolia* subsp. *respectatissima* (L) *V. gaubae* (N) *V. mazanderana* (مقیاس = ۱ میلی‌متر)



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ SEM سطح میوه در سرده *Veronica* (A, B *V. khorassanica* (C, D *V. microcarpa* (E, F *V. chionantha* (G, H *V. czerniacowoskiana* (I, J *V. acrothecha* (K, L *V. aucheri* (مقیاس: A, C = ۲۰۰ میکرومتر، E, G, I, K = ۱۰۰ میکرومتر و B, D, F, H, J, L = ۲۰ میکرومتر)



ادامه شکل ۲: (M, N) *V. rechingeri* (O, P) *V. viscosa* (Q, R) *V. intercedens* (S, T) *V. rubrifolia* subsp. *respectatissima* (U, V) *V. mazanderana* (Y, Z) *V. gaubae* (W, X) *V. rubrifolia* subsp. *rubrifolia* (مقیاس: C=۱۰۰ میکرومتر، A, B, H, J, K=۵۰ میکرومتر و D, F, L, N=۲۰ میکرومتر)



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری مقطع برش عرضی از میوه کپسول در سرده *Veronica* (A *V. acrotheca* (B *V. aucheri* (C *V. chionantha* (D *V. Czerniakowskiana* (E *V. gaubae* (F *V. intercedens* (G *V. khorasanika* (H *V. mazanderana* (I *V. rubrifolia* subsp. *rubrifolia* (L *V. rubrifolia* subsp. *respectatissima* (K *V. rechingeri* (J *V. microcarpa* (M *V. viscosa* (بزرگ‌نمای = $\times 40$ ، مقیاس = 30 میکرومتر)

بحث

صفات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی میوه در سرده *Veronica* بطور سنتی با ارزش بوده است. خوآن و همکاران (Juan *et al.*, 1996) در ادامه بررسی‌های بیوسیستماتیکی این سرده، صفات فوق را در تفکیک گونه‌ها موثر می‌دانند. او بیان کرد که صفاتی هم‌چون موقعیت گل آذین در کنار صفات میوه مثل وجود کرک، نوع آن و الگوی کوتیکول می‌تواند در تشخیص گونه‌ها تعیین کننده باشد. وی با توجه به تفاوت‌های موجود در این صفات کلید شناسایی نیز ارائه داد.

هنگ (Hong, 1984) میوه در سرده *Veronica* را به صورت کپسول‌هایی فشرده و دو لوبی، در مقابل کپسول‌های متورم و نوک تیز در *Wolfenia*، معرفی می‌کند. او به یک روند تکاملی تغییر از کپسول‌های متورم و نوک تیز به سوی انواع فشرده و دو لوبی معتقد بود.

آلباخ (Albach, 2004a) با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی، معتقد است که کپسول‌های فشرده و پهن احتمالاً حالت پیشرفته در طایفه Veroniceae هستند اما این صفات در طول تکامل چندین بار گرایش به حالت‌های دیگر را نشان داده است.

در بین نمونه‌های مورد بررسی اکثر صفات تقریباً از تنوع بالایی برخوردار بودند و در مجموع می‌توان گفت در سطح گونه بسیار تعیین‌کننده بودند. از زیرجنس *Pentasepala*، *V. acrotheca* از نظر شکل کپسول در میان نمونه‌های مورد بررسی منحصر بفرود بود. میوه در این گونه برخلاف سایرین متورم و نوک تیز است، صفتی که بنابر نظر آلباخ (Albach, 2004a) پلیزومورفیک است. در کلید شناسایی *Veronica* در ایران، *V. acrotheca* به لحاظ همین صفت از سایرگونه‌ها جدا می‌شود. در بررسی تشریحی این گونه، ضخامت زیاد لایه اندوکارپ نسبت به سایر نمونه‌ها، بطور چشم‌گیری قابل توجه است. با توجه به اینکه این دیواره سلولی در این لایه چوبی شده است، در مجموع پوشش محکمی برای بذرهای نهفته در میوه پدید آورده است.

کپسول در *V. khorassanica* و *V. microcarpa* در صفاتی مثل شکل کلی، فشردگی، شکل رأس، الگوی کوتیکول، کرک و برخی صفات تشریحی مشابه است. این در حالی است که صفات بذر در آنها تفاوت زیادی را نشان می‌دهد. الگوی کوتیکول در *V. Czerniakowskiana* از نوع مخطط-دانه دار است، الگویی که در بین نمونه‌های مورد مطالعه منحصر به این گونه است. در بررسی‌های خوان و همکاران (Juan et al., 1996) و سعیدی مهروز و همکاران (Saeidi-Mehrvarz, 2001b)، این الگو در گونه‌هایی مثل *V. arvensis*، *V. praecox*، *V. agretis*، *V. persica*، *V. cymbalaria*، *V. biloba* و *V. ceratocrpa* گزارش شده است، این در حالی است که برخلاف *V. Czerniakowskiana*، هیچ یک از این گونه‌ها از زیر جنس *Pentacepala* نیستند. کرک‌های سطح کپسول در آن همانند *V. Khorassanica*، *V. microcarpa* و *V. acrotheca* فقط از نوع غیرغده‌ای-زگیل دار و فاقد کرک غده‌ای هستند. در بین گزارشات موجود از میوه *Veronica* این نوع پوشش به طور ویژه گزارش نشده است.

کپسول‌ها در *V. chionantha* نیز همانند موارد فوق فاقد کرک غده‌ای هستند با این تفاوت که در این گونه کرک‌های غیرغده‌ای سطح کپسول کاملاً صاف بوده و هیچ تزئینات خاصی ندارد، *V. filiformis* در مطالعات (Saeidi-Mehrvarz, 2001b) به این مورد شبیه است.

شکل کلی میوه در *V. aucheri*، *V. rechingeri* و *V. gaubae* برخلاف سایر گونه‌های زیرجنس *Pentasepala* در این مطالعه، از نوع کلیوی است. این در حالی است که تمامی گونه‌های مورد بررسی از زیر جنس *Pocilla* شکل کلی کلیوی را نشان می‌دهند. این سه گونه در صفات دیگر مثل کوتیکول کاملاً متفاوت از هم هستند. الگوی کوتیکول در این گونه‌ها به ترتیب از نوع

مخطط، دانه‌دار و صاف است. در *V. gaubae* کرک‌ها غده‌ای و غیرغده‌ای همانند الگوی کوتیکول صاف و فاقد هر نوع تزئیناتی است، لذا این گونه در بین سایر نمونه‌های مورد بررسی منحصر بفرد است.

در *V. aucheri* به ندرت کرک‌های غده‌ای دیده می‌شود. در صورت وجود کرک‌های غده‌ای آن همانند *V. gaubae* دارای سر تخم‌مرغی شکل است برخلاف کرک‌های صرفاً غده‌ای در *V. rechingeri* که هم کوتاه‌تراند و هم دارای سر فنجان‌ی شکل هستند.

V. viscosa از زیر جنس *Pocilla* در سطح کپسول خود فاقد هر نوع پوشش کرک‌دار است. این خصوصیت در میان سایر نمونه‌ها مشاهده نشد. وجود این صفت در دیگر گونه‌های سرده *Veronica* پیش از این در مواردی مثل *V. scutella*، *V. peregrina* (Juan et al., 1996)، *V. davisii*، *V. serpyllifolia*، *V. ceratocarpa* و *V. francispetae* گزارش شده (Saeidi-) (Mehrvaz, 2001b).

در *V. viscosa* در صفات بذر متفاوت از دیگر گونه‌های مورد مطالعه از زیر جنس *Pocilla* نشان داد. همچنین میوه در *viscosa* از نظر اندازه از سایرین گونه‌ها بزرگتر است. به طور کلی می‌توان گفت در بین نمونه‌های مورد مطالعه کپسول در زیر جنس *Pocilla* به نسبت از اندازه بزرگتری برخوردار است.

V. viscosa که کپسول آن فاقد کرک است، *V. intercedens* نیز در نیمه انتهایی کپسول فاقد کرک است. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که در این مطالعه نمونه‌های زیر جنس *Pocilla* از تراکم کرک کمتری در سطح کپسول برخوردارند.

دو زیر گونه از *V. rubrifolia* در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج نشان داد که هرچند در صفاتی مثل شکل کلی، فشردگی، شکل رأس و الگوی کوتیکول شباهت دارند، نوع و پراکنش کرک‌ها در سطح کپسول دارای تفاوت‌هایی هستند. *V. rubrifolia* subsp. *repectatissima* تنها واجد کرک‌های غده‌ای بصورت تنک و در حاشیه کپسول است در حالی که در *V. rubrifolia* subsp. *rubrifolia* کرک‌های غده‌ای در حاشیه و کرک‌های غیرغده‌ای زگیل‌دار بصورت متراکم‌تری در تمام سطح دیده می‌شوند. این دو زیرگونه در برخی صفات بذر مثل شکل کلی، رنگ و جزئیات الگوی پوشش بذر نیز با هم متفاوتند.

V. mazanderana تنها نماینده زیر جنس *Pellidiosperma* در مقایسه با گزارش‌های دیگر از این زیرجنس در صفاتی مثل عدم وجود کرک غیرغده‌ای، ناصاف بودن کرک‌ها و الگوی کوتیکول متفاوت است. *V. mazanderana* هم در برخی صفات میوه و هم در صفات بذر به گونه‌های زیر جنس *Pocilla* نزدیک‌تر است.

به طور کلی صفات ریزریخت‌شناسی ارزش تاکسونومیک بیشتری نسبت به صفات ریخت‌شناسی و تشریحی نشان دادند. برخی از صفات همانند کوتیکول، و کرک در تفکیک گونه و همچنین زیرگونه موثر است. ویژگی‌های میوه در سطح این پژوهش به‌طور کامل حدود زیرجنس را پشتیبانی نمی‌کند که احتمال می‌رود به روند تکاملی این سرده که حالات موازی و

برگشتی در بسیاری از صفات آن گزارش شده، مرتبط باشد. از این رو به منظور بررسی بیشتر در این زمینه انجام مطالعات فیلوژنی در این گونه‌ها پیشنهاد می‌گردد.

منابع

- Albach, D.C., & Chase, M. W. (2001) Paraphyly of Veronica (Veroniceae; Scrophulariaceae): evidence from the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *J. Pl. Res.*, 114: 9-18.
- Albach, D.C., Martínez-Ortega, M. M., Fischer, M. A., & Chase, M. W. (2004a) Evolution of Veroniceae: a phylogenetic perspective. *Ann Mo Bot Gard* 91: 275-302.
- Albach, D.C., Martínez-Ortega, M. M., Fischer, M. A., & Chase, M. W. (2004b) A new classification of the tribe Veroniceae—problems and a possible solution. *Taxon* 53: 429-452.
- APG. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* 141: 399-436.
- Hong, D.Y. (1984) Taxonomy and evolution of the Veroniceae (Scrophulariaceae) with special reference to palynology. *Opera Bot.* 75: 5-60.
- Juan, R., Fernandez, I. & Pastor, J. (1996) Morphological and anatomical studies on fruits of Veronica from south-west Spain. *Bot J Linn Soc* 123: 157-171.
- Olmstead, R.G. and Reeves, P.A. (1995) Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard* 82: 176-193.
- Parsa A. (1949) Scrophulariaceae Flora de Iran vol. 4 pp. 320-460. -Tehran
- Saeidi-Mehrvarz, S. & Kharabian, A. (2005) Chromosome counts of some Veronica L. (Scrophulariaceae) species from Iran. *Turk J Bot*, 29: 263-267.
- Saeidi-Mehrvarz, S. (2003) Veronica longipedicellata (Scrophulariaceae), a new species from Iran. *Nord J Bot* 23: 559-561.
- Saeidi-Mehrvarz, S. (2005) Distribution pattern of the genus Veronica L. in Iran. *Bangladesh J. Bot.* 34: 71-75.
- Saeidi-Mehrvarz, S., Ghahreman, A., & Assadi, M. (2001a) Notes on the genus Veronica (Scrophulariaceae: Tribe Veroniceae) in Iran: Seed characters and a new record. *Pak. J. Bot* 33: 143-152.
- Saeidi-Mehrvarz, S., Ghahreman, A., & Assadi, M. (2001b) Fruit structure of some species of Veronica (Scrophulariaceae: Tribe Veroniceae) from Iran. *Iran. J. Bot* 9: 111-121.
- Yamazaki, T. (1957) Taxonomical and phylogenetic studies of Scrophulariaceae-Veroniceae with special reference to Veronica and Veronicastrum in Eastern Asia. *J Fac Sci U Tokyo* 3 7: 92-162.

The Study of Fruit Structure in Endemic and Semi-Endemic Species of *Veronica L.* (Plantaginaceae) in Iran

S. Ramzi¹, S. Saeidi-Mehrvarz^{2*}

Received: 2017/12/23

Accepted: 2018/09/29

Abstract

Veronica L. (Plantaginaceae) is one of the largest genera with about 450 species in the world. This genus is present in different regions of Iran with 61 species. According to previous studies, the morphological and micro-morphological characters of this genus have a taxonomic significance. Therefore, we tried to solve the systematic relationships of this genus by studying the morphological, micro-morphological and anatomical characters of its fruit in endemic and semi-endemic species of Iran, that have been studied less. After preparation, the fruits were studied using a SEM (Scanning electron Microscope). Cutting manually and double staining were performed for anatomical studies. In this study, various traits such as size, color, shape and surface of the capsule as well as anatomical characteristics such as number and type of cell of different layers of pericarp were investigated comparatively between different species. The shape of the capsule was varied from ovoid to obcordate and tip to emarginate. In most cases, the capsules are puberulent, and only in the *V. viscosa* the surface is glabrous. The endocarp is generally lignified, the mesocarp cells vary from rounded to square and from one to four layers. Epicarp often consists of elongate cell.

Keywords: Micromorphology, Endemic, Capsule, SEM

1- MSc in Botany- Systematic and Ecology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

* (Corresponding Author: saeidimz@guilan.ac.ir)

اثر تنش شوری بر ارقام برنج (*Oryza Sativa L.*) در مرحله گیاهچه‌ای و زایشی تحت شرایط کشت

هیدروپونیک

فرزین سعیدزاده*^۱، رضا تقی زاده^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۷

چکیده

به منظور بررسی اثرات سطوح شوری بر روی ارقام برنج دو آزمایش جداگانه در مرحله گیاهچه‌ای و زایشی به ترتیب در شرایط آزمایشگاهی و اتاقک رشد به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (فاکتور اول ۱۰ سطح شوری و فاکتور دوم ۱۰ ژنوتیپ برنج) در سه تکرار اجرا شد. بر اساس نتایج، با افزایش سطوح شوری، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و مقدار پتاسیم بر حسب درصد ماده خشک کاهش و مقدار سدیم اندام، افزایش و در مرحله رشد زایشی، ارتفاع بوته، تعداد پانیکول، تعداد دانه پر در پانیکول و وزن دانه پر در پانیکول کاهش یافت. تجزیه خوشه‌ای بر مبنای صفات مورد بررسی در مرحله زایشی، ارقام مورد مطالعه را به چهار گروه تقسیم کرد و رقم غریب سیاه ریحانی به تنهایی در گروهی مجزا قرار گرفت که به عنوان یک رقم و منبع ژنتیکی متحمل به شوری جهت استفاده در برنامه‌های به نژادی قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارقام برنج، شوری، مرحله گیاهچه‌ای، مرحله رشد زایشی

مقدمه

برنج (*Oryza Sativa L.*) غذای اصلی بیش از ۵۰ درصد جمعیت جهان می‌باشد (Muthayya *et al.*, 2014). شوری به عنوان یک عامل تنش‌زای غیر زنده، مانع رشد و توسعه بسیاری از محصولات شده (Pons *et al.*, 2011) و محدودکننده پتانسیل عملکرد در گیاه برنج می‌باشد (Rajiv *et al.*, 2010). حساسیت ارقام برنج به سطوح مختلف شوری با مراحل رشد، متفاوت بوده (Zeng & Shannon, 2000) به طوری که بسیاری از ارقام در مرحله جوانه‌زنی مقاوم ولی در مرحله گیاهچه‌ای حساس می‌باشند (Gholizadeh *et al.*, 2013). تحت تنش شوری، رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه ارقام حساس کاهش می‌یابد (Mer *et al.*, 2000) اما ارقام متحمل به دلیل توسعه ریشه خود کمتر تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند (Wattana & Maysaya, 2008). بسیاری از محققین

۱ - مربی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، آستارا، ایران.

* (نویسنده مسئول: f.saeidzadeh@iau-astara.ac.ir)

۲ - استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، آستارا، ایران.

عقیده دارند که ارقام متحمل مقدار سدیم بیشتری را دفع نموده و با جذب پتاسیم بیشتر، نسبت سدیم به پتاسیم را در اندام‌های خود پایین نگه می‌دارند (Gholizadeh *et al.*, 2013).

در آزمایشی توسط ممیزی و همکاران (Momayezi *et al.*, 2009) مشاهده شد که از لحاظ وزن خشک، بین ژنوتیپ‌ها و سطوح شوری اختلاف معنی‌داری وجود داشته و تحت شرایط شوری ژنوتیپ‌های متحمل، رشد بهتری را نسبت به شاهد نشان دادند. محققین کاهش وزن خشک ریشه، ساقه و غلظت یون K^+ و افزایش یون Na^+ اندام را در اثر افزایش شوری به اثرات ثانویه یا سمیت یونی نسبت دادند (Farahmandfar *et al.*, 2009). با افزایش شوری، تجمع یون Na^+ در برگ‌ها و ریشه ارقام متحمل و حساس برنج و میزان و K^+ به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد (Moradi & Ismail, 2007). دلیل کاهش یون K^+ را به جایگزینی یون Na^+ به جای یون K^+ در بافت گیاه نسبت داده شده است، که یکی از عوامل مهم ایجاد سمیت می‌باشد (Farahmandfar *et al.*, 2009). در گزارشی عالم‌گیر و همکاران (Alamgir *et al.*, 2007) نیز عنوان نمودند که تحت شرایط تنش، غلظت بالای یون K^+ یک مشخصه مثبت برای تحمل نمک بوده که در اندام‌های هوایی ارقام متحمل، مشاهده شد.

افزایش تنش شوری منجر به اثرات منفی بر عملکرد و اجزای آن نظیر ارتفاع گیاه، تعداد پانیکول، تعداد دانه در پانیکول، وزن خشک اندام‌های هوایی (بیوماس)، مقدار پتاسیم اندام‌های هوایی، وزن و درصد دانه‌های پر می‌شود (Abidmahmood & Arifkhan, 2009). اثر سوء شوری عمدتاً مربوط به بالا بودن فشار اسمزی و سمیت ناشی از تجمع یون‌ها است که منجر به کاهش جذب آب و عناصر غذایی می‌گردد (Homayie, 2002). واکنش‌های متنوعی در پاسخ به شوری در مرحله رشد رویشی و زایشی وجود دارد و واکنش تحمل در مرحله رشد رویشی نشاء، در نهایت به کاهش عملکرد دانه منجر می‌گردد (Aishashereen *et al.*, 2005). تحت تنش ملایم، وزن خشک برخی ارقام برنج در ابتدا تا حدودی افزایش یافته و سپس به علت کاهش سطح برگ، کاهش می‌یابد، اما تنش شدیدتر باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه می‌شود (Gholizadeh *et al.*, 2013). نظر به اهمیت مشکل شوری برای بسیاری از نقاط برنج خیز کشور به خصوص نواحی نزدیک به دریا یعنی حاشیه دریا خزر (Biabani *et al.*, 2012) و با توجه به اینکه، جوانه‌زنی بذر به ویژه در زمان مواجهه با تنش‌های محیطی، یکی از بحرانی‌ترین مراحل زندگی گیاه به شمار می‌رود (Yokoi *et al.*, 2002) که در صورت عبور بذر از مرحله جوانه‌زنی در شرایط تنش، گیاهچه‌های حاصل شانس بیشتری برای ادامه رشد و توسعه داشته و توانایی بالاتری جهت تحمل و غلبه بر شرایط نامساعد محیطی خواهند یافت (Bargali & Bargali, 2016). از طرفی ظهور سریع و یکنواخت گیاهچه‌ها در مزرعه از جمله عوامل در استقرار و حصول تراکم بوته مطلوب برای دستیابی به عملکرد کمی و کیفی بالقوه گیاهان زراعی است (Awasthi *et al.*, 2016). لذا این تحقیق با هدف شناسایی ارقام متحمل به شوری در مرحله گیاهچه‌ای و رشد زایشی، بررسی صفات وابسته به رشد و ارزیابی میزان تحمل آن‌ها در سطوح مختلف انجام گردید.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف شوری بر روی ارقام برنج دو آزمایش جداگانه یکی در مرحله گیاهچه‌ای و دیگری در مرحله زایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مرکز تحقیقات برنج ایران-رشت انجام گرفت. مرحله اول آزمایش (مرحله گیاهچه‌ای) در شرایط اتاقک رشد انجام شد. در این مرحله از تحقیق، فاکتور اول سطوح شوری (۰، ۰.۴، ۰.۸، ۱.۰، ۱.۲، ۱.۴، ۱.۶ و ۱.۸ دسی زیمنس بر متر) و فاکتور دوم ۱۰ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفتند. ارقام مذکور از موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت تهیه گردید. ژنوتیپ‌های مذکور در محلول غذایی یوشیدا کشت داده شدند (Yoshida, 1981).

جدول ۱: ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده در آزمایش جهت تحمل به شوری و منشأ آن‌ها

ردیف	رقم	شجره	منشأ
۱	درفک	سپیدرود × سالاری	ایران
۲	تابش	رقم حاصل از جهش است	ایران
۳	آمل ۳	GEB 24 * TN-1	هند
۴	غریب سیاه ریحانی	رقم محلی	ایران
۵	حسن سرایی آتشگاه	رقم محلی	ایران
۶	طارم پا کوتاه	رقم محلی	ایران
۷	دم سپید	رقم محلی	ایران
۸	طارم امیری	رقم محلی	ایران
۹	هاشمی (شاهد محلی)	رقم محلی	ایران
۱۰	پوکالی (شاهد متحمل)	-	IRRI
۱۱	IR29 (شاهد حساس)	IR 833-6-2-1-1 //IR 1561-149-1//IR 24*4/O. NIVARA	IRRI

برای استفاده از شرایط کنترل شده اتاقک رشد، ابتدا صفحه‌های یونولیت، با ابعاد $۲۸ \times ۳۲ \times ۱/۲۵$ سانتی‌متر تهیه شده و ۱۰۰ سوراخ با قطر ۱ سانتی‌متر (۱۰×۱۰) در آن‌ها ایجاد گردید. زیر این صفحه یونولیت، یک شبکه نایلونی ریز چسبانده شد. مجموعه مذکور روی یک سینی با ابعاد $۳۵ \times ۳۰ \times ۱۴$ سانتی‌متر گذاشته شد. جهت تهیه محلول پایه یوشیدا، هر کدام از عناصر ماکرو به میزان لازم وزن شده و به ظرف ۱ لیتری انتقال داده شد. ظرف مذکور با ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر پر شده و مخلوط به ولومتریک فلاسک ۲ لیتری انتقال داده شد و در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲ لیتر رسید و به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد. عناصر میکرو هر کدام جداگانه در ۵۰ و فریک کلراید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. سپس همه عناصر در ۱ لیتر آب مقطر مخلوط شدند. محلول فریک کلراید قبل از اسید سیتریک به مخلوط اضافه شد و در نهایت ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک به مخلوط اضافه شده و حجم به ۲ لیتر رسانده شد. هر سینی با ۱۱ لیتر این محلول غذایی پر شد. برای جلوگیری از ورس به محلول سیلیکون (سدیم متا-سیلیکات ۹-هیدرات به میزان $۴/۵$ میلی‌گرم در لیتر) اضافه شد. هر ۸ روز یک بار محلول تعویض و PH محلول در سطح ۵ نگهداری می‌شد. بذور جوانه زده با دمای ۲۷ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز به داخل

هر سوراخ و شبکه نایلونی انتقال داده شدند. در هر سوراخ ۳ عدد بذر جوانه زده نشاء شدند. تا ۳ روز پس از انتقال بذور از آب مقطر استفاده شده، سپس مخلوط غذایی شور به سینی‌ها انتقال داده شدند. محلول غذایی شور با اضافه نمودن نمک NaCl به محلول غذایی یوشیدا ساخته می‌شد.

در مرحله گیاهچه‌ای، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، میزان تجمع سدیم و پتاسیم در گیاه اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری این صفات از گیاهانی که ۱۴ روز در محلول یوشیدا کشت شده بودند و سپس تیمار شوری روی آن‌ها اعمال شده بود استفاده گردید و حدود ۳ هفته بعد از اعمال شوری، یادداشت‌برداری انجام گرفت. برگ‌های مرده‌ای که در هنگام تنظیم PH و تعویض محیط کشت می‌افتادند، جمع‌آوری شده و در نمونه نهایی جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه، هر یک به‌صورت جداگانه از بذر جدا شده و به پاکت‌های مخصوص خود انتقال یافتند. پاکت‌ها به مدت ۱۴ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از اطمینان از خشک شدن، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه با استفاده از ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شدند.

برای اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم از دستگاه فلاپم فتومتر (Sherwood-M420) استفاده شد (Biabani *et al.*, 2012). مرحله دوم آزمایش (مرحله رشد زایشی) در شرایط اتاقک رشد انجام گرفت. در این مرحله نیز، از ارقام و ژنوتیپ‌های برنج مورد استفاده در مرحله آزمایش گیاهچه‌ای استفاده گردید ولی رقم هاشمی به‌عنوان شاهد محلی جایگزین رقم پوکالی گردید. برای کشت از ظروف پلاستیکی استفاده شد. در طول دوره آزمایش، برای ثابت نگه داشتن شوری مورد نظر و یا افزایش یا کاهش آن، به‌وسیله زهکش، همه آب خارج شده و سپس سینی‌ها با آب شور که شوری مورد نظر را تأمین نماید، پر می‌شدند. هنگامی که گیاهچه‌ها ۲۱ روزه شدند، سینی‌های پلاستیکی با تیمارهای آب شور پر شدند. ۳ هفته بعد از اعمال شوری، برگ‌های وارپته حساس لوله‌ای شده و به رنگ مایل به سفید درآمدند. از آنجایی که عملکرد دانه هر ظرف بهترین شاخص برای میزان تحمل است، لذا به‌طور جداگانه برای هر رقم در سطوح شوری مختلف، صفات ارتفاع بوته، تعداد پانیکول، تعداد دانه پر در پانیکول و وزن دانه پر در پانیکول اندازه‌گیری و ثبت گردید. در پایان این مرحله از آزمایش، از نرم‌افزارهای SAS 9.1 برای تجزیه واریانس، Excel 2007 به منظور ترسیم نمودارها و از Minitab 17 جهت تجزیه خوشه‌ای و رسم دندروگرام حاصل استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی میزان جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های رشد در ارقام مختلف برنج تحت تنش شوری

در محیط شور مقادیر وزن خشک ریشه‌چه و وزن ساقه‌چه کاهش یافته و نسبت سدیم به پتاسیم افزایش می‌یابد، همچنین بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ فوق‌تنوع وجود داشته و ژنوتیپ‌های متحمل نسبت سدیم به پتاسیم پایین‌تری در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس دارند (Golizadeh *et al.*, 2013). در این آزمایش نیز نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد

که بین ارقام مورد مطالعه، سطوح شوری و اثر متقابل وارسته در سطوح شوری از لحاظ صفات وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، سدیم و پتاسیم بر حسب درصد ماده خشک اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. نتایج به دست آمده با تحقیقات منصوری و همکاران (Mansuri et al., 2012)، حسام الزمان و همکاران (Hasamuzzaman et al., 2009) و تنویر و همکاران (Tanveer et al., 2009) همخوانی داشته و عقیده بر این است که صفت مقاومت به شوری در مرحله جوانه‌زنی وراثت‌پذیری بالایی داشته و سطوح متفاوت شوری، بر جوانه‌زنی ارقام مختلف برنج، اثرات متنوعی دارند.

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات مختلف ارقام برنج در مرحله جوانه‌زنی

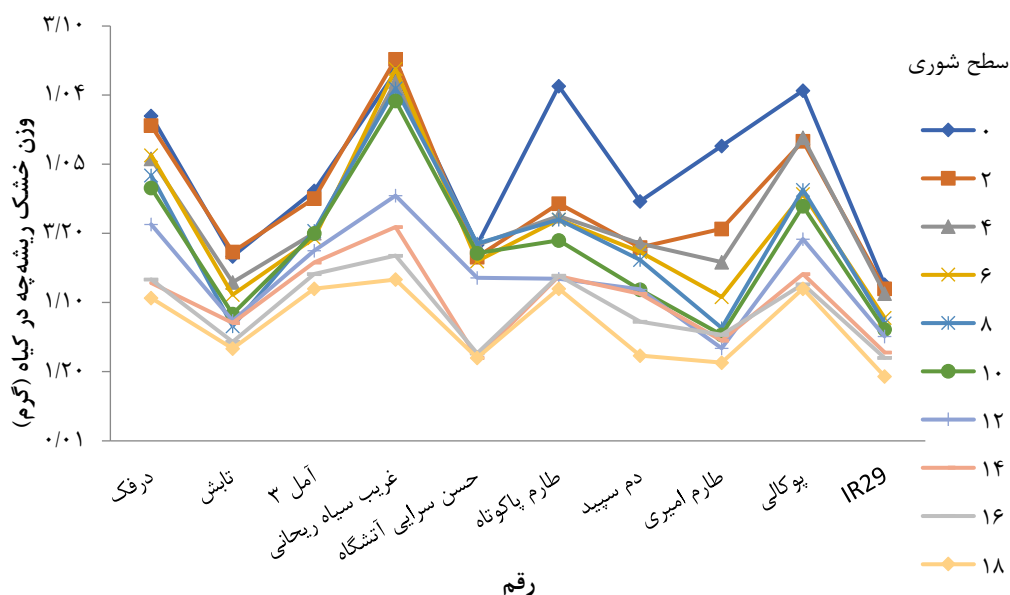
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک ریشه‌چه	وزن خشک ساقه‌چه	سدیم	پتاسیم
تکرار	2	0/001 ^{ns}	0/01 ^{ns}	0/46*	0/001 ^{ns}
وارسته	9	0/05**	1/82**	19/09**	2/87**
شوری	9	0/04**	1/77**	175/24**	7/53**
وارسته × شوری	81	0/001**	0/05**	1/22**	0/16**
خطا	198	0/001	0/005	0/13	0/003
ضریب تغییرات	-	6/74	8/71	9/26	1/61

ns، * و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

در این آزمایش با وجود اینکه افزایش تنش شوری باعث کاهش وزن خشک ریشه‌چه شد، رقم غریب سیاه ریحانی در اکثر سطوح شوری نسبت به سایر ارقام واجد بیشترین وزن خشک ریشه‌چه بوده است. درحالی‌که رقم IR29 به‌عنوان شاهد حساس برخلاف رقم فوق حداقل وزن خشک ریشه‌چه را داشت. در بالاترین سطح از شوری (۱۸ دسی زیمنس بر متر) ارقام غریب سیاه ریحانی، طارم پا کوتاه و پوکالی بیشترین وزن خشک ریشه‌چه را نشان دادند (شکل ۱). در نتیجه‌ای مشابه، عالم‌گیر و همکاران (Alamgir et al., 2007) بیان نمودند که بین ارقام مورد مطالعه از لحاظ وزن خشک ریشه‌چه اختلاف معنی‌دار وجود دارد. ارقامی که الگوی تسهیم مجدد مواد ذخیره‌ای در دانه را بتوانند در راستای تولید ریشه‌طویل‌تر و کارآمدتر سوق دهند، می‌توانند از تحمل به شوری بیشتری برخوردار باشند. بنابراین ارقامی که در شرایط آزمایشگاه، ریشه‌های طویل‌تر و با وزن بیشتری تولید نمایند، احتمالاً در مرحله جوانه‌زنی نیز تحمل به شوری بیشتری خواهند داشت (Mohamadi et al., 2018).

بر اساس نتیجه آزمایش، وزن خشک ساقه‌چه در کلیه ارقام مورد بررسی در اثر افزایش میزان شوری کاهش نشان داد (شکل ۲). از نظر وزن خشک ساقه‌چه نیز همانند وزن خشک ریشه‌چه رقم غریب سیاه ریحانی نسبت به سایر ارقام مورد بررسی در اکثر سطوح شوری مورد مطالعه بالاترین مقادیر را به خود اختصاص داده بود. میزان وزن خشک ساقه‌چه در تمام ارقام مورد مطالعه نسبت به IR29 بیشتر بود (شکل ۲). طبق نظر قلیزاده و همکاران (Golizadeh et al., 2013) علت کاهش وزن گیاهچه برنج در شرایط شوری را مرتبط با کاهش سطح برگ گیاه است. به‌طوری‌که گادفری و همکاران (Godfrey et al., 2004) نیز

اظهار داشتند که رشد و توسعه گیاهان زراعی به ویژه برنج در محیط شور به دلیل ایجاد اختلال در فرآیندهای متابولیکی، بازدارنده می شود که در نهایت منجر به کاهش تولید کل وزن خشک گیاهچه می گردد.

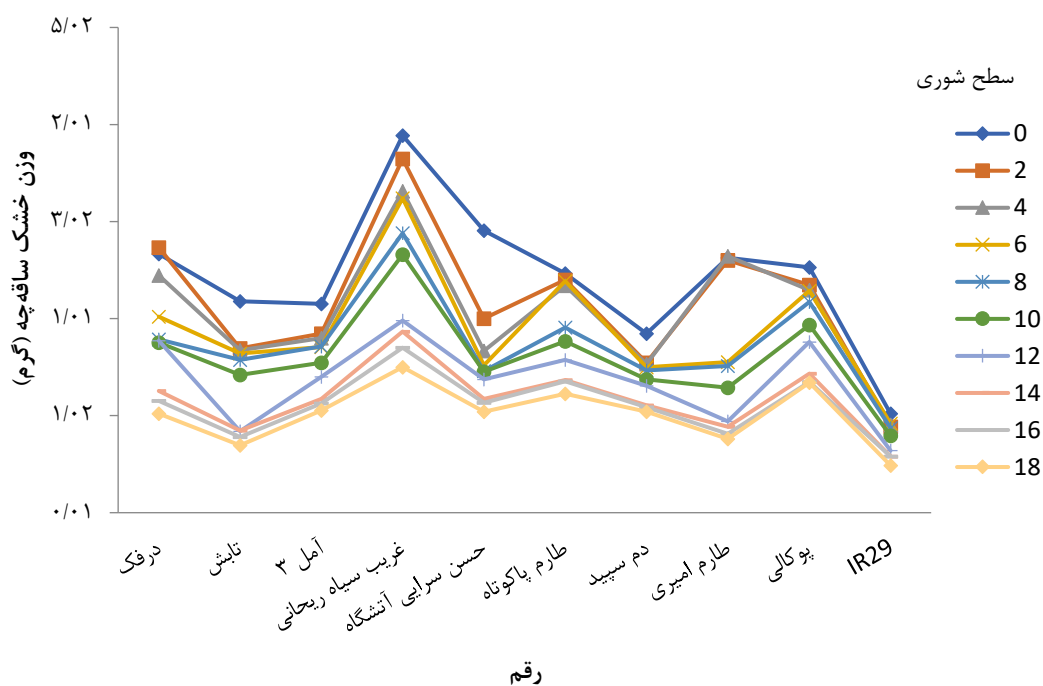


شکل ۱: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ وزن خشک ریشه چه در گیاه در مرحله جوانه زنی

بررسی میزان یون سدیم و پتاسیم در ارقام مختلف برنج تحت تنش شوری

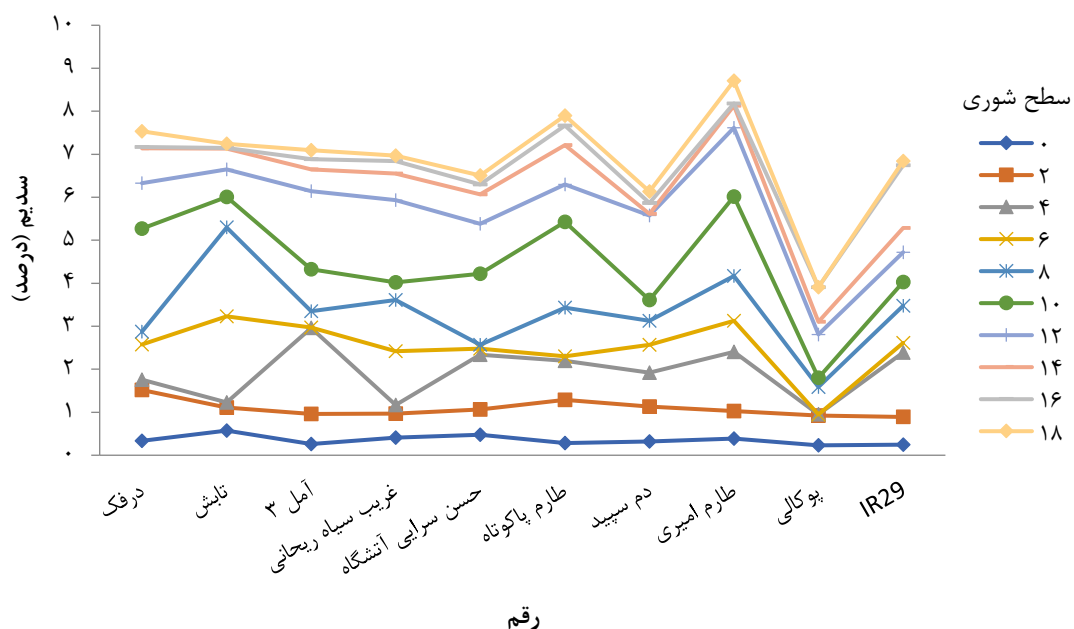
افزایش سطح شوری باعث افزایش تجمع یون سدیم در بافت ارقام مورد بررسی شد (شکل ۳). از لحاظ مقدار سدیم بر حسب درصد ماده خشک، رقم طارم امیری و بعد از آن طارم پاکوتاه نسبت به سایر ارقام بیشترین مقدار را داشتند. در حالی که رقم پوکالی در تمام سطوح شوری مورد بررسی حداقل مقدار سدیم را در مقایسه با سایر ارقام داشت (شکل ۳). در مطالعه فرهمندفر و همکاران (Farahmandfar *et al.*, 2009) نیز مشاهده شد که بین ارقام مورد مطالعه از لحاظ غلظت یون Na^+ اختلاف معنی دار وجود دارد. با افزایش شوری مقدار یون سدیم جذب شده به ازای واحد سطح برگ در ارقام مختلف برنج افزایش می یابد و شیب افزایش آن در ارقام متحمل کندتر از ارقام حساس است به عبارت دیگر ارقام متحمل به کمک سازوکارهای اختصاصی، ورود یون سدیم را به درون بافت گیاهی کندتر می کنند (Golizadeh *et al.*, 2013). تنش شوری ممکن است به علت رقابت شدید Na^+ و Cl^- با Ca^{2+} ، K^+ و NO_3^- باعث عدم تعادل یونی شود. به طور کلی، غلظت بالای NaCl باعث افزایش Na و Cl می شود در حالی که N ، P ، K ، Ca ، Mg کاهش یافته و نسبت های $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ، Na^+/K^+ و $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ و $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ و در نتیجه سمیت یونی (Na^+ و Cl^-) در گیاهان افزایش می یابد (Hussain *et al.*, 2017). در گونه های محتمل به تنش شوری، یون Na^+ در ریشه انباشته شده و اگر به ساقه گیاه انتقال یابد، به دنبال مکانیزم حذف مجدد به طرف ریشه بر می گردد تا از بروز سمیت این یون در اندام هوایی خود جلوگیری به عمل آورد. تحقیقات گذشته نشان دادند که تحت تنش شوری، سرعت انتقال پایین یون Na^+ در

ژنوتیپ‌های محتمل، به خاطر سیستم جذب ریشه بوده که جذب و انتقال نمک را کنترل نموده و اصولاً در ریشه‌ها، جریان یون‌ها به‌ویژه یون Na^+ رو به بیرون و در فضای بیرونی آن‌ها می‌باشند (Orooj & Ashraf, 2006).

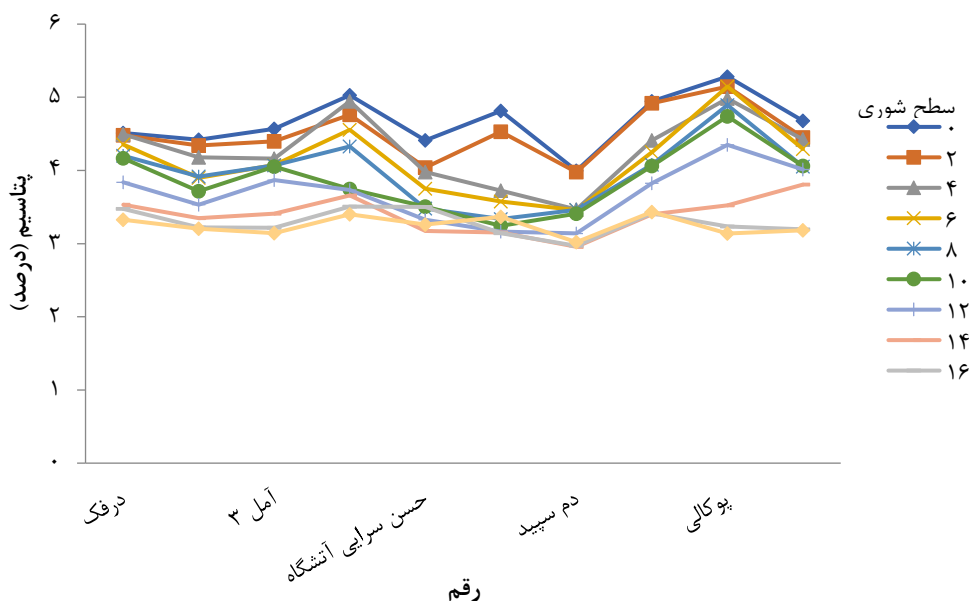


شکل ۲: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ وزن خشک ساقه‌چه در مرحله جوانه‌زنی

با افزایش میزان شوری محتوای پتاسیم بر حسب درصد ماده خشک همه ارقام کاهش نشان داد (شکل ۴)؛ اما این کاهش در ارقام پوکالی و غریب سیاه ریحانی نسبت به بقیه کمتر بود و از محتوای پتاسیم بیشتری در تمام سطوح شوری برخوردار بودند و رقم دم سپید کمترین مقدار پتاسیم را در اکثر سطوح شوری داشت (شکل ۴). در شرایط تنش شوری، نسبت یون K^+ به یون Na^+ در گیاه کاهش می‌یابد (Chunthaburee *et al.*, 2016)؛ زیرا در چنین شرایطی یون Na^+ از جذب یون K^+ ، توسط ریشه جلوگیری می‌نماید (Taban, 2000). مشابه با این آزمایش، فرهمندفر و همکاران (Farahmandfar *et al.*, 2009) در نتایج تحقیقات خود، بیان نمودند که رقم‌های حساس در اثر عدم توانایی مکانیزم تحمل، یون K^+ را بیشتر در ریشه‌ها ذخیره می‌نمایند در صورتی که ارقام متحمل با استفاده از مکانیزم خاصی، یون K^+ را به ساقه‌ها و اندام هوایی انتقال داده تا بتواند نقش اسمزی را تنظیم نماید. در گیاه برنج نسبت بالای غلظت یون K^+ به یون Na^+ در غلظت‌های بالای نمک یک مزیت است و می‌تواند به‌عنوان معیاری خوب برای انتخاب گیاهان از نظر تحمل به شوری به کار رود (Mirmohammadi & Ghareyazi, 2002).



شکل ۳: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ سدیم در مرحله جوانه‌زنی



شکل ۴: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ پتاسیم در مرحله جوانه‌زنی

بررسی شاخص‌های رشد در ارقام مختلف برنج تحت تنش شوری در شرایط گلخانه‌ای

تجزیه واریانس صفات (جدول ۳) نشان می‌دهد که از لحاظ کلیه صفات مورد بررسی بین تکرارها، ارقام مختلف، سطوح

شوری و اثرات متقابل واریته در سطوح شوری اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. اگرچه در شرایط کنترل،

همه ژنوتیپ‌ها از نظر ارتفاع گیاه مختلف بودند اما این صفت در کلیه ارقام با افزایش تنش، کاهش یافت. در نتیجه‌ای مشابه حسام الزمان و همکاران (Hasamuzzaman *et al.*, 2009) بیان نمودند که صفت ارتفاع گیاه در بین ارقام مختلف تحت سطوح مختلف شوری دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد، لذا عکس العمل متفاوت ارقام را می‌توان به پتانسیل ژنتیکی هر رقم نسبت داد. در نتیجه‌ای مشابه نگوین و نگوین (Nguyen & Nguyen, 2007) گزارش نمودند که بین ارقام مختلف مورد مطالعه در سطوح شوری مختلف از لحاظ صفت تعداد پانیکول بر کپه اختلاف معنی‌دار وجود داشته و افزایش سطوح شوری، موجب کاهش تعداد آن می‌گردد. در طول دوره پر شدن دانه‌ها سه فرآیند فتوسنتز، انتقال مواد تولید شده از فتوسنتز به دانه و رشد دانه به‌طور همزمان به وقوع می‌پیوندند. کاهش ماده خشک دانه‌ها در شرایط تنش شوری ناشی از اختلال در هر یک از این فرآیندها می‌باشد (Biabani *et al.*, 2012). در تحقیقی دیگر، حسام الزمان و همکاران (Hasamuzzaman *et al.*, 2009) تعداد دانه پر کمتر در پانیکول در شوری بالا را به کاهش فعالیت قسمت‌های تولید کننده مواد فتوسنتزی نسبت دادند. از آنجایی که کاهش تعداد گلچه‌های بارور و سرعت پائین‌تر انتقال مواد از ساقه به خوشه‌ها از دلایل وزن پایین خوشه‌ها عنوان شده است، لذا انتقال فرآورده‌های فتوسنتزی از ساقه به دانه، اصلی‌ترین عاملی است که تحت تنش شوری، رشد و توسعه دانه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Biabani *et al.*, 2012). وجود اختلاف معنی‌دار بین ارقام از لحاظ صفت وزن دانه پر در پانیکول نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بین ارقام می‌باشد ولی تنش شوری در مرحله رشد زایشی در فرآیند پر شدن دانه ایجاد اختلال نموده و موجب کاهش دانه‌بندی و پر شدن دانه می‌گردد (Mirmohammadi & Ghareyazi, 2002). مشاهدات زنگ و همکاران (Zeng *et al.*, 2000) نشان داد که با اعمال شوری، کاهش تعداد پانیکول در گیاه و تعداد دانه در پانیکول موجب تغییرات بسیاری در وزن دانه هر گیاه می‌گردد.

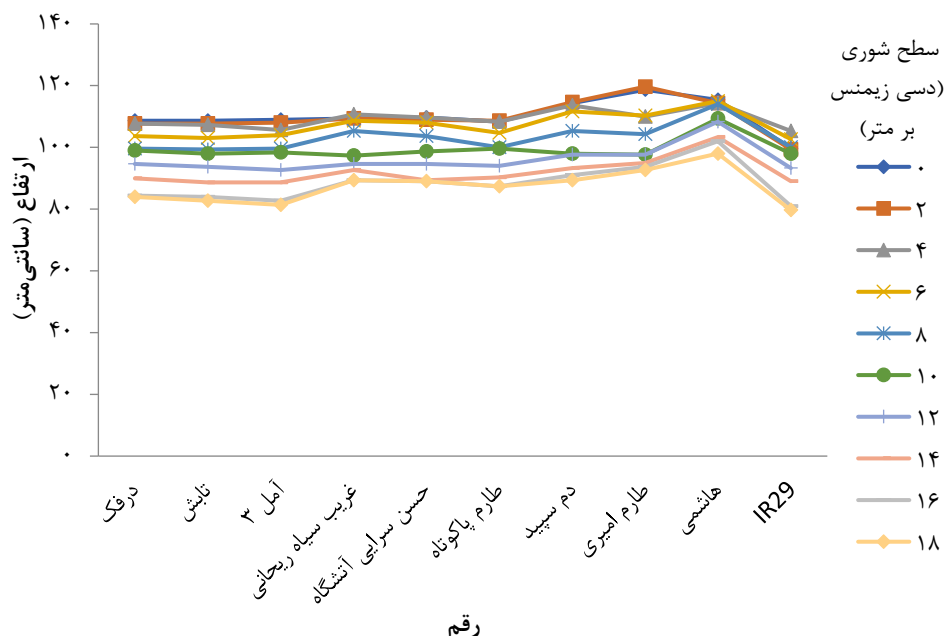
جدول ۳: تجزیه واریانس صفات مختلف ارقام برنج در شرایط اتاقت رشد (گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	تعداد پانیکول	تعداد دانه پر در پانیکول	وزن دانه پر در پانیکول
تکرار	2	22 / 750**	3 / 163**	18 / 963**	0 / 022**
واریته	9	536 / 660**	15 / 261**	27428 / 608**	45 / 456**
شوری	9	2397 / 585**	77 / 224**	14072 / 43**	11 / 011**
واریته × شوری	81	16 / 258**	0 / 571**	308 / 012**	0 / 452**
خطا	198	1 / 117	0 / 106	1 / 179	0 / 003
ضریب تغییرات	-	1 / 054	8 / 916	1 / 494	2 / 841

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد

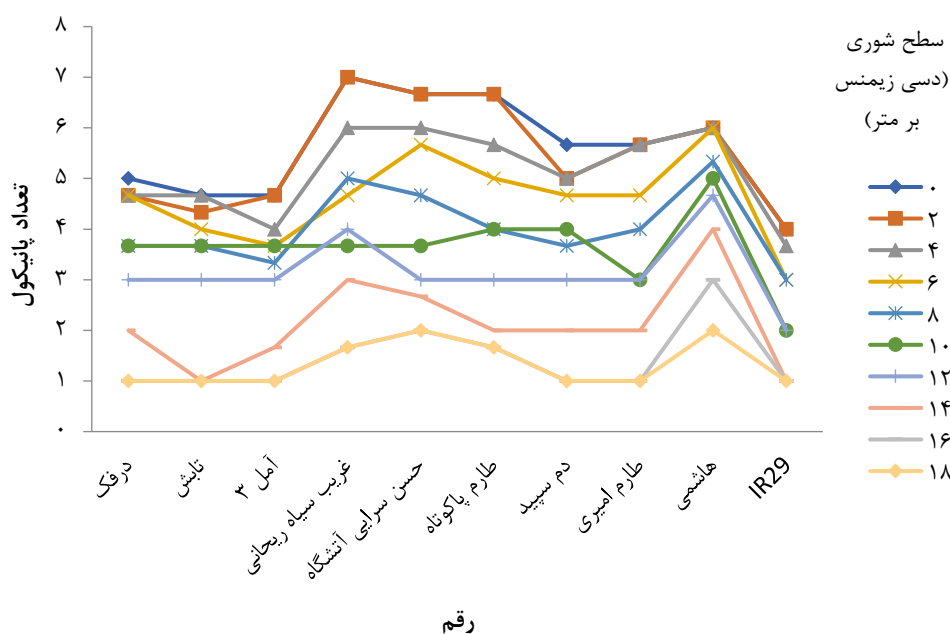
در این آزمایش ارتفاع بوته همه ارقام مورد بررسی در اثر افزایش سطح شوری کاهش یافت و رقم هاشمی نسبت به سایر ارقام با افزایش سطح شوری از کاهش ارتفاع بوته کمتری برخوردار بود و در بالاترین سطح شوری (۱۸ دسی زیمنس بر متر) بیش‌ترین ارتفاع را در بین ارقام داشت (شکل ۵). کوتاه‌ترین ارتفاع به رقم IR29 در تمامی سطوح شوری تعلق داشت (شکل ۵). پژوهش‌های متعدد دیگر نیز کاهش ارتفاع گیاه با افزایش سطوح شوری در مقایسه با کنترل را گزارش نموده‌اند (Abidmahmood & Arifkhan, 2009; Hasamuzzaman *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2007). وقتی غلظت یک یون خاص از

آستانه خود در گیاه فراتر رود، باعث ایجاد حالت سمی در گیاه شده که به مقدار زیادی روی جذب و یا متابولیسم عناصر ضروری در قسمت‌های مختلف گیاهی ایجاد اختلال نموده و موجب کاهش رشد می‌گردد. تحقیقات نشان می‌دهد که اضافه کردن نمک در محیط ریشه با کاهش رشد گیاه رابطه خطی داشته و این کاهش رشد، مستقل از نوع نمک، مربوط به فشار اسمزی می‌باشد (Mirmohammadi & Ghareyazi, 2002).



شکل ۵: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ ارتفاع بوته در شرایط گلخانه‌ای

تعداد پانیکول نیز در همه ارقام با افزایش سطح شوری کاهش یافت و رقم هاشمی در اکثر سطوح شوری دارای تعداد پانیکول بالاتری در مقایسه با سایر ارقام بود، درحالی‌که رقم IR29 در زمره ارقامی بود که کمترین تعداد پانیکول را داشت (شکل ۶). طبق گزارش ناتارجان و همکاران (Natarjan *et al.*, 2005)، شوری بسیاری از فرآیندهای رشد زایشی، از جمله تعداد پانیکول را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش آن می‌گردد. مشابه نتایج این آزمایش، نگوین و نگوین (Nguyen & Nguyen, 2007) نیز، گزارش نمودند که بین تیمارهای شوری از لحاظ صفت تعداد پانیکول، اختلاف معنی‌دار وجود داشته و افزایش غلظت شوری باعث کاهش تعداد پانیکول می‌گردد. در گزارشی دیگر وو و همکاران (Wu *et al.*, 1998) نیز بیان نمودند که تحت شرایط بدون تنش ارتباط بین تراکم گیاه و پنجه‌دهی، تراکم پانیکول را تعیین می‌نماید و مقدار آن تحت تأثیر تراکم گیاهی قرار می‌گیرد، لذا تیمار شوری با محدود نمودن پنجه‌دهی گیاه، تراکم پانیکول را محدود می‌نماید به طوری که کوی و همکاران (Cui *et al.*, 1995) مشاهده نمودند که افزایش شوری، خوشه‌های اولیه و ثانویه تولیدی هر پانیکول را کاهش می‌دهد.

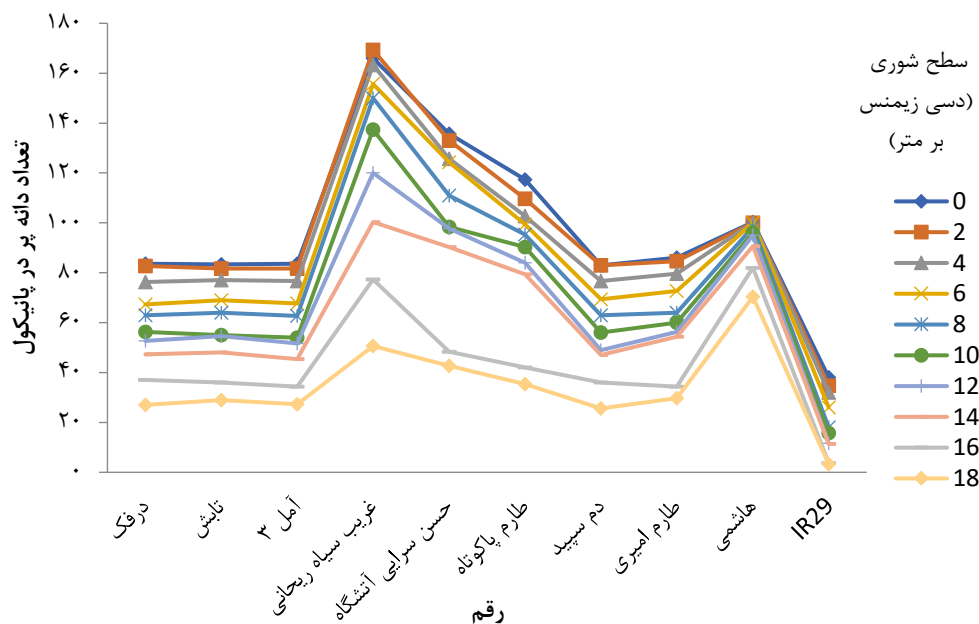


شکل ۶: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ تعداد پانیکول در شرایط گلخانه‌ای

تعداد دانه پر در پانیکول در اثر افزایش سطح شوری در همه ارقام مورد بررسی کاهش یافت و در همه سطوح شوری، ارقام غریب سیاه ریحانی و IR29 به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد دانه پر در پانیکول را داشتند (شکل ۷). مطابق با نتایج این آزمایش، بیابانی و همکاران (Biabani *et al.*, 2012) هم گزارش نمودند که ارقام مورد مطالعه از لحاظ صفت تعداد دانه پر در پانیکول دارای اختلاف معنی‌دار هستند. براساس گزارش قبادیان (Ghobadian, 1984)، شوری از طریق کاهش قابلیت زنده ماندن گرده‌ها، تعداد دانه پانیکول را کاهش می‌دهد، لذا می‌توان گفت که قابلیت زنده ماندن دانه‌های گرده در گرده‌افشانی و تلقیح، زمینه را برای تشکیل دانه و در ادامه، پر شدن آن فراهم می‌نماید. اثر تنش شوری بر روی هر یک از مراحل فوق موجب اختلال در فرآیند تشکیل و پر شدن دانه می‌گردد.

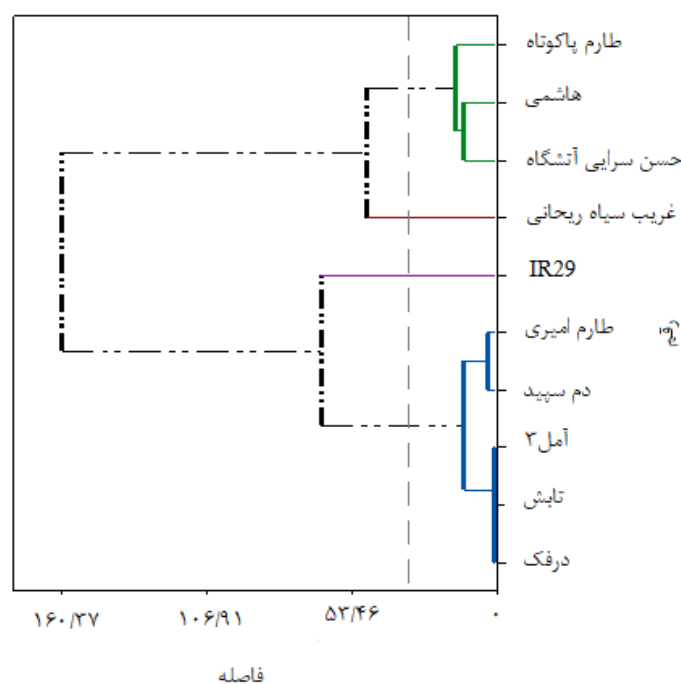
صفت وزن دانه پر در پانیکول نیز تحت تأثیر افزایش سطح شوری در همه ارقام مورد بررسی کاهش یافت و در همه سطوح شوری، ارقام غریب سیاه ریحانی و IR29 از لحاظ این صفت نیز به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر را در بین ارقام داشتند (شکل ۸). پر شدن دانه‌ها در پانیکول به توانایی انتقال مواد فتوسنتزی تولیدی از مبدا به مقصد بستگی دارد. در شرایط طبیعی، بارگیری مواد فتوسنتزی در مبدا و تخلیه آن در مقصد (دانه‌ها) با ایجاد اختلاف پتانسیل اسمزی، موجب ایجاد شیب فشار هیدرو استاتیکی بین مقصد و مبدا و حرکت توده‌ای آب و مواد فتوسنتزی به مقصد می‌گردد (Franklin *et al.*, 2003). واکنش به تنش شوری شامل تغییرات فیزیولوژیکی مانند بسته شدن روزنه‌ها بوده که با ایجاد اختلال در فرآیند حیاتی گیاه در دوره پر شدن دانه، معادله جذب، انتقال، تبدیل و ذخیره را به هم زده که در نهایت وزن دانه تحت تأثیر قرار می‌گیرد و هر قدر

شدت تنش بیشتر باشد به همان میزان وزن دانه را کاهش خواهد داد (Bonhert & Jensen, 1996)، لذا نتیجه آزمایش را می توان به موارد فوق نسبت داد.



شکل ۷: اثر متقابل شوری و ارقام مختلف برنج از لحاظ تعداد دانه پر در پانیکول در شرایط گلخانه‌ای

بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای ارقام مورد بررسی در چهار دسته گروه‌بندی شدند (شکل ۹) که ارقام طارم پا کوتاه، هاشمی و حسن سرایی آتشیگاه در گروه اول، غریب سیاه ریحانی در گروه دوم، IR29 در گروه سوم و طارم امیری، دم سپید، آمل ۳، تابش و درفک در گروه چهارم قرار گرفتند. دسته‌بندی ارقام در یک گروه بیانگر شباهت بیشتر آن‌ها از نظر صفات مورد نظر می‌باشد. به طوری که در گروه دوم رقم متحمل غریب سیاه ریحانی و در گروه سوم رقم حساس IR29 جای گرفت.



شکل ۹: نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه صفات اندازه‌گیری شده در گلخانه در ۱۰ رقم برنج مورد بررسی به روش وارد

نتیجه‌گیری کلی

تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی، موجب کاهش وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و همچنین کاهش مقدار پتاسیم و افزایش مقدار سدیم در گیاه شد. تنش شوری در مرحله رشد زایشی در شرایط گلخانه‌ای موجب کاهش ارتفاع بوته، تعداد پانیکول، تعداد دانه پر در پانیکول و وزن دانه پر در پانیکول گردید. رقم غریب سیاه ریحانی در مرحله جوانه‌زنی دارای وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و همچنین درصد پتاسیم بالا و درصد سدیم پایین نسبت به بقیه بود. علاوه بر این، این رقم در مرحله آزمایش گلخانه‌ای دارای بیشترین تعداد و وزن دانه پر در پانیکول بوده و از نظر ارتفاع بوته و تعداد پانیکول نیز نسبتاً وضعیت مطلوبی داشت. بر اساس تجزیه خوشه‌ای نیز، این رقم از نظر ژنتیکی با سایر ارقام متفاوت بود و در گروهی مجزا قرار گرفت؛ بنابراین می‌توان رقم غریب سیاه ریحانی را به‌عنوان یک رقم و منبع ژنتیکی متحمل به شوری جهت استفاده در برنامه‌های به نژادی توصیه نمود.

منابع

- Abidm Mahmood, T.L. and Arifkhan, M. (2009) Effect of salinity on growth, yield and yield components in basmati rice germplasm. *Pakistan Journal Botany*, 41(6): 3035-3045.
- Aishashereen, S., Mumtaz, S., Raza, M.A. Khan and Solangi, S. (2005) Salinity effects on seedling growth and yield components of different inbred rice lines. *Pakistan Journal of Botany*, 37(1): 131-139

- Akita, S. and Cabuslay, G.S. (1990) Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars. *Journal of Plant and Soil*, 123: 227-294.
- Alamgir, A.N.M., Mohammad, M. and Mohammad, Y.A. (2007) Some aspects of mechanism of NaCl stress tolerance in the seedling of four rice genotypes. *Bangladesh Journal Botany*, 36(2): 181-184.
- Awasthi, P., Karki, H., Vibhuti, Bargali, K. and Bargali, S.S. (2016) Germination and Seedling Growth of Pulse Crop (*Vigna* sp.) as affected by Soil Salt Stress. *Current Agriculture Research Journal*, 4(1): 159-170.
- Bargali, K. and Bargali, S.S. (2016) Germination capacity of seeds of leguminous plants under water deficit conditions: implication for restoration of degraded lands in Kumaun Himalaya. *Tropical Ecology*, 57 (3): 445-444.
- Biabani, A., Sabouri, H. and Nakhzari Moghaddam, A. (2012) Study of yield components of rice cultivars under salinity stress condition. *Journal of Plant Production*, 19(4): 173-186.
- Bonhert, H.J. and Jensen, R.G. (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance the next step. *Australia Journal of Plant Physiology*, 2(3): 661-667.
- Chunthaburee, S., Dongsansuk, A., Sanitchon, J., Pattanagul, W., and Theerakulpisut, P. (2016) Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 467-477.
- Cui, H., Takeoka, Y. and Wada, T. (1995) Effect of sodium chloride on the panicle and spikelet morphogenesis in rice. *Japanese Journal of Crop Science*, 64(3):593-600.
- Farahmandfar, A., Poustini, K., Fallah, A., Tavakol Afshari, R. and Moradi, F. (2009) Study the effect salinity stress on the germination and seedling growth some of genotypes and iranian rice cultivars. *Journal of Crop Sciences*, 40(3): 71-94.
- Franklin, P., Gardner, R.B., Pearce, and Mitchell, R.L. (2003) *Physiology of Crop Plants*. Scientific Publishers, 327 Pp. India.
- Ghobadian, A. (1984) *Pedology of arid and semi arid zones*. 530 Pp. Publications of Amidi, Tabriz, Iran.
- Gholizadeh, F., Navabpour, S., Sabouri, H. And Ramezanpour S. (2013) Effect of salinity stress on morphophysiological indices of rice genotypes under hydroponic conditions in seedling growth stage. *Journal of Crop Production Research*, 5(1): 79-92.
- Godfrey, W.N., Onyango, J.C. and Beck, E. (2004) *Crop physiology and metabolism*. *Crop Science*, 44: 797-805.
- Hasamuzzaman, M., Fujita, M., Islam, M.N., Ahamed, K.U. and Nahar, K. (2009) Performance of four irrigated rice varieties under different levels of salinity stress. *International Journal of Integrative Biology*, 6(2): 85-90.
- Homayie, M. (2002) *Plant reaction to salinity*. National congress of irrigation drainage. Tehran. Iran. Pp58.
- Hussain, S., Zhang, J.H., Zhong, C., Zhu, L.F., Cao, X.C., Yu, S.M., Allen B.J., Hu J.J. and Jin, Q.Y. (2017) Effects of salt stress on rice growth, development characteristics, and the regulating ways: A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(11): 2357-2374.
- Islam, M.Z., Baset Mia, M.A. Islam, M.R. and Akter, A. (2007) Effect of different saline levels on growth and yield attributes of mutant rice. *Journal of Soil Nature*, 1(2): 18-22.
- Mansuri, S., Jelodar, N. B. and Nadali, B. (2012) Evaluation of rice genotypes to salt stress in different growth stages via phenotypic and random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker assisted selection. *African Journal of Biotechnology*, 11(39): 9362-9372

- Mer, R.K.P., Pandya, D.H. and Dandey, A.N. (2000) Growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer aritinum* and *Brassica Juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185(4): 209-217.
- Mirmohammadi, S.A.M. and Ghareyazi, B. (2002) *Physiological aspects and breeding for salinity stress in plants*. 274 Pp. Esfahan Industrial University Press, Iran.
- Momayezi, M.R., Zaharah, A.R., Hanafi, M.M. and Mohd Razi, I. (2009) Seed Germination and Proline Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) as Affected by Salt Concentrations. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 32(2): 247–259.
- Moradi, F. and Ismail, A.M. (2007) Response of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging system to salt stress during seedling and reproductive stage in rice. *Annals of Botany*, 99(6): 1161-1173.
- Muthayya, S., Sugimoto, J.D., Montgomery, S. and Maberly, G.F. (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1324(1): 7-14.
- Natarjan, S.K., Ganapathy, M., Nagarajan, R. and Somasundaram, S. (2005) Screening of rice accessions for yield attributes contributing to salinity tolerance in coastal saline soils of Tamil Nadu, South India. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(4): 435-437.
- Nguyen, T.C. and Nguyen, T.L. (2007) Identification of some promising varieties for salinity soil and phosphorous deficient areas in the Mekong Delta. *Journal of Omonrice*, 15: 179-184.
- Orooj, A. and Ashraf, M. (2006) Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum spraque*). *Journal of Arid Environments*, 64(2): 209-220.
- Pons R, Cornejo MJ, Sanz A. (2011) Differential salinity-induced variations in the activity of H⁺-pumps and Na⁺/H⁺ antiporters that are involved in cytoplasm ion homeostasis as a function of genotype and tolerance level in rice cell lines. *Plant physiology and biochemistry*, 49(12):1399-409
- Rajiv, S., Thivendran, P. and Deivannai, S. (2010) Genetic divergence of rice on some morpholoical and physiochemical responses to drought stress. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 33(2): 315 - 328.
- Taban, S. (2000) Effects of salt stress on growth and mineral elements concentrations in shoot and root of maize plant. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 6(2): 119-122.
- Tanveer, U.H., Javaid, A., Shafaqat, N. and Ahmad, A. (2009) Morpho-physiological response of rice (*Oriza sativa* L.) varieties to salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 41(6): 2943-2956.
- Wattana, p. and Maysaya, T. (2008) Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(10): 736-742.
- Wu, G., Wilson, L.T. and McClung, A.M. (1998) Contribution of rice tillers to dry matter accumulation and yield. *Agronomy Journal*, 90(3): 317–323.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Pardo, J.M. (2002) Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*, 30(5): 529–539.
- Yoshida, S. (1981) *Fundamental of Rice Crop Science*. 269 Pp. International Rice Research Institute, Philippines.
- Zeng, L. and Shannon, M.C. (2000) Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop Science*, 40(4): 996-1003.

Effect of salinity stress on rice varieties (*Oryza Sativa* L.) in seedling and reproductive stages under hydroponic culture conditionsF. Saeidzadeh^{1*}, R. Taghizadeh²**Received: 2017.07.25****Accepted: 2019.01.27****Abstract**

To survey the effect of different salinity levels on rice varieties, two separate experiments were carried out at germination and reproductive stages under laboratory and growth chamber conditions, respectively under in a factorial randomized complete block design (first factor 10 salinity levels and second factor 10 rice varieties). According to results, with increasing salinity levels, the dry weight of root and shoot and the amount of potassium in terms of dry matter percentage was decreased and the dry matter content of sodium in organ was increased and at reproductive stage, the plant height, panicle number, number of filled grains in panicles and filled seed weight in panicle were reduced. Cluster analysis, based on the studied traits at the reproductive stage, divided the cultivars into four distinct groups, and Garib siyah reyhani cultivar were isolated in a separate group, that it's possible to recommended as a cultivar and source of salt tolerance for use in breeding program.

Key word: Rice varieties, Salinity, Germination stage, Reproductive stage

1- Lecturer, Department of Agriculture and Plant breeding, Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Agriculture and Plant breeding, Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, Iran

مطالعه تنوع زیستی گونه های گیاهی آوندی در منطقه حفاظت شده بیدوئیه بردسیر کرمان

شیرین شکیب^۱، مجید شریفی تهرانی^{۲*}، زهرا حسن آبادی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

چکیده

منطقه حفاظت شده بیدوئیه بردسیر با مساحت ۱۵۵۳۸۳ هکتار و حداکثر ارتفاع ۲۷۳۴ متر از سطح دریا، در ۴۵ کیلومتری جنوب شرقی کرمان واقع شده است. بررسی فلور این منطقه نشان داد که ۱۲۵ گونه گیاهی، ۱۰۲ جنس و ۳۲ تیره از گیاهان آوندی در این منطقه می‌رویند. مهم‌ترین تیره‌های گیاهی از نظر تعداد گونه در این منطقه عبارتند از: *Salsola* و *Tamarix*، *Euphorbia*، *Nepeta*، *Astragalus* و *Brassicaceae*، *Asteraceae* و مهم‌ترین جنس‌ها، *Salsola* و *Tamarix* می‌باشند. بیشترین گونه‌های گیاهی این منطقه دارای شکل رویشی تروفیت (۴۱ درصد) و همی کریپتوفیت (۲۶ درصد) هستند و عناصر ایران-تورانی (۷۵ درصد) بیشترین گونه‌های حاضر در پوشش گیاهی منطقه را تشکیل می‌دهند. تحلیل چند متغیره داده‌های فلوریستیک وجود سه خوشه از فلورهای محلی را نشان داد که در آن قرابت‌های فلوریستیک مناطق با فواصل جغرافیایی آنها مرتبط می‌باشد.

واژه های کلیدی: بردسیر، بیدوئیه، تنوع زیستی، فلور، کرمان.

مقدمه

فلات پهناور ایران رویشگاه گونه‌های گیاهی متنوع و ارزشمندی است که حاصل از شرایط اقلیمی و بوم‌شناختی متنوع در این منطقه و پیشینه زمین‌شناختی آن می‌باشد. شناخت تنوع گونه‌های گیاهی این پهنه مستلزم مطالعات فلور، اکولوژی و سیستماتیک گیاهی است و نتایج آن به معرفی استعدادهای طبیعی و برنامه‌ریزی صحیح برای حفاظت و بهره‌برداری از گیاهان منجر می‌گردد. استان کرمان (۱۱ درصد مساحت ایران) بخشی از فلات مرکزی است و ارتفاعات آن بخشی از رشته کوه‌های مرکزی ایران محسوب می‌شود که از چین‌خوردگی‌های آتشفشانی آذربایجان شروع و تا بلوچستان امتداد دارند. این رشته کوه‌ها در فلات مرکزی به دفعات توسط حوضه‌های پست داخلی و کویر منقطع شده‌اند. ارتفاعات این منطقه از شمال غربی به جنوب

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده آزاد واحد علوم تحقیقات فارس، مرودشت، شیراز

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* (نویسنده مسئول sharifi-m@sku.ac.ir)

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد شهرپابک

شرقی امتداد داشته و شامل کوه های کوهبنان (دنباله کوه های جندق و بیابانک) هستند. امتداد این کوه ها شمال غربی - جنوب شرقی است و تا کرمان و بیم گسترش یافته اند. همچنین، کوه هایی که به موازات کوه های کوهبنان قرار گرفته و از یزد تا کرمان و چاله جازموریان، امتداد دارند، مرتفع ترین ناهمواری های استان را تشکیل داده و شامل کوه های مدوار، شهر بابک، کوه پنج، چهل تن، لاله زار، هزار، بحرآسمان، جبال بارز و شهسواران می باشند (Dimitrijevic, 1973).

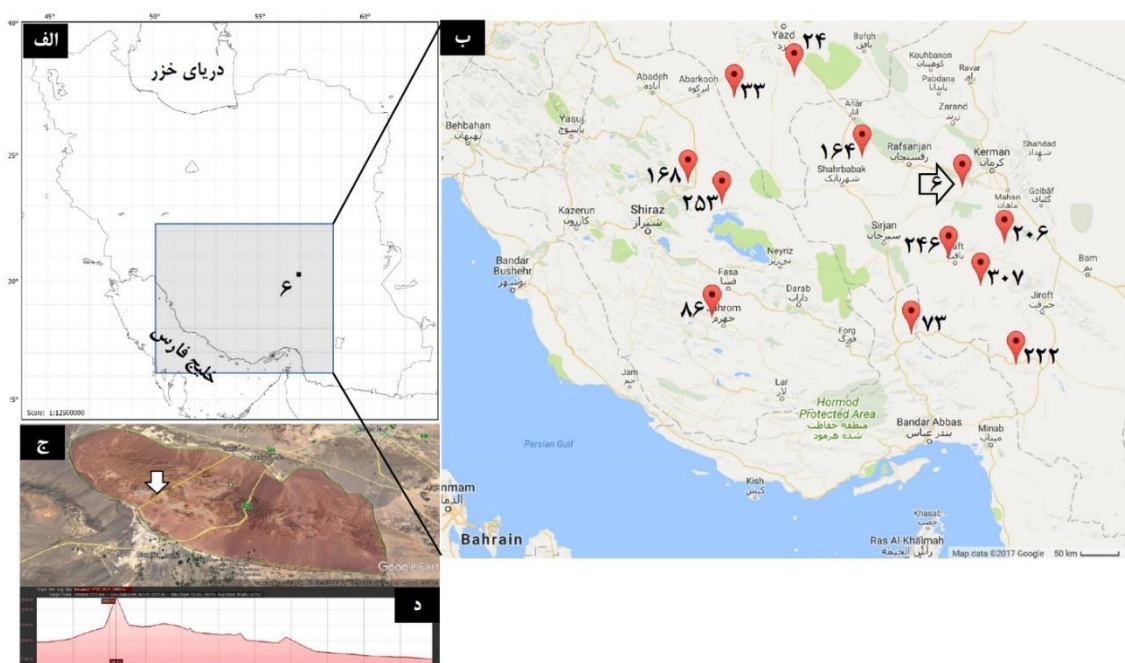
در زمینه معرفی گیاهان با ارزش دارویی و فلور این استان تاکنون مطالعات متعددی صورت گرفته است. معرفی گیاهان دارویی میمند (Ramazannejad-Ghadi & Parishani-Foroushani, 2008)، فلور پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون (Irannejad-Parizi et al., 2001)، فلور ریسه و پاقلعه شهر بابک (Saberi et al., 2013)، فلور آپی کوه هزار (Rajaei et al., 2011)، فلور پناهگاه حیات وحش مهرویه کهنوج (Saber-Amoli et al., 2016)، فلور راس کوه بافت (Malekpourzadeh et al., 2015) و فلور هنزا کوه بهر آسمان جیرفت (Payandeh et al., 2016) به عنوان مثال قابل ذکر هستند. منطقه بردسیر که بیشتر بخش های آن پیش از این مورد مطالعه فلور قرار نگرفته، دارای اقلیم معتدل کوهستانی با زمستان های سرد و تابستان های ملایم همراه با بادهای موسمی و فصلی است. مهم ترین آب های جاری در منطقه، آب بخشا، قریه العرب و ناهونک، و آب های راکد منطقه، دریاچه های ترشاب و حبلی ساز می باشند. بردسیر در منطقه ای جلگه ای قرار گرفته و بلندی هایی در اطراف آن وجود دارد. آب در این منطقه از کاریزها و چاه های ژرف تامین می شود و کشاورزی در آن رونق دارد. قدیمی ترین واحدهای زمین شناسی منطقه مربوط به کرتاسه می باشد که به صورت یک ناودیس تحت عنوان کوه بیدو در منطقه شناخته می شود. تشکیلات کواترنری در این بخش شامل پادگانه ها و مخروط افکنه های کنگلومرای، آبرفت های سخت شده و مخروط های واریزه ای می باشد. خاک این منطقه از تشکیلات آذرین و رسوبی تشکیل شده و عمدتاً فرسایش فیزیکی و مکانیکی به تولید آن کمک نموده است. در بخش هایی که منشا رسوبی دارند مقدار یون های موجود در خاک بالا است که همراه با کمبود بارش سالیانه، پوشش گیاهی را تحت تاثیر قرار داده اند. خاک منطقه در بیشتر نقاط شنی-رسی همراه با سنگریزه و حاصل از فرسایش ارتفاعات است و اکثر گونه های منطقه در چنین خاکی رشد می کنند. سیمای طبیعی پوشش گیاهی منطقه بردسیر بوته زار یا استپ و بخشی از جامعه بزرگ قیج است (Tregobov & Mobayen, 1991; Zohary, 1973). در این پوشش که از شمال مرکزی ایران شروع می شود و به تپه ها و ارتفاعات ایرانشهر و نیک شهر در بلوچستان ختم می شود، گونه غالب *Artemisia sieberi* Besser و *Zygophyllum eurypterum* Boiss. & Buhse است، که بیشتر در سطح تپه های کم شیب با منشا رسوبی به چشم می خورد. بوته کنی، چرای گسترده دام، بارندگی و خاک عوامل موثر در کاهش پوشش گیاهی منطقه هستند.

در سال ۱۳۷۵ بخشی از منطقه بردسیر به وسعت ۱۶۰۰۰۰ هکتار با ارتفاع کمینه ۱۵۲۵ متر از سطح دریا، که از شمال به جوی کبوترخان، از مشرق تا تقاطع باغین- بردسیر، از جنوب به بهرامجرد، از غرب تا سربند کبوترخان و از شرق به باغین در امتداد جوی چاری تا گلومک در امتداد رودخانه بهرامجرد محدود می شود، به عنوان منطقه حفاظت شده بیدویی در

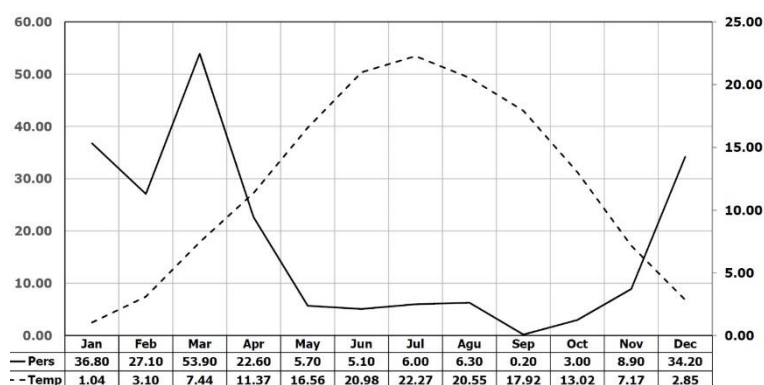
فهرست مناطق تحت مدیریت سازمان حفاظت محیط زیست ایران قرار گرفت. در این تحقیق، فلور منطقه حفاظت شده بیدوئیه بردسیر، به منظور تعیین تنوع گونه های گیاهی منطقه و معرفی گونه های دارای اهمیت دارویی، مرتعی، سمی و نیز پراکنش جغرافیایی و فرم رویشی گونه ها، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

منطقه حفاظت شده بیدوئیه بردسیر در ۱۰ کیلومتری شمال شهرستان بردسیر و ۷۰ کیلومتری شمال غربی کرمان بین مختصات جغرافیایی N 30.288, E 56.288 و N 29.878, E 56.985 قرار دارد (شکل ۱). بلندترین بخش منطقه کوه کله گاوی با ۲۷۴۲ متر ارتفاع و پوشش گیاهی منطقه بیشتر از گونه های مقاوم به شوری و خشکی تشکیل شده که زیستگاه گونه هایی از گرگ، کفتار، شغال، روباه شنی و برخی پستانداران علف خوار مانند قوچ، میش، کل و بز و آهو است. این منطقه همچنین یکی از زیستگاه های یوزپلنگ آسیایی در ایران محسوب می شود (URL). ماه های خشک سال بر اساس منحنی اومبروترمیک (شکل ۲) از آپریل تا نوامبر ادامه داشته و متوسط میزان بارندگی سالیانه ۲۰۹/۸ میلیمتر و متوسط دمای ماهیانه حداقل ۱/۰۴ و حداکثر ۲۲/۲۷ درجه سانتیگراد است.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه. الف: موقعیت منطقه مورد مطالعه (شماره ۶) در نقشه ایران نشان داده شده است، ب: موقعیت جغرافیایی فلورهای محلی همجوار در اطراف منطقه مورد مطالعه (اعداد روی نقشه معرف شماره شناسه هر فلور محلی در بانک اطلاعاتی iHerbs می باشد و اسامی فلورها در شکل ۷، الف آورده شده است)، ج: نقشه هوایی منطقه، د: پروفایل ارتفاع منطقه شامل ترانسکت عرضی که از بلندترین نقطه (۲۶۹۰ متر، پیکان سفید رنگ) عبور می کند.



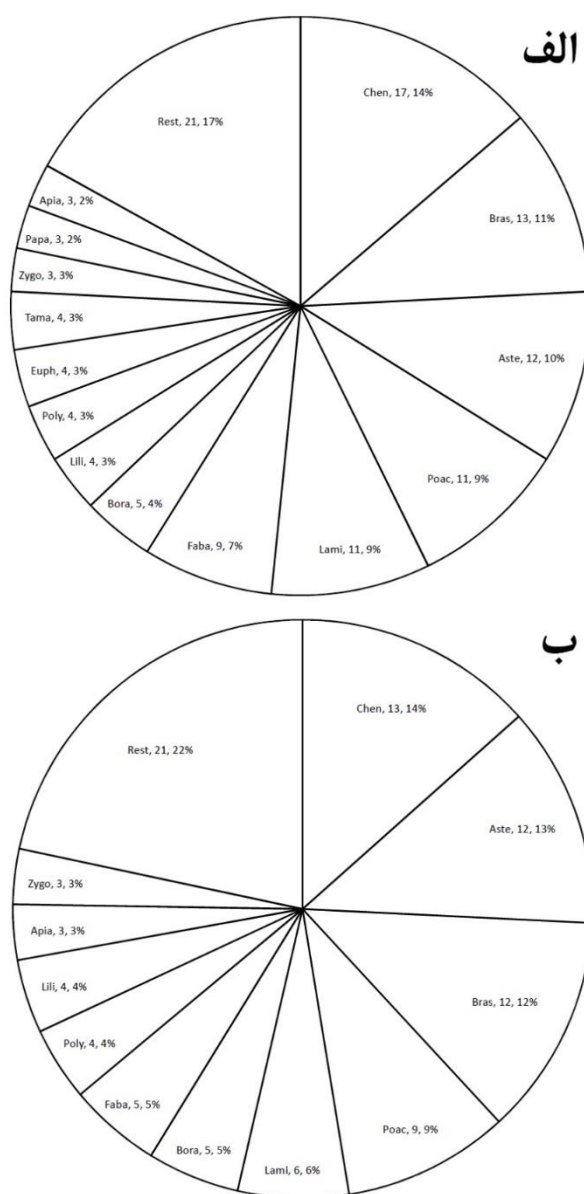
شکل ۲: منحنی اومبروترمیک داده های دما و بارندگی ایستگاه سینوپتیک لاله زار کرمان (۲۰۰۳-۲۰۱۰). محور عمودی راست: دما بر حسب درجه سانتیگراد، محور عمودی چپ: بارندگی بر حسب میلیمتر.

جمع آوری نمونه های گیاهی طی فصل های رویش در سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ صورت گرفت و برای شناسایی علمی نمونه ها از کلیدهای شناسایی موجود در فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1963-2010)، فلور ایران (Assadi, 1989-2012) و رستنی های ایران (Mobayen, 1975) استفاده گردید. فهرست اسامی علمی گونه های گیاهی بصورت فایل متنی به مرکز داده های فلوریستیک (Sharifi-Tehrani & Rahiminejad, 2013) وارد و توسط نرم افزار CheckName (Sharifi-Tehrani, 2014) تصحیح و به جداول اصلی مرکز داده افزوده شدند. سپس تحلیل فلوریستیک داده ها و مقایسه با فلورهای محلی همجوار صورت گرفت. تحلیل چند متغیره داده های فلوریستیک با تشکیل ماتریس حضور و غیاب گونه ها در فلورهای همجوار (۱۴۶۵ گونه \times ۱۲ فلور محلی) و استفاده از تحلیل خوشه ای با ضریب $S_{Dice} = 2a / (2a + b + c)$ در نرم افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2000) و SplitsTree (Huson & Bryant, 2006) صورت گرفت.

نتایج و بحث

فلور منطقه حفاظت شده بیدوییّه بردسیر شامل ۱۲۴ گونه گیاهی است که در ۱۰۲ جنس و ۳۲ خانواده طبقه بندی می شوند (جدول ۱). مهمترین خانواده های گیاهی این منطقه بر اساس غنای گونه ای و تعداد جنس (جدول ۱ و شکل ۳، الف و ب) عبارتند از: Chenopodiaceae (۱۷ گونه، ۱۳/۷ درصد از فلور)، Brassicaceae (۱۳ گونه، ۱۰/۴ درصد)، Asteraceae (۱۲ گونه، ۹/۶ درصد)، Poaceae و Lamiaceae (هریک با ۱۱ گونه، ۸/۸ درصد). نسبت تعداد گونه به خانواده در این فلور ۳/۸۷ و نسبت تعداد گونه به خانواده ۳/۱۸ و نسبت تعداد گونه به جنس ۱/۲۱ است که نشان دهنده غنای گونه ای کم جنس های گیاهی این منطقه، تحت تاثیر شرایط محیطی سخت است. مهم ترین جنس های گیاهی در این فلور عبارتند از: *Astragalus* L. و *Nepeta* L. (هریک با ۵ گونه، ۴ درصد) و *Euphorbia* L. و *Tamarix* L. و *Salsola* L. (هریک با ۳ گونه، ۲/۴ درصد). فرم های رویشی تروفیت (۴۱ درصد) و همی کریپتوفیت (۲۶ درصد) فرم های غالب در پوشش گیاهی این منطقه هستند که با شرایط

اقلیمی، خاکی و بارش سالیانه در این منطقه سازش زیاد دارند. گونه‌های ناحیه رویشی ایران-تورانی ۷۵ درصد از این فلور را تشکیل می‌دهند (۸۳ گونه، جدول ۱) که ۳۰ گونه از آن (۲۴ درصد فلور) را گونه‌های انحصاری ایران (شامل ۱۱ گونه دارویی از مجموع ۵۳ گونه با ارزش دارویی در این فلور) تشکیل می‌دهند.

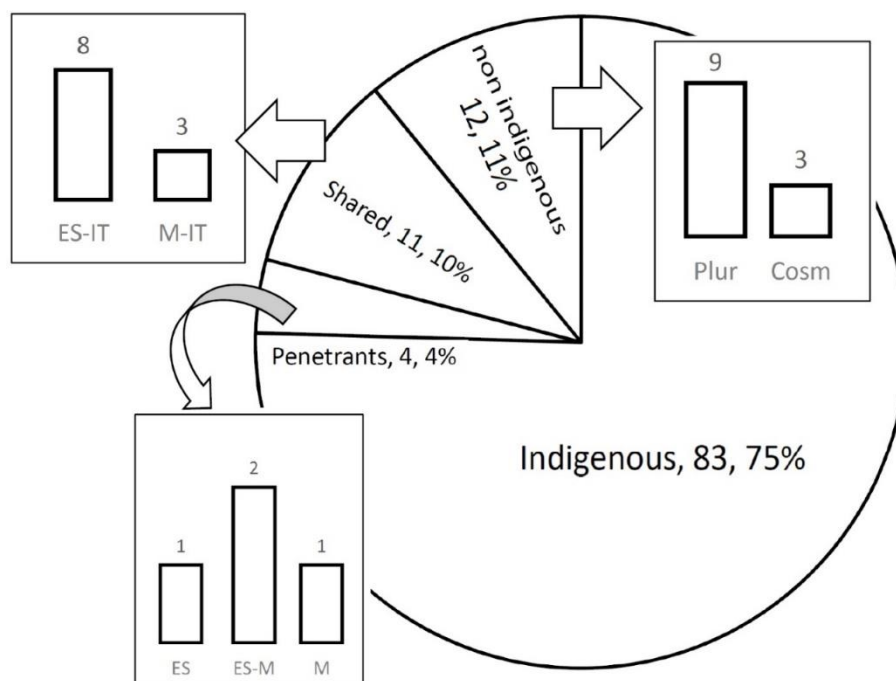


شکل ۳: مهم ترین خانواده های منطقه بیدوئیة بردسیر براساس تعداد گونه (الف) و جنس (ب).

Chen: Chenopodiaceae, Aste: Asteraceae, Bras: Brassicaceae, Poac: Poaceae, Lami: Lamiaceae, Bora: Boraginaceae, Faba: Fabaceae, Poly: Polygonaceae, Lili: Liliaceae, Apia: Apiaceae, Zygo: Zygophyllaceae, Rest: all other plant families.

وجود ۱۳ (۱۱ درصد) گونه درختی و درختچه‌ای در این فلور (جدول ۱)، اهمیت بیشتر این فلور و سازگاری عناصر پوشش گیاهی با شرایط محیطی را نشان می‌دهد. ۱۰ درصد از گونه‌های گیاهی این فلور (۱۱ گونه) عناصر مشترک بین نواحی رویشی تورانی و نواحی رویشی همجوار (مدیترانه ای یا اوروسیبری) و ۱۱ درصد از گونه‌ها (۱۲ گونه) عناصر جهان وطنی یا

چند ناحیه ای هستند (شکل ۴). چهار گونه (۴ درصد) عناصر نفوذی از نواحی رویشی مجاور به فلور ایران هستند. بدین ترتیب ۷۵ درصد از گونه های این فلور بومی ناحیه رویشی تورانی هستند که در بین آنها ۵ گونه نادر (علامت ستاره در جدول ۱) وجود دارد.



شکل ۴: تعداد و درصد کوروتیپ ها در فلور منطقه بیدوئیه بردسیر. ES: اوروسیبری، IT: ایرانوتورانی، M: مدیترانه ای، Plur: چند ناحیه ای، Cosm: جهان وطنی، Shared: عناصر مشترک، Penetrant: عناصر نفوذی از نواحی مجاور، Indigenous: بومزاد.

جدول ۱: اسامی علمی، کوروتیپ و شکل زیستی گونه های گیاهی شناسایی شده در منطقه بیدوئیه بردسیر کرمان. IT: ایرانوتورانی، M: مدیترانه ای، ES: اوروسیبری، SS: صحرا سندی، Plur: چند ناحیه ای، Cosm: جهان وطنی، Cr: کریپتوفیت، Th: تروفیت، He: همی کریپتوفیت، Ph: فانروفیت، Med: دارویی، End: بومزاد، *: نادر.

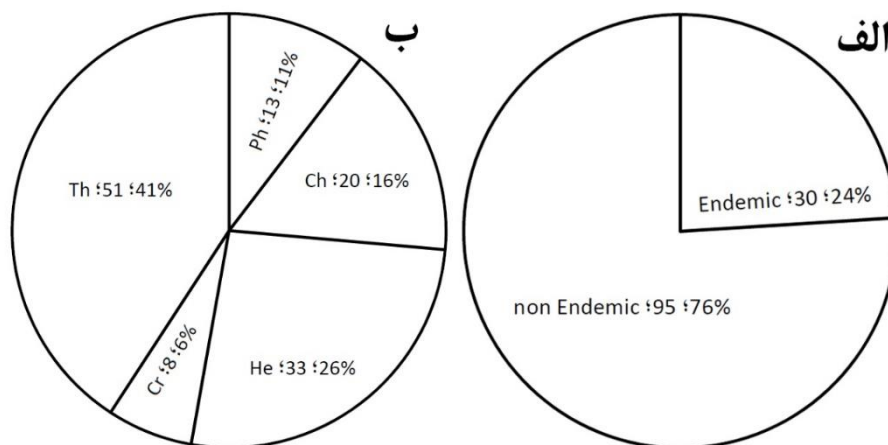
آرایه	کوروتیپ	شکل زیستی	اهمیت
Magnoliophyta			
Liliopsida			
Juncaceae			
<i>Juncus articulatus</i> L.	IT, SS	Cr	
Liliaceae			
<i>Allium stamineum</i> Boiss.	M	Cr	Med
<i>Eremurus persicus</i> Boiss.	IT	Cr	Med
<i>Gagea stipitata</i> Merckl. ex Bunge	IT	Cr	
<i>Tulipa biflora</i> Pall.	ES, IT	Th	
Poaceae (Gramineae)			
<i>Bromus danthoniae</i> Trin. ex C.A.Mey.	IT	Th	
<i>Bromus tectorum</i> L.	Plur	Th	
<i>Cymbopogon parkeri</i> Stapf	IT	He	Med
<i>Eremopyrum distans</i> (K.Koch) Nevski	ES, IT	Th	
<i>Koeleria tenuissima</i> Galanin	Plur	He	

آرایه	کوروتیپ	شکل زیستی	اهمیت
<i>Phalaris minor</i> Retz.	IT	Th	
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Steud.	Cosm	Cr	
<i>Schismus arabicus</i> Nees	M, IT	Th	
<i>Stipa parviflora</i> Desf.	IT	He	
<i>Stipagrostis paradisea</i> (Edgew.) De Winter	IT, SS	He	
<i>Stipagrostis plumosa</i> (L.) Munro ex T. Anderson	IT	He	
Magnoliopsida			
Anacardiaceae			
<i>Pistacia khinjuk</i> Stocks	IT	Ph	Med
Apiaceae (Umbelliferae)			
<i>Daucus carota</i> L.	ES, IT	Cr	Med
<i>Pimpinella canescens</i> Loisel.	IT	Th	Med
<i>Pycnocycla spinosa</i> Decne.	IT	He	End, Med
Asteraceae (Compositae)			
<i>Anthemis gayana</i> Boiss.	IT	Th	End, Med
<i>Artemisia sieberi</i> Besser	ES, IT	Ch	Med
<i>Centaurea ispanica</i> Boiss.	IT	He	End, Med
<i>Crepis pulchra</i> L.	IT	Th	
<i>Echinops ceratophorus</i> Boiss.	IT	He	End, Med
<i>Hertia intermedia</i> (Boiss.) Kuntze	IT	Ch	End, Med
<i>Launaea acanthodes</i> (Rech.f.) Parsa	IT	He	End
<i>Onopordum carmanicum</i> (Bornm.) Bornm.	IT	He	End, Med
<i>Pulicaria gnaphalodes</i> (Vent.) Boiss.	IT	Ch	
<i>Scorzonera tortuosissima</i> Boiss.	IT	He	End, Med
<i>Senecio glaucus</i> L.	IT, SS	Th	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Cosm	Th	Med
Boraginaceae			
<i>Arnebia decumbens</i> Coss. & Kralik	IT	Th	
<i>Heliotropium chorassanicum</i> Bunge	IT	Th	Med
<i>Nonea caspica</i> G.Don	ES, IT	Th	Med
<i>Onosma stenosphon</i> Boiss.	IT	He	End, Med
<i>Paracaryum persicum</i> (Boiss.) Boiss.	IT	He	End, *
Brassicaceae (Cruciferae)			
<i>Alyssum szovitsianum</i> Fisch. & C.A.Mey.	IT	Th	Med
<i>Brassica tournefortii</i> Gouan	Plur	Th	Med
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	Cosm	Th	Med
<i>Descurainia sophia</i> (L.) Webb ex Prantl	ES, M, IT	Th	Med
<i>Eruca sativa</i> Mill.	ES, M, IT	Th	Med
<i>Erysimum crassicaule</i> (Boiss.) Boiss.	IT	Th	End
<i>Erysimum sisymbrioides</i> C.A.Mey.	IT	Th	
<i>Fortunya bungei</i> Boiss.	IT, SS	He	
<i>Isatis rugulosa</i> Bunge	IT	Th	
<i>Malcolmia strigosa</i> Boiss.	IT	Th	
<i>Matthiola flavida</i> Boiss.	IT	He	
<i>Sterigmostemum longistylum</i> (Boiss.) Kuntze	IT	Th	
<i>Torularia torulosa</i> O.E.Schulz	IT	Th	
Capparaceae			
<i>Capparis spinosa</i> L.	IT	Ch	Med
Caryophyllaceae			
<i>Vaccaria liniflora</i> Bornm.	IT	Th	*
Chenopodiaceae			
<i>Anabasis setifera</i> Moq.	IT, SS	He	Med
<i>Atriplex canescens</i> (Pursh) Nutt.	IT	Ch	
<i>Atriplex micrantha</i> Ledeb.	IT	Th	
<i>Chenopodium album</i> L.	Plur	Th	Med
<i>Chenopodium botrys</i> L.	M, IT	Th	
<i>Eurotia ceratoides</i> (L.) C. A. Mey.	IT	Ch	
<i>Girgensohnia oppositiflora</i> (Pall.) Fenzl	IT	Th	

آرایه	کوروتیپ	شکل زیستی	اهمیت
<i>Halanthium rarifolium</i> K. Koch	IT	Th	
<i>Halocharis sulphurea</i> (Moq.) Moq.	IT, SS	Th	
<i>Halothamnus auriculus</i> (Moq.) Botsch.	IT	Ch	End
<i>Haloxylon ammodendron</i> (C.A.Mey.) Bunge ex Fenzl	IT	Ph	
<i>Horaninovia anomala</i> Moq.	IT, SS	Th	End
<i>Londesia eriantha</i> Fisch. & C.A.Mey.	IT	Th	
<i>Salsola arbuscula</i> Pall.	IT	Ch	
<i>Salsola kali</i> L.	IT	Th	Med
<i>Salsola nitraria</i> Pall.	IT, SS	Th	
<i>Seidlitzia florida</i> (M. Bieb.) Boiss.	IT	Th	
Convolvulaceae			
<i>Convolvulus leiocalycinus</i> Boiss.	IT, SS	Ch	End, Med
Dipsacaceae			
<i>Scabiosa flavida</i> Boiss. & Hausskn.	IT	Th	End
<i>Scabiosa kermanensis</i> Bornm.	IT	He	End
Elaeagnaceae			
<i>Elaeagnus angustifolia</i> L.	ES, IT	Ph	Med
Euphorbiaceae			
<i>Andrachne fruticulosa</i> Boiss.	IT	He	End
<i>Euphorbia buhsei</i> Boiss.	IT, SS	He	
<i>Euphorbia connata</i> Boiss.	IT	He	End
<i>Euphorbia densa</i> Schrenk	IT	Th	Med
Fabaceae (Leguminosae)			
<i>Alhagi persarum</i> Boiss. & Buhse	IT	He	Med
<i>Astragalus anisacanthus</i> Boiss.	IT	He	End, *
<i>Astragalus myriacanthus</i> Boiss.	IT	Ch	End
<i>Astragalus oxyglottis</i> Steven ex M.Bieb.	IT	Th	End, *
<i>Astragalus</i> sp.	-	Ch	
<i>Astragalus tribuloides</i> Delile	IT	Th	End
<i>Ebenus stellata</i> Boiss.	IT	Ch	Med
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	IT	He	Med
<i>Sophora alopecuroides</i> L.	IT	Cr	Med
Geraniaceae			
<i>Erodium oxyrhinchum</i> M. Bieb.	IT	Th	Med
<i>Geranium stepporum</i> P.H.Davis	IT	Th	
Lamiaceae (Labiatae)			
<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Plur	He	Med
<i>Nepeta daenensis</i> Boiss.	IT	Th	Med
<i>Nepeta ispanica</i> Boiss.	IT	Th	End, Med
<i>Nepeta macrosiphon</i> Boiss.	IT	He	
<i>Nepeta mirzayanii</i> Rech.f. & Esfand.	IT	He	End
<i>Nepeta saccharata</i> Bunge	IT	Th	
<i>Salvia macrosiphon</i> Boiss.	IT	He	Med
<i>Salvia nemorosa</i> L.	ES	He	Med
<i>Stachys inflata</i> Benth.	ES, IT	He	Med
<i>Teucrium polium</i> L.	M, IT	Ch	Med
<i>Thymus carmanicus</i> Jalas	IT	Ch	End, Med
Orobanchaceae			
<i>Cistanche ridgewayana</i> Aitch. & Hemsl.	IT	Cr	
Papaveraceae			
<i>Glaucium elegans</i> Fisch. & C.A.Mey.	IT	Th	
<i>Glaucium flavum</i> Crantz	ES, M	He	
<i>Papaver decaisnei</i> Hochst. & Steud. ex Elkan	IT, SS	Th	Med
Polygonaceae			
<i>Atraphaxis spinosa</i> L.	ES, IT	Ch	Med
<i>Calligonum stenopterum</i> Bunge ex Boiss.	IT	Ph	End, *
<i>Pteropyrum aucheri</i> Jaub. & Spach	IT	Ph	End
<i>Rumex chalepensis</i> Mill.	ES, M	Th	Med

آرایه	کوروتیپ	شکل زیستی	اهمیت
Primulaceae			
<i>Glaux maritima</i> L.	IT	He	Med
Ranunculaceae			
<i>Clematis orientalis</i> L.	IT	Ph	
Resedaceae			
<i>Ochradenus ochradeni</i> (Boiss.) Abdallah	IT	Ph	End
<i>Reseda aucheri</i> Boiss.	IT, SS	Th	
Rosaceae			
<i>Amygdalus scoparia</i> Spach	IT	Ph	Med
Rutaceae			
<i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forssk.) A. Juss.	IT, SS	He	Med
Salicaceae			
<i>Salix carmanica</i> Bornm. & Bornm.	IT	Ph	End
Scrophulariaceae			
<i>Scrophularia leucoclada</i> Bunge	IT	Ch	
Tamaricaceae			
<i>Reaumuria alternifolia</i> (Labill.) Britten	IT	Ch	
<i>Tamarix androssowii</i> Litv.	IT	Ph	
<i>Tamarix korolkowii</i> Regel & Schmalh. ex Regel	IT	Ph	
<i>Tamarix rosea</i> Bunge	IT	Ph	
Thymelaeaceae			
<i>Dendrostellera lessertii</i> Tiegh.	IT	Ch	Med
Zygophyllaceae			
<i>Peganum harmala</i> L.	ES, M, IT	He	Med
<i>Tribulus terrestris</i> L.	ES, M, IT	Th	Med
<i>Zygophyllum eurypterum</i> Boiss. & Buhse	IT, SS	Ph	
Pinophyta			
Gnetopsida			
Ephedraceae			
<i>Ephedra pachyclada</i> Boiss.	IT	Ch	Med
<i>Ephedra pachyclada</i> Boiss.	IT	Ch	End

۲۴ درصد از گونه های گیاهی این فلور بومی ایران هستند (شکل ۵، الف) که برخی از آنها گونه‌هایی نادر محسوب می‌شوند. به عنوان مثال، مانند *Astragalus anisacanthus* Boiss. در مطالعات فلوربستیکی محلی در سه دهه اخیر تنها یکبار (فلور منطقه فردوس در خراسان جنوبی) گزارش شده‌اند (Bakhshi-Khaniki, 2008). از عناصر درختی مهم منطقه، درختان کسور (*Pistacia khinjuk* Stocks)، درختچه‌های بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach) و درختچه‌های گز (*Tamarix* spp.) که به صورت اجتماعات پراکنده و یا تک تک در نقاط مختلف رویده‌اند، قابل ذکر هستند. گونه درختی کسور (خنجوک) که در ارتفاع کمتری نسبت به بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) می‌روید، در این منطقه بطور طبیعی رویش دارد. بیشترین گونه‌های گیاهی این منطقه دارای شکل رویشی تروفیت (۴۱ درصد) و همی کریپتوفیت (۲۶ درصد) بوده و اشکال رویشی دیگر منطقه شامل کامفیت‌ها (۱۶ درصد) و فانروفیت‌ها (۱۱ درصد) و کریپتوفیت‌ها (۶ درصد) می‌باشند (شکل ۵، ب). گیاهان بالشتکی و دارای فرم رویشی همی کریپتوفیت مانند گونه های *Astragalus* در نقاط مرتفع تر که سازگاری گیاه با وزش بادهای شدید و تحمل وزن برف لازم است، فراوان ترند.

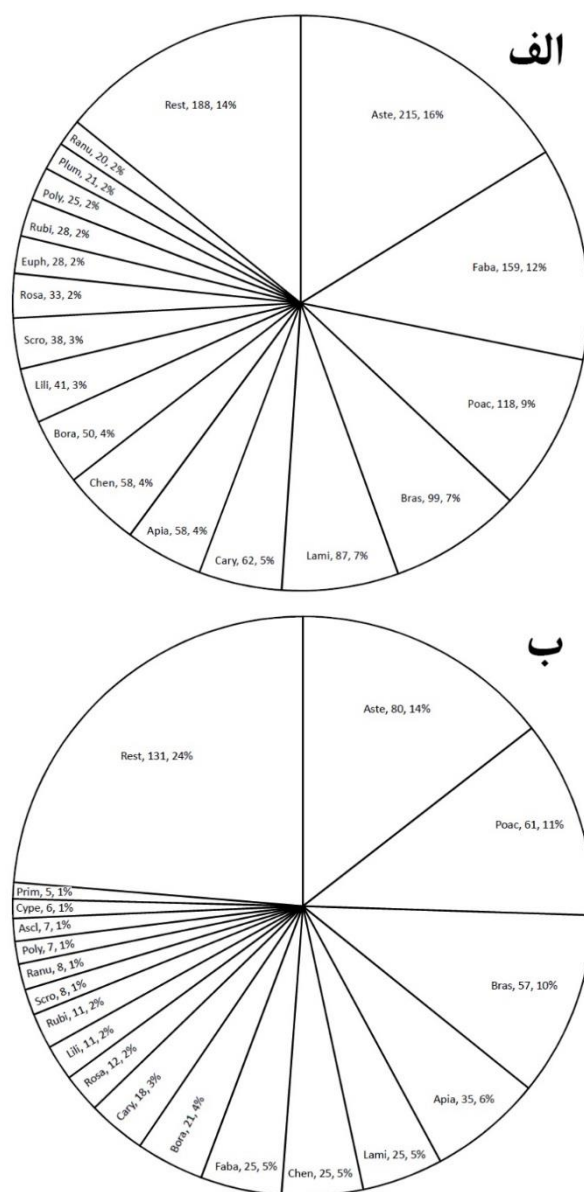


شکل ۵: تعداد و درصد گونه‌های اندمیک (الف)، و اشکال زیستی در منطقه بیدوئیة بردسیر (ب). Th: تروفیت، He: همی کریپتوفیت، Ch: کامفیت، Ph: فانروفیت، Cr: کریپتوفیت، Endemic: بومزاد.

نسبت بالای تروفیت‌ها در منطقه با اقلیم بیابانی و نیمه بیابانی منطقه هماهنگ است و درصد بالای همی کریپتوفیت‌ها حاکی از شرایط سخت محیطی در منطقه است، که این وضعیت با ویژگی‌های اقلیمی منطقه انطباق دارد. حاکم بودن اقلیم سرد و خشک و نیمه خشک با فراوانی تروفیت‌ها و همی کریپتوفیت‌ها مرتبط است (Dolatkhahi *et al.*, 2010; Saberi *et al.*, 2012). بالا بودن درصد تروفیت‌ها در یک منطقه همچنین نشان دهنده طولانی بودن دوره خشکی و بارندگی کم منطقه است. مرادی و همکاران (Moradi *et al.*, 2009) نیز بارش سالیانه اندک و میانگین بالای دمای روزانه و طولانی بودن دوره خشکی در سال را از دلایل فراوانی تروفیت‌ها در فلور یک منطقه دانسته‌اند. وجود اقلیم سرد و کوهستانی نیز اغلب با حضور گسترده همی کریپتوفیت‌ها در فلور یک منطقه همراه است (Asaadi, 2009). فلور بیدوئیة بردسیر با وجود گونه‌های با ارزش دارویی، اندمیک و درختی، در مقایسه با فلور سایر نواحی تحت مدیریت در استان کرمان غنای گونه‌ای کمی دارد. فلور پارک ملی خیر و پناهگاه حیات وحش روچون شامل ۴۵۱ گونه گیاهی (Irannejad-Parizi *et al.*, 2001)، فلور ریسه و پاقلعه شهربابک شامل ۲۰۱ گونه گیاهی (Saberi *et al.*, 2013)، فلور آلیپ کوه هزار شامل ۲۰۷ گونه گیاهی (Rajaei *et al.*, 2011)، فلور پناهگاه حیات وحش مهرویه کهنوج کرمان شامل ۲۷۱ گونه گیاهی (Saber-Amoli *et al.*, 2016)، فلور راس کوه بافت شامل ۲۴۷ گونه (Malekpourzadeh *et al.*, 2015) و فلور هنزا کوه بهرآسمان جیرفت شامل ۳۱۱ گونه گیاهی است (Payandeh *et al.*, 2016).

در فلور هنزا کوه، نسبت تعداد گونه به تیره، جنس به تیره و گونه به جنس، به ترتیب ۵/۳۶، ۳/۴۳ و ۱/۵۶ است. این نسبت‌ها در فلور راس کوه به ترتیب ۴/۷۳، ۳/۳۸ و ۱/۳۹ و در فلور مهرویه کهنوج به ترتیب ۴/۴۶، ۳/۳۵ و ۱/۳۳ و در فلور کوه هزار به ترتیب ۵/۰۲، ۲/۹۷ و ۱/۶۸ و در فلور ریسه و پاقلعه به ترتیب ۵، ۳/۶۷ و ۱/۳۶ و در فلور روچون به ترتیب ۵/۹۷، ۳/۶۷ و ۱/۶۲ است. فلور بیدوئیة بردسیر از نظر تعداد گونه به تیره فقیر و از نظر تعداد جنس به تیره از فلور کوه هزار غنی‌تر است. پایین بودن نسبت تعداد گونه به جنس در همه فلورها نشانی از تنوع یابی کم گونه‌ها در هر جنس تحت شرایط سخت محیطی

است. فلور بیدوئیه بردسیر با سایر فلورهای همجوار خود از نظر فراوانی نسبی گونه‌های تیره *Chenopodiaceae*، تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. مهمترین خانواده‌های گیاهی از نظر تعداد گونه در منطقه بزرگتر شامل فلورهای محلی همجوار، عبارتند از (شکل ۶، الف و ب): *Asteraceae* (۱۴/۶ درصد فلور منطقه)، *Fabaceae* (۱۰/۸ درصد)، *Poaceae* (۸ درصد) و *Brassicaceae* (۶/۷ درصد)، و از نظر تعداد جنس: *Asteraceae* (۱۴/۴ درصد)، *Poaceae* (۱۱ درصد)، *Brassicaceae* (۱۰/۳ درصد) و *Apiaceae* (۶/۳ درصد).



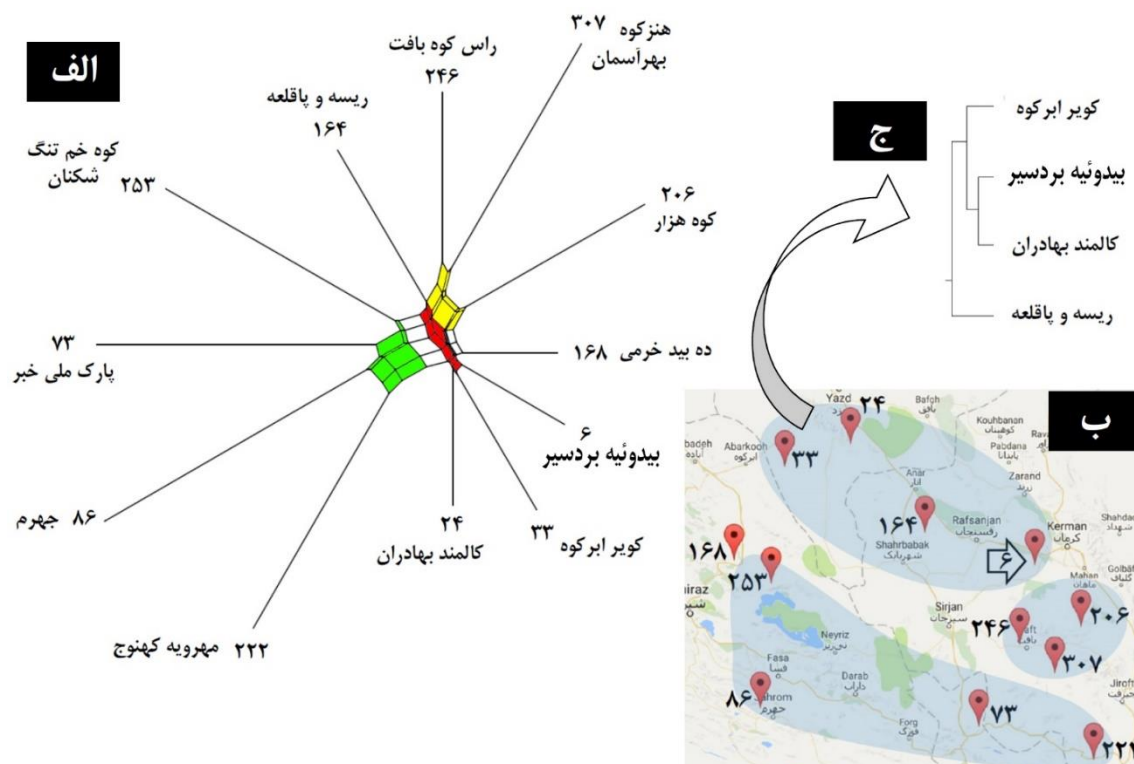
شکل ۶: مهم‌ترین خانواده‌ها در منطقه شامل ۱۲ فلور محلی (بیدوئیه بردسیر و فلورهای محلی همجوار)، براساس تعداد گونه (الف) و جنس (ب).

نتایج حاصل از تحلیل چند متغیره داده‌های فلوریستیک در ۱۲ فلور محلی شامل فلور بیدوئیه (شکل ۱) براساس حضور و غیاب گونه‌ها که با استفاده از مرکز داده iHerbs (Sharifi-Tehrani & Rahiminejad, 2013) صورت گرفت، نشان داد که در منطقه بزرگتری به وسعت ۱۱۷۷۰۰ کیلومتر مربع شامل ۱۲ فلور محلی که تاکنون مطالعه شده‌اند، در تحلیل خوشه‌ای سه گروه فلور محلی که از نظر موقعیت جغرافیایی نیز با هم قرابت دارند، وجود دارد. نتایج تحلیل‌های بیشتر (ارایه نشده) با مرکز داده فلوریستیک، نشان می‌دهد که فلور بیدوئیه ارتباط کمتری با فلورهای محلی در خراسان جنوبی و سیستان دارد. شکل ۷، الف گروه بندی ۱۲ فلور محلی را در تحلیل خوشه‌ای نشان می‌دهد. تنوع گاما در مجموعه ۱۲ فلور محلی (شکل ۱ و ۷) برابر ۱۴۶۵ و تنوع بتا از ۱۷۷ بین فلورهای بیدوئیه بردسیر و ده بید خرمی (Tajali, 2012) تا ۵۶۸ بین فلورهای پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون و هنزاکوه تغییر می‌کند (جدول ۲). بر اساس نتایج این تحلیل، فلور بیدوئیه بردسیر، همراه با فلورهای کالمند بهادران (Karimian, 2005)، کویر ابرکوه (Zarei *et al.*, 2008) و ریسه و پاقلعه (Saberi *et al.*, 2013) در یک گروه قرار گرفته (شکل ۷، ج) و ۴۷۶ گونه از مجموع ۱۴۶۵ گونه را در خود جای داده‌اند. این گروه با سایر فلورهای محلی منطقه ۲۹۸ گونه مشترک و گونه ۱۷۸ انحصاری دارند.

جدول ۲: مقادیر تنوع بتا بین زوج زوج فلورهای محلی مورد بررسی در تحلیل چند متغیره در این مطالعه. شماره فلورها مطابق با شماره دسته داده‌ها در مرکز داده iHerbs و شماره های روی نقشه شکل ۱ و شکل ۷ هستند.

کد فلورهای محلی

	6	24	33	73	86	164	168	206	222	246	253
24	198										
33	212	220									
73	473	469	505								
86	412	406	424	545							
164	276	282	302	509	438						
168	177	185	211	468	373	243					
206	288	306	330	523	500	334	259				
222	346	372	374	549	448	422	327	458			
246	292	318	342	495	472	286	283	328	476		
253	355	375	371	544	451	361	334	415	473	377	
307	365	375	413	568	519	365	342	383	515	329	468



شکل ۷: نتایج تحلیل چند متغیره داده‌های حضور/غیاب گونه‌ها در فلور بیدوئیة بردسیر و فلورهای محلی همجوار. الف: نمودار خوشه بندی نمودار net clustering. ب: نمایش گروه‌ها روی نقشه، ج: روابط درون خوشه حامل فلور بیدوئیة بردسیر.

نتیجه گیری کلی

فلور منطقه حفاظت شده بیدوئیة بردسیر فلوری نسبتا فقیر محسوب می‌شود، ولی حضور درصد قابل توجهی از گونه های با ارزش دارویی، درختی، اندمیک و نادر، آن را برجسته می‌سازد. ویژگی‌های اقلیمی و شرایط سخت محیطی رویش‌های این منطقه را با فراوانی گونه‌های تروفیت و همی کریپتوفیت همراه ساخته است. با توجه به گسیختگی مرزهای شمالی قلمرو رویشی صحرا- سندی در جنوب ایران و انشعاب در امتداد مسیل‌ها در سمت شمال، تعیین دقیق مرزهای فلور قلمرو صحرا-سندی و ایران-تورانی در ایران بسیار دشوار است (Zohary, 1973). حضور گونه *Ebenus stellate* Boiss. در فلور بیدوئیة می‌تواند نشان دهنده قرار گرفتن این فلور در یک وضعیت گذرگاهی بین ایران-تورانی و صحرا سندی باشد، چراکه اغلب در حاشیه منطقه ایران-تورانی نزدیک به قلمرو صحرا سندی می‌روید (Hedge & Wendelbo, 1978). با این وجود، فلور بیدوئیة براساس فراوانی عناصر ایران-تورانی خود، به وضوح به ناحیه ایران-تورانی تعلق دارد. فلور این منطقه از نظر ترکیب فلوربستیک بیشترین شباهت را با برخی مناطق همجوار خود نشان داده و از سایر مناطق همجوار متمایز ساخته است، به طوری که گروه‌بندی واضحی در تحلیل خوشه‌ای بدست می‌دهند. تحلیل خوشه‌ای فلورهای محلی استان کرمان که برای نخستین بار در این تحقیق صورت گرفته است نشان دهنده کاربرد تحلیل‌های فلوربستیک در تعیین ساختار فلوربستیک مناطق و تعیین مرزهای طبیعی و تعلق آنها به

نواحی فلوریستیک می باشد. مطالعه تعداد بیشتری از فلورهای محلی در فلات مرکزی ایران می تواند زیرتقسیمات جغرافیای گیاهی را در این منطقه نشان دهد.

سپاسگزاری

نگارش این مقاله براساس پایان نامه کارشناسی ارشد خانم شیرین شکیب، با راهنمایی دکتر مجید شریفی تهرانی (دانشگاه شهرکرد، گرنت پژوهشی 95GRN1M873)، کمک صندوق حمایت از پژوهشگران (گرنت شماره ۹۱۰۰۳۳۵۸ برای توسعه نرم افزار مرکز داده فلوریستیک ایران (iHerbs) و مشاوره خانم زهرا حسن آبادی (دانشگاه آزاد اسلامی) صورت گرفته است.

منابع

- Asaadi, A.M. (2009) Floristic study of Firozeh Watershed (North Khorasan province). *Research Journal of Biological Sciences*, 4(10): 1092-1103.
- Assadi, M. (ed). (1989-2012) *Flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).
- Bakhshi-Khaniki Gh.R. (2008) Flora and vegetation studies in Ferdows area, S. Khorasan province (Iran). *Pajouhesh va Sazandegi (Special Issue)*, 183-195.
- Dimitrijevic, M.D. (1973) *Geology of Kerman Region*. G.S.A., Rep. No. Yu/52. Pp. 334.
- Dolatkhahi, M., Yousofi, M. and Asri, Y. (2010) Floristic studies of Parishan Wetland and its surrounding in Fars province. *Iranian Journal of Biology*, 23(1): 35-46 (in Persian).
- Hedge, I.C. and Wendelbo, P. (1978) Patterns of distribution and endemism in Iran. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh*, 36(2), pp.441-464.
- Huson D.H. and Bryant D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2):254-267.
- Irannejad-Parizi M.H., Sanei-Shariatpanahi M., Zobeiri M. and Marvi-Mohajer M.R. (2001) A floristic and phytogeographical investigation of Khabr National Park and Rouchun wildlife Refuge. *Iranian Journal of Natural Resources*, 54(2):111-129.
- Karimian A.A. (2005) Medicinal, aromatic, range and rare plants of Kalmand Bahadoran Protected area and Bafgh Mt. of Yazd province. *Journal of Mohit Shenasi*, 37: 77-88.
- Mahdavi-Maymand Z. and Mirtajodin M. (2010) The collection and identification of the some plant species of Kerman province. *Journal of Herbal Drugs*, 2:1-24.
- Malekpourzadeh L., Mirtadzadini M. and Nazeri V. (2015) The study of flora of Ra'skuh Area in Baft township in Kerman province. *Taxonomy and Biosystematics*, 23: 85-94.
- Mobayen, S. (1975) *Flora of Iran, vascular plants. vol. 1, Monocots*. Tehran University Publications, Tehran, Iran, Pp 502 (in Persian).
- Moradi, Gh.H., Abbasi, E. and Zare Chahooki, M.A. (2009) Flora, life forms and geographical distribution of plants in Lamerd ranges, Fars, Iran. *Watershed Management Researches (Pajouhesh va Sazandegi)*, 23(1): 70-80 (in Persian).

- Payandeh M., Bordbar F. and Mirtadzadini M. (2016) Floristic study of Hanza-kuh of Bahr-Aseman protected area (SE Iran). *Taxonomy and Biosystematics*, 28: 79-100.
- Rajaei P., Maassoumi A.A., Nejad-Sattari, T. and Pourmirzaei A. (2011) Alpine flora of Hezar mountain (SE Iran). *Rostaniha*, 12(2): 111-127.
- Ramazannejad-Ghadi, R. and Parishani-Foroushani, M. (2008) Introduction of medicinal plants of Maymand historical region in Kerman province. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15(5): 1-7.
- Rechinger, K.H. (Ed.) (1963-2010) *Flora Iranica*, vols. 1-174. Akademische Druck-und Verlagsanstalt, Graz, vols. 175-178, Naturhistorisches Museum, Wien.
- Rohlf, F.J. (2000) *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York.
- Saber-Amoli S., Ghorbanli M., Assadi M. and Asri Y. (2016) Investigation of the flora, life forms and phytochorology of the plants in the Mehroieh wild life refuge of Kahnuj, Kerman, Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 26: 1-16.
- Saberi A., Hasanabadi Z., Mirtadzadini M. and Nazeri V. (2013) A study of the flora of Riseh and Paqal'e area Shahrebabak of Kerman, Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 14: 67-78.
- Saberi, A., Hasanabadi, Z., Mirtadzadini, S.M. and Nazeri, V. (2012) A study of the flora of Riseh and Paqale area Shahrebabak of Kerman, Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 5(14): 67-87 (in Persian).
- Sharifi-Tehrani, M. (2014) Introduction of the new program "CheckName" with applications in integration and increased precision and certitude of floristic inventories. *Taxonomy and Biosystematics*, 20: 111-121.
- Sharifi-Tehrani, M. and Rahiminejad-Ranjbar, M.R. (2013) Compilation of floristic and herbarium specimen data in Iran: proposal to data structure. *Taxonomy and Biosystematics*, 15, 75-94.
- Tajali A.A., (2012) Studying the floristic composition of Dehbid Khorrami area in Iran. *Advances in Environmental Biology*, 6(7): 1957-1959.
- Tregobov P. and Mobayen S. (1991) The maps of Iranian forests. Iranian Forestry Organizations.
- URL: <http://encyclopediakerman.com>, Accessed July, 17, 2017.
- Zarei Gh., Assadi M. and Maassoumi, A.A. (2008) Introduction to the flora, life form, habitat and plant geographical distribution of Abarkooh Playa(Yazd). *Pajouhesh va Sazandegi*, 81: 28-38.
- Zohary, M. (1973) *Geobotanical foundations of the Middle East*. 2 vols. Fischer Verlag, Stuttgart, Amsterdam.

Study of vascular plant species diversity in Bidouiyeh protected area in Bardsir, KermanS. Shakib¹, M. Sharifi-Tehrani^{2*}, Z. Hasanabadi³**Received:2017.07.18****Accepted:2018.04.29****Abstract**

The Bidouiyeh protected area with 155383 ha and maximum altitude of 2734 meter above sea level, is located in 45 km SE Kerman. Floristic study of this region showed that 125 plant species, 102 genera and 32 families of vascular plants grow wild in this region. Most species-rich plant families are Chenopodiaceae, Brassicaceae and Asteraceae, and most species rich genera are Astragalus, Nepeta, Euphorbia, Tamarix and Salsola. Most of the species in this region are in form of therophytes (41%) and hemicryptophytes (26%), and most of the species (75%) belong to Irano-Turanian floristic region. Multivariate analysis of floristic data showed three major groups of local floras, in which the floristic affinities between regions showed affinities to geographic distances.

Keywords: Bardsir, Biodiversity, Bidouiyeh, Flora, Kerman.

1 Department of Biology, Azad University of Science and Research, Fars branch, Marvdasht, Shiraz

2 Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

* (Corresponding Author: [†] sharifi-m@sku.ac.ir)

3 Department of Biology, Azad Univ, Shahrebabak branch

جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز برون سلولی فاقد خاصیت گلوتامینازی از خلیج فارس

سالومه شعاعی نایینی*^۱، امید رعنائی سیادت^۲، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، بیژن بمبئی^۳

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

آنزیم ال-آسپاراژیناز کاربردهای مختلفی در پزشکی و صنایع غذایی دارد. به دلیل ایجاد برخی عوارض جانبی و به دلیل فعالیت نامطلوب گلوتامینازی، تلاش برای یافتن منابع میکروبی جدید تولید کننده آنزیم فاقد فعالیت گلوتامینازی ادامه دارد. هدف مطالعه حاضر جداسازی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز نوع دوم، فاقد خاصیت گلوتامینازی از آب خلیج فارس و اندازه گیری میزان آنزیم و شرایط افزایش آن می باشد. جهت بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، باکتری های خالص جداسازی شده از آب دریا در محیط -M9 حاوی فنل رد و آسپاراژین کشت داده شد. به منظور بررسی خاصیت گلوتامینازی باکتری هایی که تست آسپاراژینازی مثبت داشتند، در محیط M9 دارای گلوتامین و فنل رد کشت داده شد. جهت شناسایی جدایه باکتریایی دارای خاصیت آسپاراژینازی مثبت و خاصیت گلوتامینازی منفی از روش های مورفولوژی، بیوشیمیایی و توالی یابی *rdna S* ۱۶ استفاده شد. ارزیابی فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز طبق روش رنگ سنجی انجام گرفت. تاثیر القای بی هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II با کشت در دو شرایط هوازی و بدون هوازی بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد که جدایه باکتری، *Rhizobium nepotum* strain SHN1 می باشد. فعالیت آنزیم آسپاراژینازی این باکتری معادل 0.467 U/mL و فعالیت ویژه آنزیمی آن 0.015 IU/mg بدست آمد. این فعالیت در شرایط القا بی هوازی بیش از ۵۰ درصد افزایش داشت. نتایج حاکی از آن بود که فلور میکروبی آبهای خلیج فارس میتواند منبع مناسبی برای تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز دارای خاصیت ضد سرطانی و فاقد فعالیت گلوتامینازی باشد.

واژه های کلیدی: آنزیم ال-آسپاراژیناز، *Rhizobium nepotum* گلوتامیناز

مقدمه

استفاده از آنزیم ها در صنایع پزشکی و داروسازی از جمله کاربردهای بی شمار این بیوکاتالیزورها به شمار می آید. کاربرد اصلی

۱- دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران.

* (نویسنده مسؤل: saloomeh.sh@gmail.com)

۲- مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بزرگراه کرج، تهران

آنزیم درمانی، در درمان سرطان هاست. یکی از آنزیم های نو ترکیب درمانی، آنزیم ال-آسپاراژیناز است که برای درمان لوکمای لنفوبلاستیک حاد بکار میرود. آسپاراژیناز که با نام های Crisantaspase، Erwinase و L-asparaginase (LA) نیز شناخته می شود، هیدرولیز ال-آسپاراژین را به اسید آسپارتیک و آمونیم کاتالیز می کند. این آنزیم کاربردهای مختلفی بخصوص در پزشکی و در صنایع غذایی دارد (Gokmen & Palazoglu, 2008). آسپاراژیناز اولین آنزیم درمانی با خصوصیت ضد سرطانی می باشد که بیش از سه دهه توسط دانشمندان و محققین زیادی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (Batoool *et al.*, 2018). ایزوآنزیم های مختلف آسپاراژیناز از طیف گسترده ای از موجودات مانند گیاهان و میکروارگانیسم های زمینی و دریایی جدا شده است. دو ایزوآنزیم ال-آسپاراژیناز با نام های نوع یک و نوع دو توسط Ohnuma در سال ۱۹۶۷ شناسایی شده است (Campbell *et al.*, 1967). آسپاراژیناز نوع اول و نوع دوم توسط فعالیت آنزیمی که روی هر دو اسید آمینه ال-آسپاراژین و ال-گلوتامین دارند مشخص شده اند. البته آسپاراژیناز نوع دوم در برابر ال-آسپاراژین عملکرد اختصاصی تری را دارد.

آسپاراژیناز نوع دوم دقیقاً خاصیت ضد سرطانی از خود نشان می دهد و به عنوان یک داروی شیمی درمانی در بیماری لوسمی حاد لنفوبلاستی یا (Acute Lymphocytic Leukemia) استفاده می شود (Kotzia & Labrou, 2009). آسپاراژیناز هایی که به صورت تجاری در دسترس هستند شامل Colapase، Crasnitin، Kidrolase، Espar، Erwinaze PEG - asparaginase، Pegasparagasum می باشند. حضور ال-آسپاراژیناز در موجودات مختلفی مانند حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم ها (باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و اکتینوماست)، بجز انسان ها گزارش شده است. با اینکه آنزیم آسپاراژیناز در گروه های جانوری و گیاهی مختلف وجود دارد، ولی به دلیل پیچیده بودن روشهای استخراج آنزیم از آنها، منابع ممکن دیگری مانند باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و اکتینوماست، توسط محققین مورد بررسی و مطالعات بیشتر قرار گرفته است. تولید آنزیم در مقیاس زیاد از میکروبوها ساده تر می باشد، زیرا روشهای تولید آسانتری دارند (Patro *et al.*, 2011). آنزیم ال-آسپاراژیناز از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی زمینی و دریایی گزارش شده است (Izadpanah Geshmi *et al.*, 2014). به باکتریهای گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی کمتر پرداخته شده است (Savitri & Azmi, 2003). ال-آسپاراژیناز در اغلب باکتریهای گرم منفی به دو نوع اول و دوم تقسیم بندی می شود. آسپاراژیناز نوع اول (Type I)، بصورت کمی بیان می شود و دارای فعالیت آنزیمی بر روی اسید آمینه آسپاراژین و اسید آمینه گلوتامین می باشد. در صورتیکه نوع دوم آسپاراژیناز (Type II) فعالیت اختصاصی بالایی را روی اسید آمینه آسپاراژین دارد و تنها در شرایط بی هوازی القا می شود (Sanches *et al.*, 2003). آسپاراژیناز نوع دوم تولید شده توسط *Escherishia coli* و *Erwinia chrysanthemi*، به عنوان یک عامل ضد تومور جهت درمان موثر بیماری ALL، بیش از سه دهه مورد استفاده قرار گرفته است (Borek & Jaskolski, 2001). ال-آسپاراژینازی که از باکتریهای *Escherishia coli* و *Erwinia carotovora* بدست می آید در درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد استفاده قرار می گیرد (Narayana *et al.*, 2008).

قانع وبمبئی در سال ۲۰۰۹ وجود ژن *ans B* را در چند سویه از باکتری اشرشیاکلی اثبات نمودند (Ghane & Bambiaei, 2009). یزدانی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی ایران مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز پرداختند و موفق به جداسازی باکتریهای ترموفیل باسیلوس با فعالیت ال-آسپاراژینازی شدند. ایزد پناه قشمی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای جنس *Zobella* تولید کننده ال-آسپاراژیناز از خلیج فارس اقدام نمودند. قربان موحد و همکاران در سال ۲۰۱۶ اقدام به تولید آنزیم ضد لوسمی ال-آسپاراژیناز توسط سویه‌ای از استافیلوکوکوس جداسازی شده از خاک کشاورزی نموده و شرایط بهینه تولید آنزیم در این سویه را مورد بررسی قرار دادند. در سال ۲۰۱۶، توالی ژن، کلونینگ و بیان ژن نو ترکیب *Pseudomonas aeruginosa* سویه SN4 در باکتری اشرشیاکلی توسط بادویی-دلفرد و همکارانش انجام شد. با توجه به کاربرد آسپاراژیناز در زمینه‌های مختلف، بررسی منابع مختلف تولید کننده این آنزیم، شرایط بهینه تولید، پروتئین نو ترکیب این آنزیم و تخلیص آن به منظور تولید تجاری این آنزیم در کشور حایز اهمیت می‌باشد. در این راستا مطالعه حاضر به جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری دارای فعالیت ال-آسپاراژینازی و فاقد فعالیت گلوتامینازی پرداخته و فعالیت آنزیم آسپاراژینازی را مورد بررسی قرار داده و تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II را بررسی نموده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ انجام گردید. یک و نیم لیتر از آب دریای خلیج فارس در منطقه ساحلی جزیره قشم در شیشه‌ای استریل جمع آوری و به آزمایشگاه اکولوژی دریا دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی منتقل شد. این نمونه آب در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) نگهداری شد. جهت بررسی فلور میکروبی با هدف جداسازی باکتریهای تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از آب را روی محیط کشت M9 تغییر یافته (دارای آسپاراژین ۰/۱ درصد) با سمپلر ریخته و با پیپت پاستور استریل خم شده، در روی سطح پتری پخش شد. پس از چند دقیقه که آب کاملا جذب محیط کشت شد پتری به صورت برعکس (در پتری در روی زمین) در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. کلنی‌های زیادی بر روی محیط کشت رشد کردند که پنج کلنی که از سایرین از لحاظ میزان رشد و شکل کلنی قابل تمایز بودند به صورت جداگانه به محیطهای کشت M9 منتقل شد و پس از رشد ۲۴ ساعته آنها، در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس از هر کدام کشت سیزده در محیط جدید داده، تا تک کلنی خالص حاصل شود.

بررسی کیفی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

باکتریهای جداسازی شده در محیط کشت M9 حاوی معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد و آسپاراژین ۰/۱ درصد جهت بررسی

تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که برای این آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی هم در نظر گرفته شد. کنترل مثبت باکتری *Staphylococcus sp.* دارای خاصیت آسپاراژینازی برون سلولی تایید شده در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و همچنین پتری حاوی محیط کشت M9 دارای فنل رد و عاری از کشت، جهت بررسی تغییر رنگ محیط کشت در طول زمان به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

بررسی کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

جهت بررسی خاصیت گلوتامینازی، از محیط کشت M9 دارای گلوتامین ۰/۱ درصد و معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد استفاده شد. باکتریهایی که تست آسپاراژینازی آنها مثبت بود در محیط دارای گلوتامین به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. قابل ذکر است که کنترل مثبت و کنترل منفی برای این آزمون در نظر گرفته شد. پتری حاوی محیط کشت M9 دارای فنل رد و گلوتامین و بدون کشت (تلقیح) باکتری جهت بررسی تغییر رنگ محیط کشت در طول زمان به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و نمونه باکتری باسیلوس جداسازی شده از خاک با فعالیت آسپاراژینازی-گلوتامینازی به عنوان کنترل مثبت این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی باکتری به روش کلاسیک و فیلوژنتیکی

به منظور شناسایی باکتری جداسازی شده از روش‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و توالی یابی rDNA ۱۶S استفاده شد. در بررسی مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم با استفاده از کشت تازه باکتری در محیط نوترینت آگار و M9 با استفاده از کیت رنگ آمیزی گرم شرکت لاب ترون (LABTRON Co.) صورت گرفت. از *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* به ترتیب به عنوان شاهد گرم منفی و مثبت استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی گرم، لام نمونه باکتریایی مورد نظر در زیر میکروسکوپ به منظور مشاهده شکل میکروسکوپی و نوع دیواره (گرم مثبت / گرم منفی)، با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی شد. به منظور شناسایی باکتری، چندین تست بیوشیمیایی مختلف شامل تست افتراقی محیط Triple Sugar Iron agar (TSI)، تست افتراقی محیط کشت Simmons Citrate agar (SC)، تست افتراقی محیط کشت Sulfide Indol Motility (SIM)، تست افتراقی اوره آزر در محیط کشت Urea Agar Base، تست افتراقی اکسیداز (Oxidase Test)، تست افتراقی کاتالاز (Catalase Test)، و تست افتراقی متیل رد، تست وگس پرسکوئر (Methyl red Test & Voges-Proskauer Test) و تست اندول (Endol Test) انجام گردید.

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز به روش 16S rDNA انجام شد. تعیین توالی 16S rDNA ابزاری مناسب برای مطالعه فیلوژنتیکی باکتریها به شمار می رود، این توالی در میان اکثر باکتریها حفاظت شده است و هر یک از گونه‌های باکتریایی دارای توالی 16S rDNA منحصر به خود می‌باشند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت

سیناژن (Cinna Pure DNA KIT, Cat. No.: PR881613) صورت پذیرفت. این کیت برای استخراج DNA از باکتریهای گرم منفی بکار می‌رود. جهت تکثیر DNA استخراج شده باکتری SHN1 در منطقه 16S rDNA، از دو پرایمر یونیورسال 16S rDNA با نامهای پرایمر فوروارد 27F و پرایمر ریورز 1492R از شرکت ماکروژن (Macrogen Co.) استفاده شد. جهت PCR از مستر میکس لیوفیلیزه (AccuPower®ProFi Taq PCR PreMix) استفاده شده و در ویال مستر میکس لیوفیلیزه ۲۱ ماکرولیت آب مقطر استریل DNase free، 1 میکرولیتر پرایمر F۲۷ و ۱ ماکرولیت پرایمر R ۱۴۲۹ و ۲ ماکرولیت DNA Template اضافه شد. توالی پرایمرهای یونیورسال به شرح زیر می‌باشد :

27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (Lane *et al.* 1991)

1492R: CGGTTACCTTGTTACGACTT (Turner *et al.* 1999)

به منظور تخلیص محصول PCR از ژل از کیت GF-1 GEL DNA RECOVERY (cat#GF-GP-50) از شرکت Vivantis استفاده شد. جهت اطمینان از بازیابی شدن DNA حدود ۴ ماکرولیت از محصول ریکاوری شده را روی ژل آگارز بارگذاری نموده و در صورت مشاهده باند با غلظت کافی جهت توالی یابی (سکانس) به شرکت فزا پژوه ارسال شد.

بررسی بیوانفورماتیکی توالی 16S rDNA باکتری SHN1

پس از آماده شدن جواب توالی محصول PCR ارسال شده برای شرکت فزا پژوه، دوبار خوانش محصول با دو پرایمر فوروارد و ریورز، با کمک نرم افزار Vector NT1 و بلاست کردن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) بررسی شد.

سنجش فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

ارزیابی فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز طبق روش رنگ سنجی توصیف شده توسط ایمادا و همکاران در سال ۱۹۷۳ با کمی تغییرات، انجام گرفت. این روش بر اساس مقدار آمونیاک آزاد شده از ال-آسپاراژین در هنگام فعالیت آنزیم می‌باشد (Wriston, 1970). برای این منظور ابتدا ۱ میلی لیتر بافر تریس آمینو متان ۰/۱ مولار و با pH= ۸ را در لوله آزمایش تمیز و یا یک ویال ۲ میلی لیتری ریخته شد. سپس ۵۰۰ ماکرولیت آسپاراژین ۰/۰۴ مولار به آن اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری نموده تا بافر و سوبسترا گرم شده و به دمای ایده ال فعالیت آنزیمی برسند. محلول رویی یا آنزیم را به لوله اضافه نموده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در زمان‌های متفاوت (۱۵ دقیقه تا ۳ ساعت) گذاشته شد. پس از اتمام زمان مورد نظر، ۲۰۰ ماکرولیت تری کلرواستیک اسید ۰/۱ مولار (Trichloroacetic acid, TCA) به محتویات لوله آزمایش اضافه و بخوبی ورتکس شد. محتویات لوله را در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و در دور 13000 g به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شد. یک میلی لیتر از مایع رویی را در لوله آزمایش تمیز ریخته، ۳ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ ماکرولیت نسلر (Nessler) اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداشته شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر

(Nano Quant, Infinite M200 Pro Tecan) خوانده شد. جهت کنترل منفی (Blank) محلول رویی و بافر و سوبسترا و تری-کلرواستیک اسید را از ابتدا در لوله ریخته و در بقیه موارد مانند پروتوکل عمل شد. در یک حالت دیگر بافر و محلول رویی (آنزیم) را در لوله ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته (به مدت مورد نظر آزمایش) سپس تری-کلرواستیک اسید و سوبسترا (آسپاراژین) به لوله اضافه و بقیه مراحل طبق پروتوکل پیش رفت. قابل توجه است که به علت گران بودن آمپول آسپاراژیناز کنترل مثبت برای این آزمایش لحاظ نشد. سپس منحنی استاندارد آمونیوم سولفات رسم گردید.

محاسبه فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

میزان جذب بدست آمده در معادل خطی منحنی استاندارد قرار داده شد و میزان میکرومول آمونیوم آزاد شده در اثر فعالیت آنزیمی محاسبه گردید. سپس این عدد در فرمول زیر قرار گرفت و میزان فعالیت آنزیمی با واحد یونیت در هر میلی لیتر (IU/mL) محاسبه گردید.

$$\text{IU/mL} = (\mu\text{mol NH}_3 \cdot \text{a}) / (\text{b} \cdot \text{t} \cdot \text{c})$$

a: حجم کل مواد اولیه با واحد میلی لیتر (۱ میلی لیتر بافر + ۰/۵ میلی لیتر سوبسترا + ۰/۵ میلی لیتر سوپر ناتانت +

۰/۲ میلی لیتر تری-کلرواستیک اسید)

b: حجمی از محلول a که برای مرحله نسلریزاسیون استفاده شد (۱ میلی لیتر)

t: زمان انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس به دقیقه

c: حجم محلول رویی مورد استفاده در واکنش با واحد میلی لیتر (۰/۵ میلی لیتر)

بر اساس این رابطه یک واحد فعالیت آنزیمی معادل مقداری از آنزیم می باشد که یک میکرومول آمونیوم را در یک دقیقه کاتالیز (آزاد) می کند.

محاسبه فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز

فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{Specific activity} = \text{activity (IU/mL)} / \text{Protein (mg/mL)}$$

تعیین میزان پروتئین در محلول رویی به روش لوری

برای تعیین میزان پروتئین موجود در محلول رویی از روش پروتئین سنجی لوری (Lowry protein assay) استفاده

شد.

تهیه محلول رویی باکتری *Rhizobium nepotum* سویه SHN1

جهت تهیه محلول رویی حاوی آنزیم باکتری *Rhizobium nepotum* سویه SHN1، ابتدا یک تک کلون از باکتری در محیط کشت M9 با کمی تغییرات (۰/۱ درصد آسپاراژین) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور شیکر 200 rpm به مدت ۱۶ ساعت (کشت شبانه) کشت داده شد. سپس از پیش کشت آماده شده در ارلن‌هایی با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت M9 با ۰/۱ درصد آسپاراژین، به میزان ۱ میلی لیتر تلقیح شد. محیط جدید تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور شیکر 200 rpm گرمگذاری شد. در فواصل زمانی مختلف (OD (Optical Density) با اسپکتوفوتومتر (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instrument Lth.) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و مطابق با هر زمان اندازه‌گیری کدورت از محیط کشت تلقیح شده ۳-۴ میلی لیتر برداشته و در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و با دور 13000g و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده. محلول رویی به آرامی در ویال جدید ریخته شد.

بررسی تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II

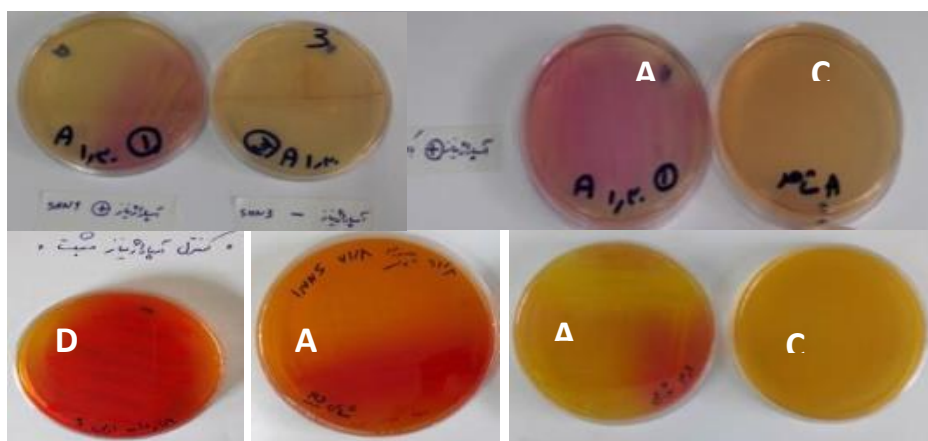
جهت بررسی تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی نوع دوم، باکتری در محیط M9 مایع حاوی ۰/۱ درصد آسپاراژین تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ rpm گرمگذاری شد. پس از ۱۶ ساعت (over night) یک میلی لیتر از پیش کشت آماده شده، به محیط M9 حاوی ۰/۱ درصد آسپاراژین تلقیح شد و مجدداً در شیکر انکوباتور با دما ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm قرار گرفته و در فواصل زمانی مختلف از آنها چند میلی لیتر برداشته شد. بخشی از این نمونه را در ویال‌های استریل ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بطور ساکن قرار داده تا القای بی‌هوازی صورت گیرد. بخش دیگر نمونه‌ها را جهت تهیه محلول رویی استفاده نموده و همزمان کدورت باکتریها هم اندازه‌گیری شد. القای بی‌هوازی را در زمانهای ۱ ساعت انجام داده و سپس نمونه‌ها را سانتریفوژ کرده و محلول رویی حاصله را جهت بررسی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

جمع‌آوری نمونه و غربال‌گری کیفی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، از آب جمع‌آوری شده از خلیج فارس، با ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از آب روی محیط کشت M9 تغییر یافته، کلنی‌های زیادی در روی محیط کشت رشد کردند که از ۵ تا از آنها تک کلنی خالص حاصل شد. بدین ترتیب ۵ پلیت کشت باکتریایی خالص و متفاوت از لحاظ شکل ظاهری بدست آمد که به ترتیب SHN1، SHN2، SHN3، SHN4 و SHN5 نامگذاری شدند. این باکتریها در محیط کشت M9 حاوی معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد و آسپاراژین ۰/۱ درصد جهت بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی کشت داده شدند. جدایه‌های

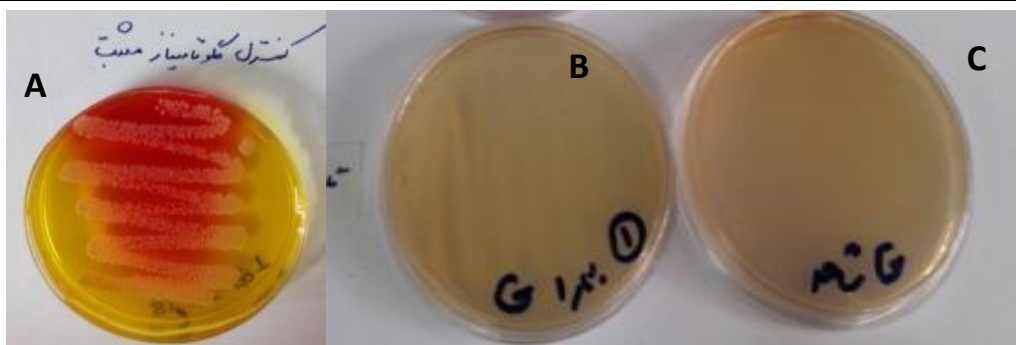
باکتریایی SHN1 و SHN4 تغییر رنگ محیط را با قرمز شدن محیط کشت اطراف رشد کلنی باکتریها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان دادند. اما سه جدایه دیگر تغییر رنگی نشان ندادند. مجدداً ۲۴ ساعت دیگر پتریها در انکوباتور قرار گرفتند تا امکان تولید آنزیم مجدداً در هر پنج جدایه باکتری بررسی شود. نتایج تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی در سه جدایه SHN2، SHN3 و SHN5 منفی بود و تغییر رنگی مشاهده نشد. SHN1 و SHN4 در اطراف کلنی باکتری محیط قرمز رنگ شد و این تغییر رنگ نشان دهنده قلیایی شدن محیط در اثر تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی و تبدیل آسپاراژین محیط به آمونیوم و آسپاراتات می باشد. آمونیوم آزاد شده نیز باعث قلیایی شدن و تغییر رنگ محیط می شود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی کیفی فعالیت آسپاراژینازی جدایه SHN1. A: فعالیت آسپاراژینازی مثبت جدایه SHN1، B: فعالیت آسپاراژینازی منفی (عدم تولید آنزیم آسپاراژیناز) جدایه SHN3، C: کنترل منفی، محیط کشت M9 تغییر یافته با ۰/۰۰۹ درصد فنول رد بدون کشت باکتری، D: کنترل مثبت، کشت باکتری *Staphylococcus sp.* دارای فعالیت آنزیم آسپاراژینازی.

بررسی کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

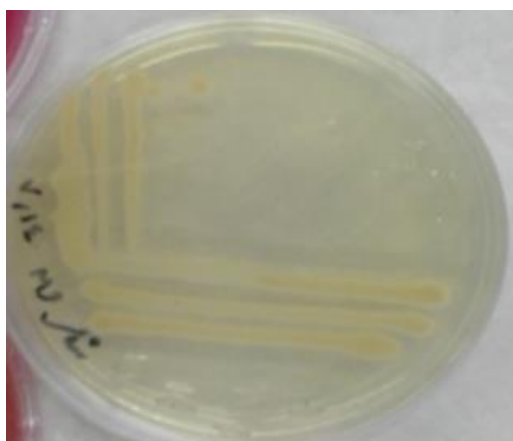
جهت بررسی خاصیت گلوتامینازی این دو جدایه SHN1 و SHN4، از محیط کشت M9 دارای گلوتامین ۰/۱ درصد و معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد استفاده شد. در محیط تغییر رنگی منوط بر تولید آنزیم گلوتامیناز برون سلولی و تبدیل گلوتامین به گلوتامات و آمونیوم، مشاهده نشد. پس این دو جدایه آسپاراژیناز مثبت و گلوتامیناز منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۲). با توجه به اینکه تغییر رنگ و میزان قرمز شدن محیط کشت در جدایه باکتری SHN1 از SHN4 بیشتر و قوی تر بود، لذا احتمال تولید آنزیم آسپاراژیناز بیشتر در جدایه SHN1 نسبت به SHN4، آن جدایه را تنها کاندید این پروژه، جهت بررسی فعالیت آسپاراژینازی و شناسایی آن باکتری مشخص نمود.



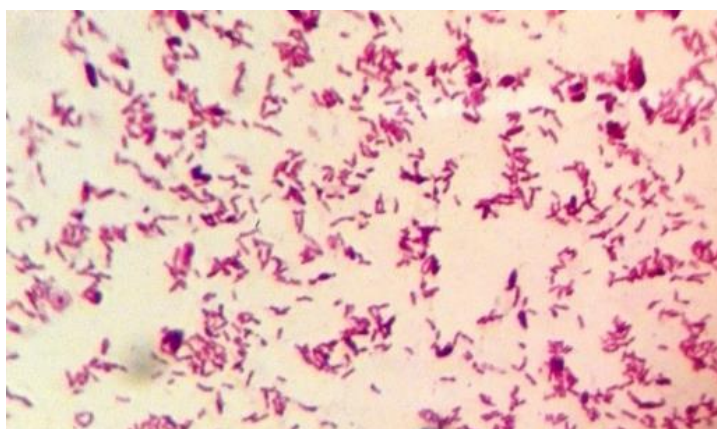
شکل ۲: بررسی کیفی فعالیت گلوتامینازی جدایه باکتریایی SHN1. A: فعالیت گلوتامینازی منفی جدایه SHN1 (فاقد فعالیت گلوتامینازی)، B: کنترل منفی، محیط کشت M9 تغییر یافته حاوی ۰/۱ درصد گلوتامین با ۰/۰۰۹ درصد فنول رد بدون کشت باکتری، C: کنترل مثبت، کشت باکتریایی (جدایه شناسایی نشده) دارای فعالیت آنزیم گلوتامینازی.

مشاهده میکروسکوپی و تست گرم (رنگ آمیزی گرم)

باکتری SHN1 در طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در محیط M9 تغییر یافته در دمای ۳۰ درجه نشان داد که کلنی باکتری به رنگ کرم کمی مایل به زرد و لعابی شکل می‌باشد (شکل ۳). همچنین با رنگ آمیزی گرم و مشاهده زیر میکروسکوب نوری باکتری SHN1 به شکل باسیل و گرم منفی مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۳: نمایی از کشت جدایه باکتری SHN1 در محیط M9 تغییر یافته.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی جدایه باکتری SHN1. باکتری باسیلی شکل و گرم منفی در تصویر مشهود است.

بررسی برخی تست های بیوشیمیایی باکتری SHN1

نتایج تست های بیوشیمیایی به شرح جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: تست بیوشیمیایی جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1

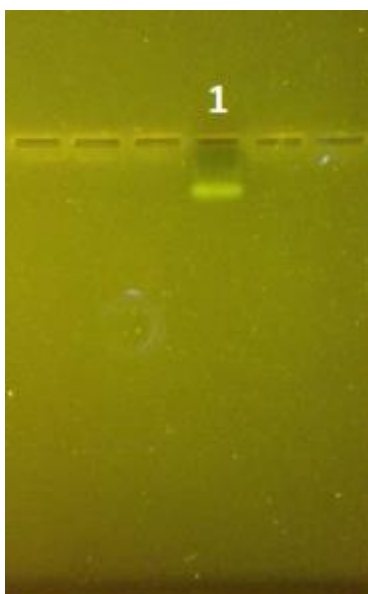
-	تست TSI
-	تست سیمون سترات
-	Motility
-	H ₂ S
-	Indol
+	Urease
-	Metyle red
+	Oxidase
+	Katalase
-	VP

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز به روش 16 SrDNA

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریهای گرم منفی انجام شد. جهت اطمینان از استخراج،

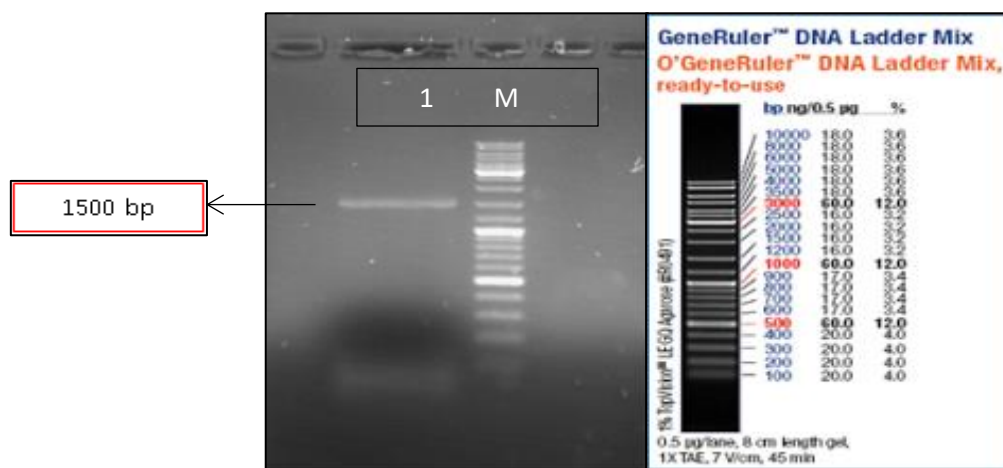
محصول روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (شکل ۵).



شکل ۵: نتیجه استخراج DNA جدایه باکتری SHN1 روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ باند DNA استخراج شده را نشان می-دهد.

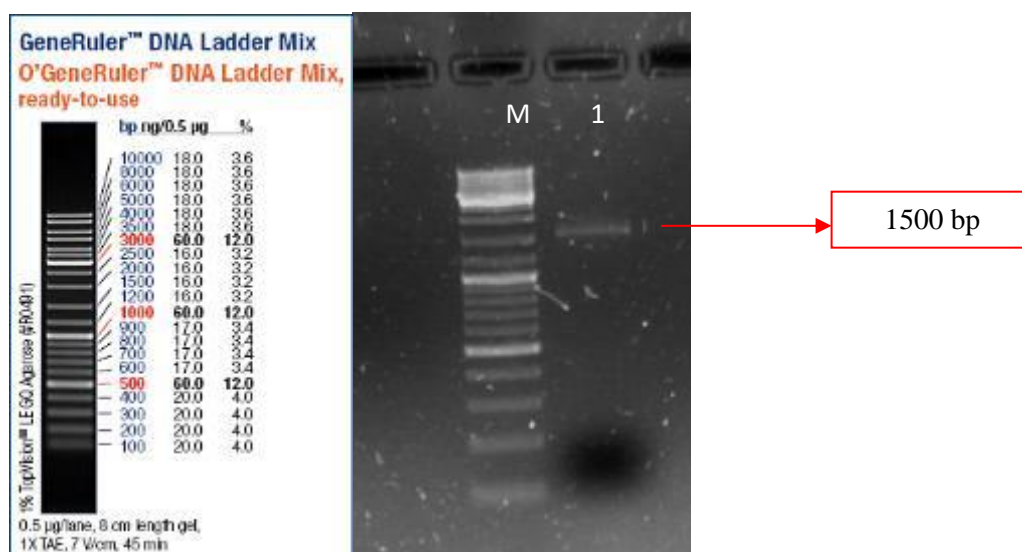
تکثیر DNA استخراج شده باکتری SHN1 در منطقه 16S rRNA (PCR)

پس از استخراج DNA ژنوم باکتری و انجام PCR جهت تکثیر قطعه 16S rDNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. در نتیجه آن یک باند در نزدیکی محل ۱۵۰۰ bp در مقایسه با مارکر ۱ kb مشاهده شد که حاکی از درست بودن واکنش تکثیر 16S rDNA بود (شکل ۶).



شکل ۶: باند 16S rDNA حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪. چاهک M نشانگر DNA (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)، چاهک ۱ باند نامبرده به طول ۱۵۰۰ جفت باز و چاهک سوم کنترل PCR بدون DNA الگو می باشد. تخلیص محصول PCR از ژل

پس از ریکاوری محصول PCR از روی ژل آگارز، نتیجه خالص سازی مجدداً بر روی ژل آگارز کنترل و باند ۱۵۰۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۷).



شکل ۷: نتیجه‌ی خالص سازی قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی باند 16S rRNA جدایه SHN1 از روی ژل آگارز. چاهک M نشانگر DNA (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) چاهک ۱ باند تخلیص شده از روی ژل می باشد.

بررسی بیوانفورماتیکی توالی 16S rRNA باکتری SHN1

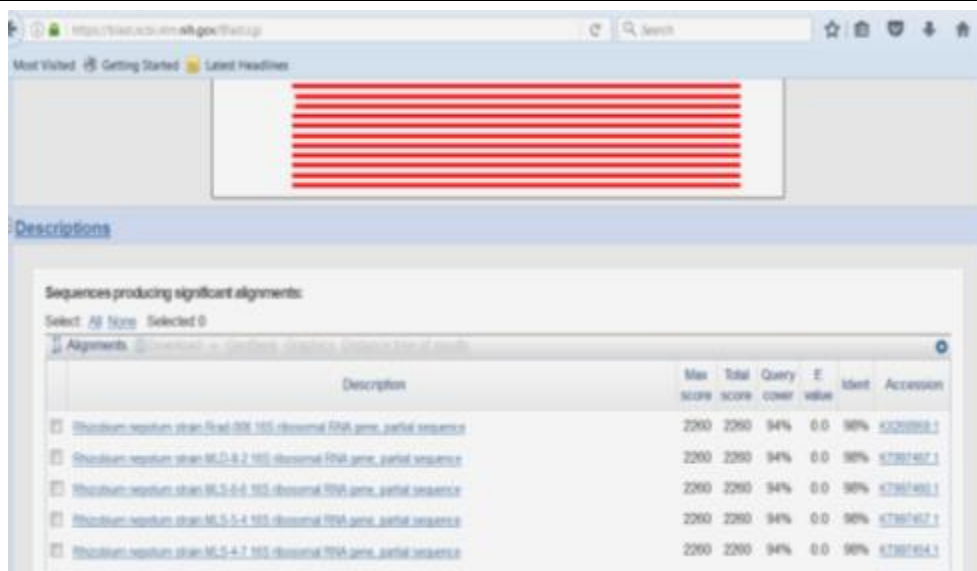
با تعیین توالی محصول PCR، ۷۶۰ نوکلئوتید با پرایمر فوروارد (27F) و حدود ۹۲۰ نوکلئوتید با پرایمر ریورز (1492R) خوانش شد. این توالی‌ها با کمک نرم افزار Vector NT1 متصل و تصحیح شده (Contig) و سپس با BLAST در NCBI نشان داد که باکتری جدا شده ۹۸٪ با سویه *Rhizobium nepotum* همولوژی دارد (شکل ۸). توالی 16S rDNA باکتری SHN1 جداسازی شده در این پژوهش در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: توالی 16S rDNA باکتری SHN1 جداسازی شده در این پژوهش.

```

5'...acatacttaacattttgggttagcgggttccaagctggtaacggagtagcttcgggtaaaaccaact
ccccgggggtgacggcggtgtgtacaaggccgggaacgtattcaccgcagcatgctgatctgcgatta
ctagcattccaactcatgcactcagttgcagagtcaatccgaactgagatggcttttgagattag
ctcgacatcgctgtctcgtgccactgtcaccaccattgtagcacgtgtgtagcccagcccgaagggc
catgaggacttgacgtcatcccactctctcggcttatcaccggcagtcaccttagagtgccaaact
aaatgtggcaactaaggcgagggttgcgctcgttgcgggacttaaccaacatctcacgacacgagct
gacgacagccatgcagcacctgttctggggccagcctaactgaaggacaatgtctcactgccc aaacc
cgaatgtcaagagctggtaaggttctgcgcttctcgaattaaccacatgctccaccgcttgtcggg
gccccgtcaattcctttgagtttaattctgcgaccgtactccccaggcggaatgttaatgcgttagc
tgcgccaccgaacagtatactgccgacggctaacattcatcgtttacggcgtggactaccagggtatct
aatccctgtatgctctccacgctttcgcacctcagctcagtaatggaccagtaagccgcttcgcca
ctggtgttctccgaatatctcgaattcacctctacactcggaaattccacttacctctccatactca
atgatacccagtatcaaaaggcagttccagagttgagctctgggattcacccctggactaaatatccgc
ctacgtgcgctttacggccagtaattccgaacaacgctagccccctcgtattaccgcggctgctggcac
gaagttagccgggcttcttccggataccgtcattatcttccgggtgaaagagctttacaaccctaa
ggccttcatcactcaacggcagtggtggatcaggcttgcgccattgtccaatattcccactgctgcc
tcccgtaggagttggccgtgtctcagtcaccaatgtggctgatcctctcagaccagctatggatc
tcgcttggtagccttaccaccacactagctaataccaacgcgggctcatcatacccgataaatctt
tccccggcgggaagtatgcggtattaattccagttcccggagctattccgatttttcttaattcc
cacgcttactcaccgtagccactccccttgcggggcgtggaacaaccaagtaataataaaaaatg
tctaac...3'

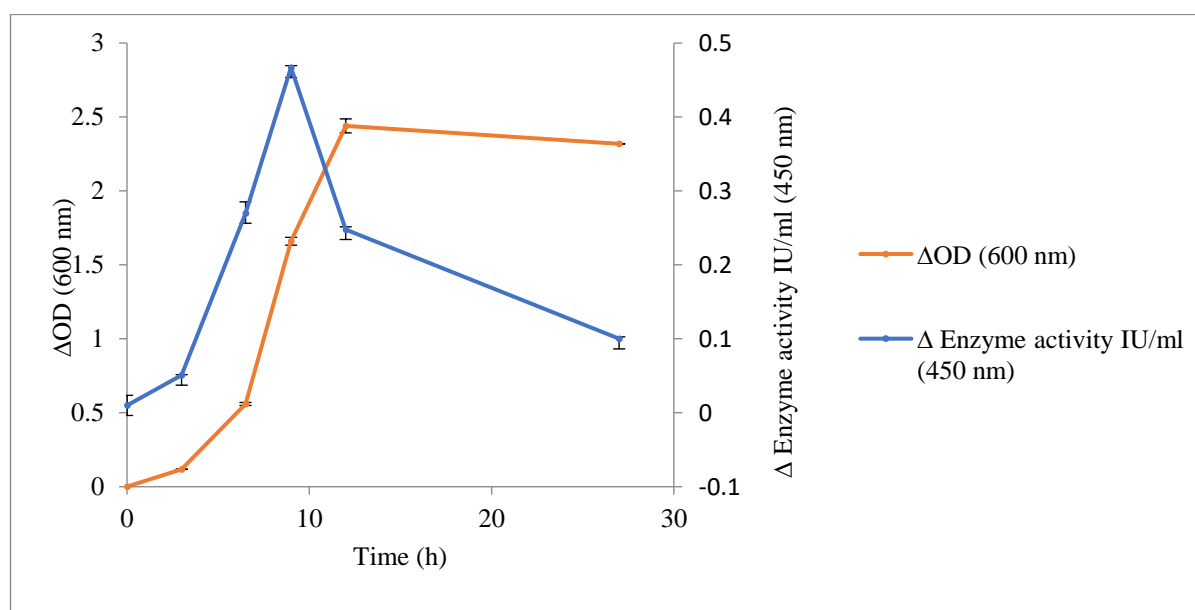
```



شکل ۸: نتایج حاصل از بررسی همولوژی نوکلئوتیدهای تعیین توالی شده 16S rDNA باکتری SHN1 در NCBI. این جدایه همولوژی ۹۸٪ با باکتری *Rhizobium nepotum* نشان می‌دهد.

فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

فعالیت آنزیمی جدایه SHN1 در محیط مایع M9 تغییر یافته در دور شیکر rpm ۱۸۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس از زمان تلقیح باکتری و به صورت همزمان با اندازه‌گیری تغییرات فاز رشدی باکتری، اندازه‌گیری شد و نتایج در شکل ۹ آورده شده است. این نتایج بیانگر این است که باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 بیشترین فعالیت آنزیمی را در فاز لگاریتمی ($\Delta OD = 1.66$) و به میزان ۰/۴۶۷ IU/mL داشته است.



شکل ۹: بررسی ارتباط فعالیت آنزیمی و کدورت، در طول زمان تلقیح جدایه باکتری SHN1 در محیط کشت M9 تغییر یافته با ۱٪ گلوکز، ۱٪ آسپاراژین، دور شیکر rpm ۱۸۰ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس. بارها نمایانگر انحراف معیار (SE) می‌باشند.

منحنی استاندارد آمونیوم سولفات

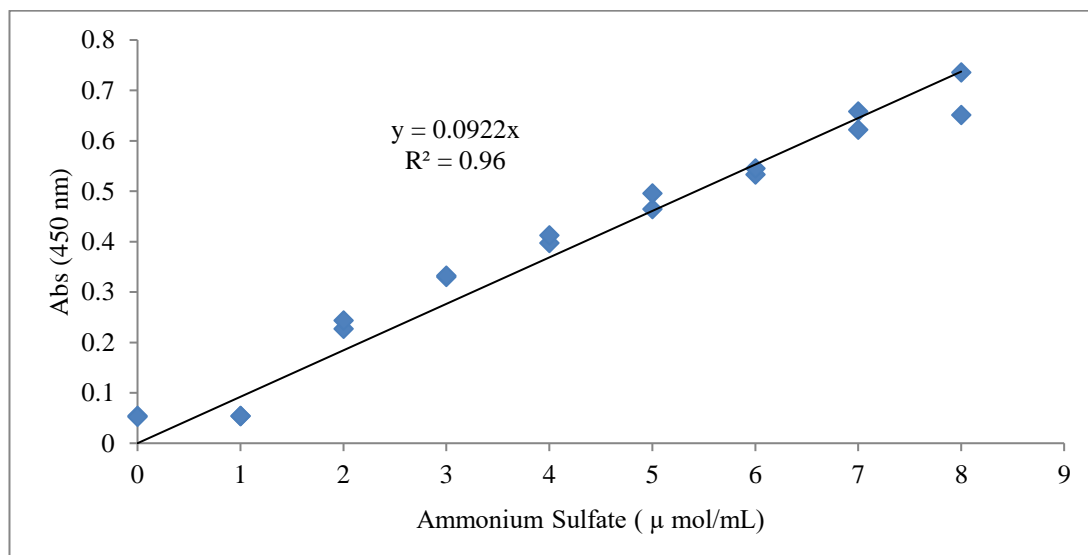
به منظور محاسبه فعالیت آنزیمی و تعیین میزان میکرومول آمونیوم آزاد شده در طی واکنش آنزیمی این جدایه،

$$Y = 0.0922x, R^2 = 0.96$$

منحنی استاندارد با معادله خطی زیر بدست آمد.

در این رابطه Y برابر با میزان جذب خوانده شده با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر و X برابر با میزان

میکرومول آمونیوم در میلی لیتر می باشد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: منحنی استاندارد آمونیوم سولفات. این منحنی ارتباط جذب خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر را با میزان میکرومول آمونیوم نشان می دهد.

فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز

میزان فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز در جدایه *Rhizobium nepotum* SHN1 محاسبه و به میزان ۰/۰۱۵ IU/mg

بدست آمد.

میزان پروتئین در محلول رویی به روش لوری

میزان پروتئین موجود در محلول رویی جدایه *Rhizobium nepotum* SHN1 در فاز لگاریتمی که بیشترین فعالیت آنزیمی

را نشان داه بود، با روش پروتئین سنجی لوری و با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین سنجی ۳۰/۵۲ میلی گرم پروتئین در

میلی لیتر محاسبه شد.

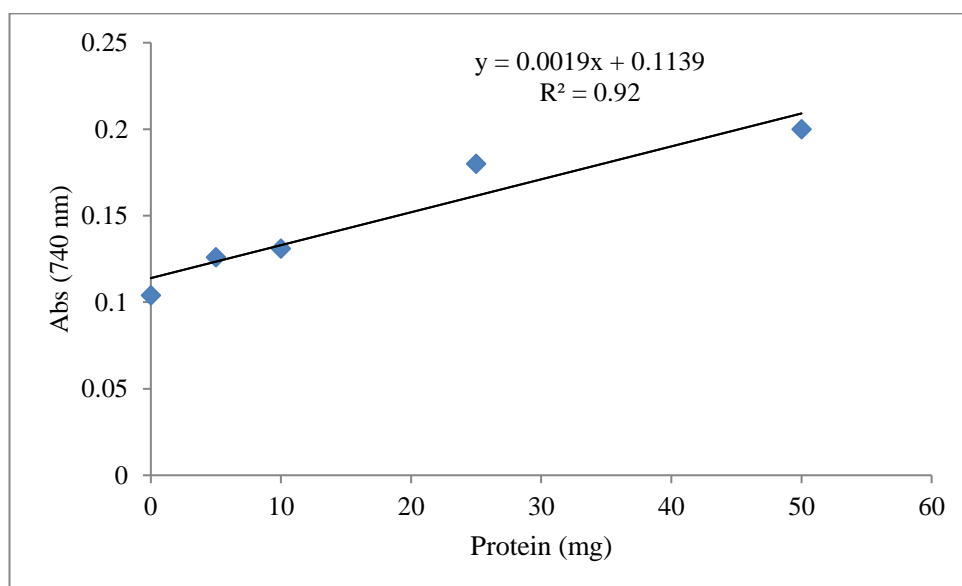
منحنی استاندارد پروتئین سنجی با روش لوری

به منظور محاسبه میزان پروتئین موجود در محلول رویی باکتری با روش پروتئین سنجی لوری، منحنی استاندارد با معادله خطی زیر بدست آمد.

$$Y = 0.0019x + 0.1139, R^2 = 0.92$$

در این رابطه Y برابر با میزان جذب خوانده شده با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۷۴۰ نانومتر و X برابر با میزان

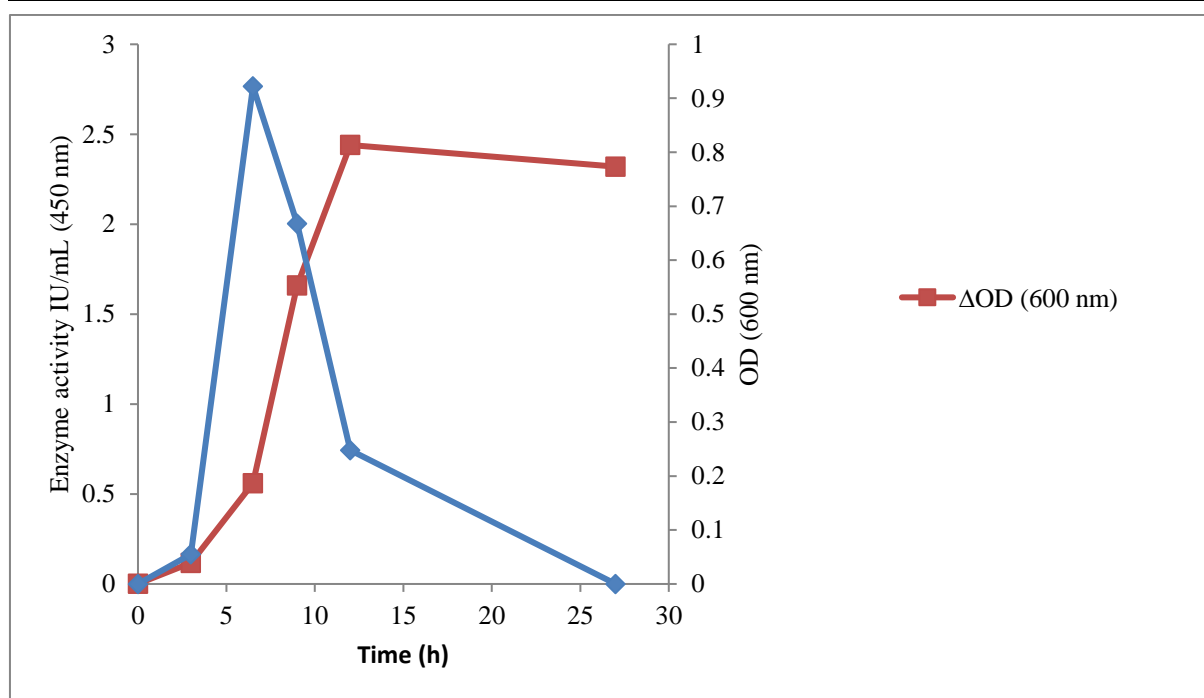
پروتئین بر حسب میلی گرم می باشد (شکل ۱۱).



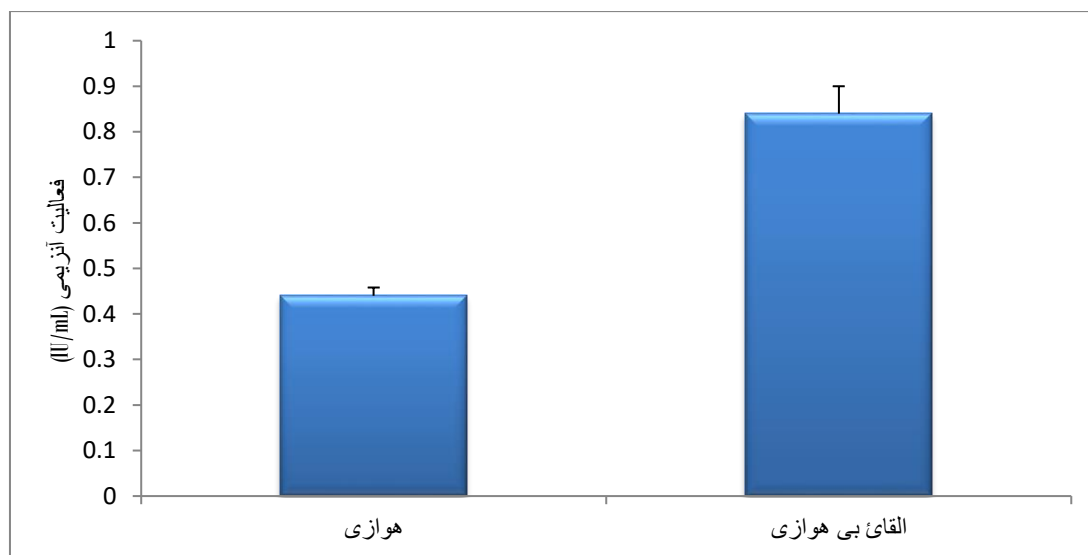
شکل ۱۱: منحنی استاندارد پروتئین سنجی به روش لوری. این منحنی ارتباط جذب خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر را با میزان میلی گرم پروتئین نشان می دهد.

تاثیر القای بی هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II

بررسی فعالیت آنزیمی جدایه SHN1 در محیط مایع M9 تغییر یافته در شرایط القا بی هوازی به مدت ۱ ساعت نشان داد که باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 بیشترین فعالیت آنزیمی را در فاز لگاریتمی ($OD = 1.66$) در شرایط بی هوازی ۱ ساعته به میزان 0.922 IU/mL دارا می باشد (شکل ۱۲). همچنین تفاوت در میزان فعالیت آنزیمی در شرایط هوازی و شرایط القا بی هوازی به دلیل عدم پیروی داده ها از توزیع نرمال ($P\text{-Value Shapiro-Wilk} = 0.01$) توسط آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney در نرم افزار SPSS v19 بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیمی در شرایط القا بی هوازی با میانگین $(\pm SE) 0.006$ به طور معنی داری بیش از فعالیت آنزیمی در شرایط هوازی با میانگین $(\pm SE) 0.018 \pm 0.044$ می باشد ($Mann - U = 0.000, Z = -1.96, P = 0.05$) (شکل ۱۳).



شکل ۱۲: فعالیت آنزیمی و OD (600 nm) جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 در شرایط القا بی‌هوازی.



شکل ۱۳: بررسی فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز II در شرایط هوازی و شرایط القا بی‌هوازی (۱ ساعته) در جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1.

بحث

ال-آسپاراژینازها (L-asparagine amidohydrolase E.C.3.5.1.1) آنزیم‌هایی هستند که هیدرولیز ال-آسپاراژین به ال-آسپاراتات و آمونیوم را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها توسط تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند *Escherichia coli* (Campbell et al., 1969, 1967)، *Erwinia cartovora* (Maladkar et al., 1993)، *Enterobacter aerogenes* (Mukherjee et al., 2000).

Vibrio Succinogenes, (Kil et al., 1995) *Candida utilis*, (Mesas et al., 1990) *Corynebacterium glutamicum* (Lubcowski et al., 2003)، *Thermus thermophilus* (Pritsa et al., 2001) و *Rhizobium etli* (Ortuno – Olea et al., 2000) و ... تولید می‌شوند. کاربرد این آنزیم در علوم پزشکی به عنوان داروی ضد سرطان و در صنایع غذایی به عنوان جلوگیری کننده از تشکیل ماده سرطان زا اکریل‌آمید، سبب مطالعات گسترده‌ای در طی چندین دهه بر روی این آنزیم (منابع تولید آن، مکانیسم عمل آنزیم، ساختار آنزیم، خالص‌سازی آنزیم، عوارض جانبی آنزیم در درمان و پیدا کردن منابع تولید آنزیم با عوارض جانبی کمتر، کلون نمودن ژن آنزیم، بیان پروتئین ال-آسپاراژیناز در مقیاس کوچک و بزرگ) شده است که نهایتاً در زمینه درمان بتوانند به تولید داروی موثرتر با حداقل عوارض جانبی و قیمت ارزانتر برسند و در سایر صنایع هم به حداکثر استفاده از آن نایل شوند. این مهم ما را نیز به تلاش جهت پیدا کردن منبع باکتریایی تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز نوع دوم با خصوصیت گلوتامینازی کمتر یا فاقد خاصیت گلوتامینازی آنزیم آسپاراژیناز به منظور کاهش عوارض جانبی این آنزیم، برانگیخت. باکتری جداسازی و خالص سازی شده از آب دریای خلیج فارس در منطقه قشم دارای خاصیت آسپاراژینازی نسبتاً خوب و فاقد فعالیت گلوتامینازی بود. این باکتری با شناسایی مولکولی متعلق به خانواده *Rhizobiaceae* و تا ۹۸ درصد متعلق به گونه *Rhizobium nepotum* می‌باشد. پیش از بدست آمدن نتایج شناسایی مولکولی، برخی مطالعات بیوشیمیایی روی این باکتری انجام شد که با بسیاری از ویژگی‌های بیوشیمیایی که شهزاد و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی باکتری *Rhizobium meliloti* انجام داده بودند، هم‌خوانی داشت (کاتالاز مثبت، متیل رد منفی، وی پی منفی، اندول منفی، سیمون سترات منفی، تولید H_2S منفی). مطالعات رزاهون و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز ساختار میله‌ای شکل، گرم منفی، بدون توان حرکت را در *Rhizobium papuli* بیان نموده که در این خصوصیات ذکر شده با باکتری مورد مطالعه ما از نظر جنس هم‌خوانی داشت. همچنین Gupta و Ghorpade در سال ۲۰۱۶ نتایجی از تست‌های بیوشیمیایی *Rhizobium nepotum* را ارائه دادند که با تمام تست‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی جدایه باکتری این مطالعه مطابقت داشته است. بر این اساس شناسایی این جدایه در حد گونه *Rhizobium nepotum* با اطمینان بیشتری مورد تأیید قرار گرفت و چون این گونه از آب‌های ساحلی خلیج فارس جداسازی شد با عنوان strain SHN1 نامگذاری شد. جداسازی جنس *Rhizobium* از آب دریای شمالی چین نیز توسط لیو و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش شده است که این نتیجه، امکان زیست باکتری مورد مطالعه ما را در آب دریای جنوب ایران تا حدودی مورد تأیید قرار می‌دهد، البته بررسی‌های بیشتر در رابطه با تحمل شوری جدایه مورد مطالعه ما، مورد نیاز است، همچنین لازم به ذکر است که جدایه‌هایی از جنس *Rhizobium* مقاوم به شوری هم توسط مناسری و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش شده است.

در این پژوهش جهت غربالگری کیفی باکتریها از نظر تولید آنزیم، سویه‌ها بر روی محیط M9 حاوی فنل رد کشت داده شدند. فنل رد در pH اسیدی زرد رنگ و در pH قلیایی قرمز رنگ می‌شود. اگر باکتری مولد آنزیم باشد با تبدیل آسپاراژین

به آمونیاک باعث قلیایی شدن pH محیط و در نتیجه باعث قرمز شدن رنگ آن می‌شود. پورانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ و باشا و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز از این محیط جهت غربالگری اولیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کردند. مقدار آنزیم تولیدی در این پژوهش بر اساس روش نسلریزاسیون (Nesslerization method) بررسی گردید. آنزیم آسپاراژیناز با اثر بر روی سوبسترای خود (آسپاراژین) اسید آسپارتیک و آمونیاک تولید می‌کند. معرف نسلر (Nessler reagent) با یونهای آمونیوم آزاد شده در محیط، واکنش داده و باعث زرد شدن رنگ محلول می‌شود. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

از آنجایی که آنزیم آسپاراژیناز II حاوی پپتید نشانه بوده و وارد فضای پریپلاسمی می‌شود (Mathews & Brown, 1974)، در این پژوهش محتویات پریپلاسمی و نیز محیط کشت فاقد باکتری (محلول رویی) جهت بررسی آسپاراژیناز استفاده شد. فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در عصاره پریپلاسمی (محلول رویی) سویه مورد آزمایش با روش نسلر ۰/۴۶۷ IU/mL بود. ایزد پناه قشمی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آنزیمی اسینتو باکتر سویه PF-14 جدا شده از آب خلیج فارس را ۰/۰۷ IU/mL و در سویه سودوموناس جدا شده از آب خلیج فارس را ۶/۱ IU/mL گزارش نمودند. بمبئی و قانع در سال ۲۰۰۹ فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز در عصاره پریپلاسمی سویه های *E. coli* (DH5α, LAB, K12, TOPTEN) ۳/۶ unit/mL گزارش دادند.

گزارشی در رابطه با میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II در باکتری *Rhizobium nepotum* در سایر نقاط دنیا مشاهده نشد. این فعالیت آنزیمی بدست آمده جدایه مورد تحقیق (۰/۴۶۷ IU/mL) قطعا با بهینه سازی شرایط برای تولید آنزیم (دما، pH، منابع کربن و نیتروژن مناسب، میزان هوادهی و ...)، افزایش چشمگیر تری نشان خواهد داد. با مقایسه اعداد بدست آمده برای فعالیت آنزیم آسپاراژیناز می‌توان گفت، دلایل متفاوتی برای این اختلاف وجود دارد از جمله نوع باکتری، معرف نسلر، منحنی استاندارد، مقدار آنزیم مورد سنجش، زمان انکوباسیون و مقدار معرف نسلر. همچنین در صورتی می‌توان یک آنزیم را برای کارهای دارویی و پزشکی استفاده کرد که توانایی آن آنزیم در از بین بردن سلول‌های سرطانی پس از بررسی‌های مختلف و انجام مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی در نهایت خط سلولی تایید شود و در نهایت توسط FDA تایید گردد.

افزایش تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در شرایط القای بی‌هوازی تا حدود ۲ برابر شرایط هوازی در جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 مشاهده شد. شوارتز و سداردر سال ۱۹۶۸ از افزایش تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز II در باکتری *E. coli* با القا شرایط بی‌هوازی، گزارش دادند. همچنین بیلیموریا در سال ۱۹۶۹ در رابطه با تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز II در *E. coli*، پی برد که هوادهی آرام شرایط مناسبی را برای رشد خوب باکتری و میزان بالای آنزیم فراهم می‌کند، در حالیکه هوادهی قوی رشد خوب باکتری را سبب می‌شود ولی کاهش تولید آنزیم را به همراه دارد. به عبارتی هوادهی و تکان دادن ارلن حاوی کشت باکتری‌ها، عوامل تعیین کننده‌ای در میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز هستند. مطالعات انجام شده توسط شوارتز و همکاران (۱۹۶۶) نشان داد که تولید آنزیم در محیط کشت تنها در صورت تغییر شرایط از حالت هوازی به بی‌هوازی امکان پذیر است. در تحقیق حاضر با القا شرایط بی‌هوازی میزان بیان آسپاراژیناز در محلول رویی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت. دلیل

این امر نیز مربوط به پروموتور ژن *ansB* است. این امر نیز مربوط به پروموتور ژن *ansB* است. این پروموتور در شرایط هوازی توسط مهار کننده حساس به اکسیژن غیرفعال است. در شرایط کمبود اکسیژن این مهارکننده از پروموتور جدا شده و آنزیم RNA پلی‌مراز می‌تواند ژن را رونویسی کرده و به کمک ریبوزوم‌ها منجر به تولید پروتئین شود. از آنجایی که باکتری *Rhizobium nepotum* هوازی اجباری بوده و بهترین شرایط رشد آن در حالتی است که اکسیژن محلول در محیط کشت در حد مناسبی جهت تولید توده سلولی باشد، این امر موجب تضاد درونی می‌گردد. یعنی تولید آنزیم، شرایط بی‌هوازی را می‌طلبد و تولید توده سلولی نیاز به هوادهی دارد. یکی از راه‌حل‌های انجام شده، دو فاز باکتری‌هاست. در این روش ابتدا باکتری در شرایط هوازی رشد داده می‌شود تا توده سلولی به میزان مناسبی برسد و سپس اقدام به القا و تغییر شرایط از هوازی به بی‌هوازی می‌شود تا آنزیم آسپاراژیناز با میزان بیشتری بیان شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر محمدرضا شگری بدلیل راهنمایی در انجام آنالیزهای آماری و آقای دکتر داریوش مینایی تهرانی بدلیل راهنمایی در انجام آزمایشات بیوشیمیایی و خانم زهرا جاویدان به موجب مساعدت در استفاده از مواد و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Badoei-Dalfard, A., Karami, Z. and Ramezani-pour, N. (2016) Isolation and identification of L-asparaginase producing *Erwinia* strains which isolated from potato farms. *Biological Journal of Microorganism*, 5(18): 55-67.
- Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. (2009) Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4): 353-360.
- Batool, T., Makky, E.A., Jalal, M. and Yussof, M.M. (2016) A comprehensive review on L-Asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(5): 900-923.
- Bilimoria, M.H. (1969) Conditions for the production of L-asparaginase 2 by coliform bacteria. *Applied Microbiology*, 18: 1025-1030.
- Borek, D. and Jaskolski, M. (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48: 893-902.
- Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A. and Old, L.J. (1967) Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. their separation, purification and antitumor activity. *Biochemistry*, 6: 721-727.
- Cedar, H. and Schwartz, J.H. (1968) Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 96: 2043-2048.

- Ghane, M., Bambaie, B. (2009) Screening of *Esherichia coli* strains for asparaginase ii production. *Biological Sciences (Danish-I Zisti-I Iran)*, 3(4): 47-54.
- Ghorbanmovahed, M., Ebrahimipour, G., Akhtari, J. and Marzban, A. (2015) Production of anti-leukemia L-Asparaginase by a strain of *Staphylococcus* isolated from agricultural soil. *Journal of Mazandaran University of Medical Science*, 25(132): 1-12.
- Ghorpade, V.M. and Gupta, S.G. (2016) Siderophore production by *Rhizobium nepotum* isolated from stem nodule of *Aeschynomene indica*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(7): 105-108.
- Gokmen, V. and Palazoglu, T. K. (2008) Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying. *Food and Bioprocess Technology*, 1: 35-42.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. and Isono, M. (1973) Asparaginase and glutaminase activities of microorganism. *Journal of General Microbiology*, 76(1): 85-99.
- Izadpanah Qeshmi, F., Javadpour, S., Malekzadeh, K., Tamadoni Jahromi, S. and Rahimzadeh, M. (2004) Persian Gulf is a bioresource of potent L-Asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating. *International Journal of Environmental Research*, 8(3): 813-818.
- Kil, J.O., Kim, G.N. and Park, I. (1995) Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59: 749-750.
- Kotzia, G.A. and Labrou, N.E. (2009) Engineering thermal stability of l-asparaginase by in vitro directed evolution. *FEBS Journal*, 276: 1750–1761.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing pp. 115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Liu, Y., Wang, R.P., Ren, C., Lai, Q.L. and Zeng, R.Y. (2015) *Rhizobium marinum* sp. nov., a malachite-green-tolerant bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12): 4449-4454.
- Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A. and Dauter, Z. (2003) Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(1): 84-92.
- Maladkar, N.K., Singh, V.K. and Naik, S.R. (1993) Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia cartovora* EC-113. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 35: 77-86.
- Mathews, W. and Brown, H. (1974) Isolation of two L-Asparaginases from Guinea pig liver. *Enzyme*, 17(5): 276-86.
- Mesas, J.M., Gil J.A. and Martin, J.F. (1990) Characterization and partial purification of l-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology*, 136: 515-519.
- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M.E. and Mhamdi, R. (2007) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 187: 79–85.
- Mukherjee, J., Majumdar, S. and Scheper, T. (2000) Studies on nutritional and oxygen requirements for production of l-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnnology*, 53: 180-184.
- Narayana, K.J.P., Kumar, K.G. and Vijayalakshmi, M. (2008) L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 48: 331-336.

- Ortun-o-Olea, L. and Dura'n-Vargas, S. (2000) The L-asparagine operon of *Rhizobium etli* contains a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 177-182.
- Patro, K.K.R., Satpathy, S. and Gupta, N. (2011) Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. *The Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 1: 219-221.
- Poorani, E., Saseetharan, M. and Dhevagi, P. (2009) L-asparaginase production and molecular identification of marine *Streptomyces* sp. strain EPD 27. *International Journal of Integrative Biology*, 7: 150-155.
- Pritsa, A.A., Papazisis, K.T., Kortsaris, A.H., Geromichalos, G.D. and Kyriakidis, D. (2001) Antitumor activity of L-asparaginase from *Thermus thermophilus*. *Anticancer Drugs*, 12: 137-142.
- Rozahon, M., Ismayil, N., Hamood, B., Erkin, R., Abdurahman, M., Mamtimin, H., Abdukerim, M., Lal, R. and Rahman, E. (2014) *Rhizobium populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 3215–3221.
- Sanches, M., Barbosa, J.A.R.G., De Oliveira, R.T., Abrahão Neto, J. and Polikarpov, I. (2003) Structural comparison of *Escherichia coli*-asparaginase in two monoclinic space groups. *Acta Crystallographica Section D*, 59: 416-422.
- Savitri, A.N. and Azmi, W. (2003) Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 184-194.
- Schwartz, J.H., Reeves, J.Y. and Broome, J.D. (1966) Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 56: 1516.
- Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M.M. and Ahmad, Z. (2012) Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2): 522-524.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W. and Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46: 327–338.
- Wriston, J.C. (1970) Asparaginase. *Methods in Enzymology*, 17: 732-742.
- Yazdani, R., Mobini-Dehkordi, M. and Rastegari, A.A. (2012) Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. *Journal of Microbiology World*, 5(1&2): 39-46.

Isolation and characterization of a bacterium with free glutaminase L-Asparaginase II from the Persian Gulf

S. Shoaie Naeeni^{1*}, O. Ranaei Siadat², G. Ebrahimipour¹, B. Bambai³

Received:1396.06.16

Accepted:1397.12.19

Abstract

L-asparaginase enzyme has various applications, particularly in medicine and food industry. Given some side effects and adverse possession of a minor amount of glutaminase activity, the search for new sources of microbes producing glutaminase-free L-asparaginase type II is underway. The present study aimed to isolate a bacterium from the Persian Gulf that produces glutaminase-free L-asparaginase type II. It is also aimed to measure the amount of this enzyme and the condition under which it increases. In order to assess the capability of extracellular asparagine production, the isolated bacteria from the seawater were cultured in M9 medium containing phenol red and asparagine. Those bacteria with positive asparaginase test were cultured in M9 medium containing glutamine and phenol red to assess their glutamine activity. The bacterium isolate producing asparaginase was identified using morphological and biochemical means and 16 SrDNA. L-asparaginase enzyme activity of the isolate was explored with a colorimetric method. The effect of anaerobic condition on the amount of L-asparaginase type II activity was explored by culturing under aeration condition and with no aeration. The result showed that the isolated bacterium was *Rhizobium nepotum* strain SHN1. The asparaginase enzyme activity and the specific activity of this bacterium were 0.467 IU/mL and 0.015 IU/mg, respectively. These characteristics increased to more than 50% in anaerobic condition. The results indicated that microbial flora from the Persian Gulf flora could be a remarkable source of glutaminase-free L-asparaginase enzyme.

Key words: L-asparaginase enzyme, *Rhizobium nepotum*, glutamination

1-Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran

*(Corresponding author: Saloomeh Shoaie Naeeni, saloomeh.sh@gmail.com)

2-Protein Research Center of Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran

3-National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Karaj Highway

طراحی و ساخت سامانه الکترومغناطیس کننده با نانو فیلترهای مؤثر به منظور افزایش تولید و

کاهش آلودگی زیست محیطی در آبیاری محصولات کشاورزی

شاهین شرفالدین شیرازی^{۱*}، منصور نجاتی جهرمی^۲، مهدی سیمیری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۴

چکیده

آب عنصر حیاتی برای بقا و حفظ کیفیت و منابع آن برای هر کشوری حائز اهمیت است. به منظور بررسی اثر میدان مغناطیسی و نانو فیلتر بر آب آبیاری بر برخی صفات رشدی گیاه گوجه‌فرنگی شامل روز تا جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، ارتفاع گیاه، طول ریشه‌چه، وزن تر و خشک، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان جذب عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و آهن در برگ‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار با دو سطح میدان مغناطیسی، چهار سطح نانو فیلتر و سه سطح گردش آب صورت گرفت. به طور کلی نتایج نشان داد که میدان مغناطیسی اثر مطلوبی بر صفات مورد بررسی داشت و نانو فیلتر اثر کم‌تری از خود نشان داد. در اثر متقابل عوامل نیز میدان مغناطیسی مؤثرتر واقع گردید. در نهایت بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش، دستگاه مغناطیس کننده ساخته شد که این دستگاه نیاز به مصرف کودهای شیمیایی را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و از اثرات سوء زیست محیطی آنان می‌کاهد.

واژه‌های کلیدی: آب، آلودگی زیست محیطی، صفات رشدی، میدان مغناطیسی، نانو فیلتر

مقدمه

رشد روز افزون جمعیت و محدودیت منابع غذایی، بشر را با چالش بزرگ امنیت غذایی و بحران‌های منطقه‌ای و بین‌المللی روبه‌رو کرده است. آب یکی از مواد مایع و فراوان‌ترین ماده مرکب بر روی سطح کره زمین و بستر اولیه حیات به شکلی که امروزه می‌شناسیم، است (دیوی، ۲۰۰۸). هیچ کشوری بدون اطمینان از داشتن آب نمی‌تواند ثبات اقتصادی، اجتماعی و سیاسی خود را حفظ کند و بدون کاهش میزان آلودگی جو، امنیت نسل‌های آتی از نظر آب و غذا مبهم و بدین طریق توسعه پایدار فقط در حد یک شعار دل‌فریب باقی خواهد ماند (کندی و همکاران، ۱۳۹۴). برآور (۲۰۱۵) اعلام نمود که pH نمونه آب مورد آزمایش تحت تأثیر میدان مغناطیسی، از ۹/۲ به ۷/۵ کاهش یافت. در پژوهش پیدرسین (۲۰۱۵) مشخص شد که بیشترین

۱ - کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی - زراعت، تهران

* (نویسنده مسئول : sharafaldinshirazi.shahin@gmail.com)

۲ - دکتری برق - مخابرات، دانشگاه علوم و فنون هوایی شهید ستاری، تهران

۳ - دکتری فناوری نانو - نانو مواد، دانشگاه امام علی (ع)، تهران

تأثیر آب مغناطیسی افزایش میزان تبلور و محتوای گازهای آزاد بود. گاز زدایی آب موجب افزایش قابلیت نفوذپذیری در خاک و در نتیجه افزایش راندمان مصرف آب گردید.

در ادامه، اثر آب مغناطیسی بر جوانه‌زنی نخودفرنگی (*Pisum sativum*) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که دانه‌های تحت تأثیر آب مغناطیسی ۱۰۰ درصد جوانه زدند در حالی که میزان جوانه‌زنی در دانه‌های شاهد ۸۵ درصد بود. همچنین در مدت زمان آزمایش، سرعت رشد و ارتفاع نمونه‌های تحت آبیاری با آب مغناطیسی بیشتر از شاهد بود. بانژاد و همکاران (۱۳۹۲) اثر متقابل آب مغناطیسی و شوری بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) را بررسی نمودند. نتایج حاصل نشان داد که آب مغناطیسی اثر معنی‌دار مثبتی بر عملکرد گیاه داشت. همچنین توانست تا حد زیادی از اثر منفی شوری آب بکاهد. اثر کاربرد آب مغناطیسی روی سبز شدن بذر ذرت در بستر شنی مورد مطالعه محمود و همکاران (۲۰۱۴) قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که آب مغناطیسی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی، کوتاه شدن تعداد روز تا سبز شدن، افزایش سرعت رشد، افزایش وزن تر و خشک و همچنین کلروفیل‌ها شده است. براور (۲۰۱۵) چگونگی عبور آب از میدان مغناطیسی را تشریح نمود. حرکات دو قطبی مولکول‌های جامدات و نیز مولکول‌های آب تحت تأثیر آهنربا به کریستالیزه شده و مانند کریستال به لایه‌های نازک و یون‌های در امتداد محورهای مغناطیسی درمی‌آیند. سپس میدان مغناطیسی بر تولید فزاینده نوکلئومولکول‌ها تأثیر می‌گذارد. بنابراین ذرات جامد به صورت کریستال‌های بهینه در خواهند آمد که تمایل به جدا ماندن دارند چراکه دچار بارهای اضافی یکسان شده‌اند. در این حال پودر کلسیم کربنات، خمیر مانند شده که در این صورت به ذرات و یا سطوح لوله‌ها نخواهد چسبید.

همچنین در رابطه با میزان دبی، هر چند که هنوز قطعی ارائه نشده، شرکت بین‌المللی پلار گزارش کرده است که سرعت مناسب عبور مایع از میدان مغناطیسی ۱/۵ تا ۳ متر بر ثانیه است، چراکه دبی بالا مانع از ارتباط کافی با میدان مغناطیسی خواهد شد. از طرفی دیگر، شرکت‌های دیگری نظیر سی‌ای-پی-آی (CEPI) اعلام نموده‌اند که کاهش شدت جریان محلول می‌تواند منجر به اختلال و آشفتگی محلول مغناطیس شده شود. بر اساس گزارش ماسین و ایگناتو (۲۰۱۵)، سرعت مناسب جریان محلول ۰/۵ تا ۲ متر بر ثانیه است. یافته‌های گبریلی و همکاران (۲۰۰۰) و براور (۲۰۱۵) نیز نشان داد که چیدمان متناوب آهنرباها اثری بهتر بر کاهش جرم و رسوبات در مقایسه با چیدمان غیر متناوب آهنرباها دارد. بر اساس گزارش آن‌ها، روکار بودن دستگاه مغناطیس کننده نیز اثر گذارتر خواهد بود.

در پژوهشی که توسط چین و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت مشخص گردید که نانوفیلتراسیون می‌تواند بیش از ۹۰ درصد ترکیبات آلوده کننده موجود در آب را حذف نموده و در نتیجه منجر به افزایش کیفیت و بهبود وضع بهداشتی (حذف باکتری‌ها و ویروس‌ها) می‌گردد. کارنیک و همکاران (۲۰۱۵) متوجه شدند که نانوفیلتراسیون باعث افزایش کیفیت آب خروجی و نیز کاهش رسوبات و ترکیبات جانبی می‌گردد. در پژوهش الکساندر و همکاران (۲۰۱۵) بر روی اثر نانوفیلتراسیون بر سختی

زدایی آب این نتیجه حاصل شد که نانوفیلتراسیون در pH ۷ تا ۹ بیشترین میزان حذف آلاینده‌ها، رسوبات، باکتری‌های و ویروس‌ها را داراست.

مواد و روش‌ها

آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام شد. بذره‌های گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) از مؤسسه بذر و نهال کرج با قوه‌نامه ۸۵ درصد تهیه شدند. بذرها در گلدان‌هایی با مخلوط مساوی خاک، کود دامی و ورمی کمپوست کاشته شدند. آبیاری به طور منظم در فواصل معین انجام پذیرفت. نتایج حاصل از آزمون نمونه خاک در جدول ۱ آمده است.

طرح مورد استفاده شامل دو سطح میدان مغناطیسی (m_0 = عدم حضور میدان مغناطیسی و m_1 = حضور میدان مغناطیسی)، چهار سطح نانو فیلتر (f_0 = بدون فیلتر، f_1 = فیلتر پیش از ورود به میدان مغناطیسی، f_2 = فیلتر پس از خروج از میدان مغناطیسی و f_3 = فیلتر پیش از ورود و پس از خروج از میدان مغناطیسی) و سه سطح گردش آب (x_1 = یک بار گردش، x_2 = سه بار گردش و x_3 = پنج بار گردش) از میدان مغناطیسی با سه تکرار بود. در آذر ماه ۱۳۹۵ بذرها کاشته شدند و در هر کرت سه گلدان قرار گرفت.

جدول ۱: برخی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Cu	Zn	Mn	Fe	Mg	Ca	K	P	N	T.N	O.C	EC	
									mg/kg	%	dS/m	
۲/۶۰	۰/۶۸	۹/۹	۷/۴	-	-	۷۲۶	۱۶	۸/۱۹	۰/۰۷۲	۰/۷۰	۰/۹۲	۷/۳ لومی رسی

^۱- فرم قابل جذب عناصر غذایی اندازه‌گیری شده.

نتایج حاصل از آنالیز آب مورد استفاده به در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: خصوصیات شیمیایی آب مورد استفاده

B	SAR*	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	CL ⁻	HCO ³⁻	pH	EC	O
(mg.kg ⁻¹)		(meq.l ⁻¹)	(meq.l ⁻¹)	(meq.l ⁻¹)	(meq.l ⁻¹)	(meq.l ⁻¹)		(dS/m)	(mg.l ⁻¹)
۰/۵۶	۶	۶	۱/۲	۳/۷	۶	۴/۳	۷/۶۳	۰/۹۸۳	۵/۴۸

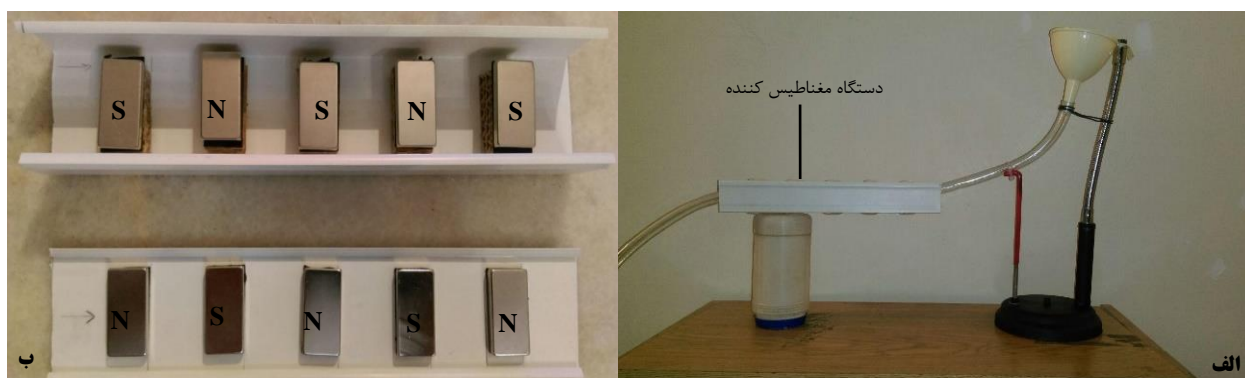
* نسبت جذب سدیم

با توجه به توصیه پژوهشگران، حداقل نیروی مغناطیسی لازم برای تأثیر بر آب ۳۰۰۰ گوس است که بهتر است از آهنربای دائمی و جهت عبور جریان از داخل میدان مغناطیسی از لوله‌هایی از جنس استیل، مس و یا پی‌وی‌سی استفاده شود

(ماسین و ایگناتو، ۲۰۱۵). به دلیل عدم دو قطبی بودن لوله‌های پی‌وی‌سی، حداکثر جریان مغناطیسی به مولکول‌های دو قطبی آب نفوذ می‌نماید که می‌تواند بهترین نتیجه را حاصل نماید. البته در آهنرباها با توان‌های بالا نیز می‌توان از لوله‌های استیل استفاده نمود. این امر موجب می‌شود که لوله به صورت آهنربای ثانویه عمل نموده و محیط مؤثر میدان مغناطیسی را افزایش دهد (براور، ۲۰۱۵).

در طی مراحل جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاه، صفات روز تا جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی اندازه‌گیری شدند و پس از رسیدن گیاه به مرحله ۳ تا ۴ برگ برداشت صورت گرفت و سایر صفات اندازه‌گیری شدند. برگ‌های ردیف نخست برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی و ردیف دوم به منظور اندازه‌گیری عناصر جذب شده استفاده شدند.

در مرحله آزمایشگاهی، دستگاهی آزمایشی، جهت انجام آزمون‌ها ساخته شد (شکل ۱ - الف). از این‌رو، از پنج عدد آهنربا با توان ۳۲۰۰ گوس از جنس نئودیم (شکل ۱ - ب) و برای فیلتر نمودن آب نیز از نانو فیلتر ۲۰۰ نانومتری GVS ساخت ایالات متحده (Reference No.: FJ25ASCCA002DL01) استفاده گردید. چیدمان آهنرباها به صورت متناوب و روکار بود.



شکل ۱: نمونه آزمایشی دستگاه مغناطیس کننده (الف) و چیدمان آهنرباها (ب)

دبی جریان عبوری توسط فلومتر الکترومغناطیس کانال باز رزمونت (Rosemount) مدل ۸۷۰۰ روی ۱ متر بر ثانیه تنظیم گردید. همچنین جنس لوله مورد استفاده جهت عبور آب پی‌وی‌سی بود. نمونه‌های آب بر اساس طرح پیش از هر مرحله آبیاری تهیه شدند. درصد جوانه‌زنی و تعداد روز تا جوانه‌زنی یادداشت گردید.

برای محاسبه درصد جوانه‌زنی بذر از فرمول ۱ استفاده شد (اجمل خان و همکاران، ۲۰۱۴).

$$100 \times (\text{کل بذر کشت شده} / \text{تعداد بذرهای جوانه زده}) = \text{درصد جوانه زنی} \quad (1)$$

همچنین سرعت جوانه‌زنی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید (اجمل خان و همکاران، ۲۰۱۴).

$$V_g = \sum \frac{Ni}{Di} \quad (2)$$

که در آن:

V_g : سرعت جوانه‌زنی برحسب تعداد بذر در روز، N_i : تعداد بذر جوانه‌زده در هرروز و D_i شماره روز می‌باشد.

برای اندازه‌گیری ارتفاع گیاه و طول ریشه‌چه از خطکش فلزی استفاده شد. وزن تر گیاهان بلافاصله پس از برداشت توسط ترازوی دیجیتالی چهار صفر AND مدل HR توزین شدند. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، گیاهان مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند و پس‌ازآن با ترازوی دیجیتالی چهار صفر توزین شدند (شرف‌الدین شیرازی ۱۳۹۲). برای سنجش کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید مقدار ۰/۰۵ گرم برگ تر را با ترازوی دیجیتالی سه صفر AND مدل GF-300 وزن نموده و با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده، سپس مخلوط به‌دست‌آمده را صاف نموده و با استن ۸۰ درصد به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Rayleigh مدل UV-1600 اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول استاندارد ارائه شده (۳-۶)، غلظت کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ تعیین شد (وبتهام و همکاران، ۱۹۷۱).

$$\text{Chl.b} = \left[\frac{12}{7} (A_{663}) - \frac{2}{69} (A_{645}) \right] \frac{V}{W} \times 1000 \quad \text{میلی‌گرم در گرم برگ وزن تر برگ} \quad (۳)$$

$$\text{Chl.b} = \left[\frac{22}{9} (A_{645}) - \frac{4}{68} (A_{663}) \right] \frac{V}{W} \times 1000 \quad \text{میلی‌گرم در گرم برگ وزن تر برگ} \quad (۴)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \times A_{470} - 470/8 \times \text{Chl.a} - 85/0.2 \times \text{Chl.b}}{198 \times 1000 \times W} \times 20 \quad (۵)$$

(۶)

(میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) کلروفیل a + کلروفیل b = کل کلروفیل

$$A_{663} = \text{جذب در } 663 \text{ نانومتر، } A_{645} = \text{جذب در } 645 \text{ نانومتر، } A_{470} = \text{جذب در } 470 \text{ نانومتر}$$

$$V = \text{حجم محلول، } W = \text{وزن برگ به میلی‌گرم، } C_{x+c} = \text{کاروتنوئید}$$

برای اندازه‌گیری میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ‌های جمع‌آوری‌شده با آب مقطر شسته، خشک و آسیاب شدند. سپس هضم عناصر فسفر و پتاسیم صورت گرفت. روش کار به این صورت است که یک گرم از پودر آسیاب شده (وزن شده با ترازوی دو صفر Sartorius مدل GM-312) موردنظر را در ظرف مخصوص کوره ریخته و به مدت ۷ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد کوره قرار گرفتند. پس از خنک شدن روی نمونه‌ها ۲ تا ۳ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته، سپس هیدروکلریک اسید ۲ مولار به میزان ۵ میلی‌لیتر به آن اضافه شد. محلول‌ها داخل بالن با درپوش به مدت یک ساعت بر روی هیتر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از خنک شدن حجم محلول‌های بالن‌ها با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس میزان

پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر و میزان فسفر با دستگاه اسپکتروفتومتر مشخص گردید (کارلا، ۱۹۹۸). در مورد نیتروژن، هضم تر به روش مخلوط سولفوریک اسید و سالیسیک اسید انجام شد. نمونه در مجاورت با سولفوریک اسید قوی آب خود را از دست می‌دهد و بیشترین قسمت مواد آلی در حرارت نسبتاً بالا اکسیده می‌شود. عمل هضم با وجود آب اکسیژنه در حرارت بالا کامل می‌گردد. اضافه کردن سالیسیک اسید برای انجام عمل احیای نیترات است. عصاره تهیه شده در این روش جهت اندازه‌گیری عناصر غذایی نیتروژن کل، کلسیم، منیزیم، منگنز، سدیم، پتاسیم و فسفر در اجزاء گیاه و کود آلی به کار می‌رود. بر همین اساس ۱۸ میلی‌لیتر آب مقطر داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ (۰.۹۶٪) به دفعات و در حجم‌های کم به آن افزوده شد. ۶ گرم سالیسیک اسید به محلول اضافه کرده و با کمک مگنت حل شد. سپس ۰/۳ گرم از نمونه برگ آسیاب شده (وزن شده با ترازوی دیجیتالی سه صفر AND مدل GF-300) را داخل بالن هضم ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط اسیدها اضافه شد. نمونه برای یک شب به حال خود رها گردید. روز بعد نمونه به مدت یک ساعت بر روی هیتر در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن نمونه‌ها حدود ۰/۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به آن‌ها افزوده و مجدداً به مدت ۷ دقیقه روی هیتر در دمای ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. دوباره پس از خنک شدن نمونه‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به آن‌ها اضافه شد و این عمل تا جایی که نمونه‌ها سفید شوند، ادامه یافت. نمونه‌ها پس از خنک شدن به بالن‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شدند در نهایت محلول‌ها به روش کجدال (روش کجدال یا کجدال در شیمی تجزیه روشی برای اندازه‌گیری کمی نیتروژن در مواد شیمیایی است که توسط یوهان کجدال در سال ۱۸۸۳ کشف شد. اساس آزمایش بر مبنای اندازه‌گیری کل نیتروژن موجود در غذاها با فرض بر این که تمام نیتروژن موجود از نوع پروتئینی بوده و با استفاده از ضرایب تبدیل نیتروژن به پروتئین استوار است. پس از مرحله هضم، مراحل تقطیر و تیتراسیون انجام می‌شوند.) ورد آنالیز قرار گرفتند (سیمون و همکاران، ۱۹۹۳).

پس از جمع‌آوری اطلاعات، اعداد و ارقام، تجزیه و تحلیل آماری نتایج توسط نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۴ انجام گرفت. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام و توسط نرم‌افزار MSTAT-C آنالیز شدند. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده میدان مغناطیسی بر تمامی صفات مورد بررسی در سطح ۱ درصد، معنی‌دار و مثبت بود. اثر ساده نانو فیلتر نیز بر تمامی صفات مورد بررسی به جز درصد جوانه‌زنی و میزان نیتروژن جذب شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل میدان مغناطیسی و نانو فیلتر بر صفات روز تا جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، وزن تر و خشک، کلروفیل b و کل، نسبت کلروفیل a به b، کاروتنوئیدها به کل کلروفیل و جذب عناصر در سطح احتمال ۱ درصد

و بر صفات سرعت جوانه‌زنی، کلروفیل a و کاروتنوئیدها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل میدان مغناطیسی و دفعات گردش آب بر صفات روز تا جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، ارتفاع، وزن تر و خشک، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و جذب فسفر و پتاسیم در سطح احتمال ۱ درصد و بر صفات درصد جوانه‌زنی، کلروفیل کل و جذب نیتروژن در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل هر سه عامل بر صفات سرعت جوانه‌زنی، ارتفاع، طول ریشه‌چه و جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر ساده گردش آب بر تمامی صفات تفاوتی را نشان نداد. (جدول ۳).

جدول ۳: تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات تحت تأثیر میدان مغناطیسی و نانو فیلتر بر ویژگی‌های آب آبیاری گوجه‌فرنگی

میانگین مربعات (MS)

منابع تغییر	درجه آزادی	روز تا جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	ارتفاع گیاه	طول ریشه‌چه	وزن تر گیاه	وزن خشک گیاه	Chl. a
تکرار	۲	۰/۷۹ ^{NS}	۲/۴۸ ^{NS}	۰/۰۴ ^{NS}	۰/۰۷ ^{NS}	۰/۲۷ ^{NS}	۰/۲۵*	۰/۰۱ ^{NS}	۱/۵۱ ^{NS}
میدان مغناطیسی (M)	۱	۱۱۵/۰۱**	۴۴۰/۵۹**	۷۲۶/۱۸**	۱۴۲/۴۹**	۳/۲۴**	۷۵/۳۵**	۷۱/۰۰**	۶۶/۴۵**
نانو فیلتر (F)	۳	۹/۷۱**	۲۱/۵۳ ^{NS}	۱۲/۴۴**	۳/۹۹**	۰/۵۵**	۰/۲۹**	۰/۳۲**	۶/۴۸**
دفعات گردش آب (X)	۲	۱/۵۴ ^{NS}	۴/۸۹ ^{NS}	۰/۰۱ ^{NS}	۰/۰۰۹ ^{NS}	۰/۰۹ ^{NS}	۰/۰۴ ^{NS}	۰/۰۹ ^{NS}	۰/۸۵ ^{NS}
M×F	۳	۲/۶۸**	۴/۹۴ ^{NS}	۰/۹۴*	۰/۱۷ ^{NS}	۱/۶۵**	۱/۰۲**	۱/۰۰**	۴/۵۲*
X×F	۶	۱/۱۸ ^{NS}	۵/۴۳ ^{NS}	۰/۰۳ ^{NS}	۰/۰۰۵ ^{NS}	۰/۰۶ ^{NS}	۰/۰۶ ^{NS}	۰/۰۲ ^{NS}	۰/۸۱ ^{NS}
M×X	۲	۸/۹۳**	۴۰/۳۳*	۲/۸۳**	۲/۲۰**	۰/۰۳ ^{NS}	۰/۸۲**	۰/۲۷**	۳/۳۱ ^{NS}
M×F×X	۶	۰/۵۴ ^{NS}	۶/۴۷ ^{NS}	۲/۰۲**	۰/۰۰۳**	۰/۰۳**	۰/۰۶ ^{NS}	۰/۰۹ ^{NS}	۰/۹۷ ^{NS}
خطا	۴۶	۰/۶۰	۸/۳۰	۰/۲۲	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۴	۱/۲۴
ضریب تغییرات (C.V)	—	۱۳/۰۳	۳/۱۹	۱/۵۱	۲/۷۱	۴/۲۲	۱/۸۱	۲/۲۲	۱۰/۶۰

ns، * و ** به ترتیب بیان‌گر عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

ادامه جدول ۳

میانگین مربعات (MS)

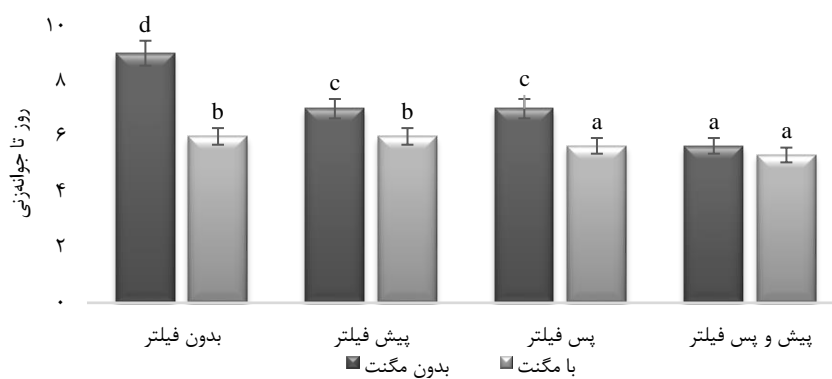
منابع تغییر	درجه آزادی	Chl. b	Chl. t	Car.	Chl. a/b	Car./Chl. t	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	آهن
تکرار	۲	۰/۰۷ ^{NS}	۲/۲۲ ^{NS}	۰/۰۰۵ ^{NS}	۰/۰۳ ^{NS}	۰/۰۰۰۴ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{NS}	۰/۰۳ ^{NS}	۱۹/۶ ^{NS}	۰/۱۹ ^{NS}
میدان مغناطیسی (M)	۱	۷۲/۱۸**	۲۷۷/۱۴**	۱۰/۴۷**	۸/۶۱**	۰/۰۰۰۶**	۰/۳۸**	۱۰۵/۹۹**	۱۱۴۶/۸**	۴۲/۰۵**
نانو فیلتر (F)	۳	۱/۵۲**	۱۴/۰۲**	۰/۰۸**	۰/۴۴**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۵ ^{NS}	۴/۰۷**	۷۶۹/۶**	۴/۸۲**
دفعات گردش آب (X)	۲	۰/۰۴ ^{NS}	۲/۲۶ ^{NS}	۰/۰۰۹ ^{NS}	۰/۰۴ ^{NS}	۰/۰۰۰۲ ^{NS}	۰/۰۰۴ ^{NS}	۰/۰۱ ^{NS}	۳۰/۲ ^{NS}	۰/۳۸ ^{NS}
M×F	۳	۲/۴۹**	۱۰/۲۱**	۰/۱۹*	۱/۱۹**	۰/۰۰۰۸**	۰/۰۲**	۶/۳۵**	۴۳۸/۸**	۶/۰۶**
X×F	۶	۰/۰۱ ^{NS}	۱/۰۹ ^{NS}	۰/۰۰۹ ^{NS}	۰/۰۵ ^{NS}	۰/۰۰۰۳ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{NS}	۰/۰۱ ^{NS}	۲۴/۱ ^{NS}	۰/۲۰ ^{NS}
M×X	۲	۰/۶۰**	۶/۶۷*	۰/۰۶**	۰/۰۰۹ ^{NS}	۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۰/۰۰۹*	۱/۸۰**	۱۱۶/۸**	۰/۰۸ ^{NS}
M×F×X	۶	۰/۰۶ ^{NS}	۰/۹۹ ^{NS}	۰/۰۰۹ ^{NS}	۰/۰۷ ^{NS}	۰/۰۰۰۴ ^{NS}	۰/۰۰۹**	۰/۶۰**	۱۰۲/۹**	۰/۰۷ ^{NS}
خطا	۴۶	۰/۰۲	۱/۳۲	۰/۰۰۷	۰/۰۶	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۲	۰/۰۲	۱۲/۴	۰/۰۹
ضریب تغییرات (C.V)	—	۳/۷۲	۷/۶۶	۳/۴۵	۱۰/۴۳	۵/۶۸	۵/۵۹	۱/۰۴	۱/۴۶	۱/۱۲

ns، * و ** به ترتیب بیان‌گر عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

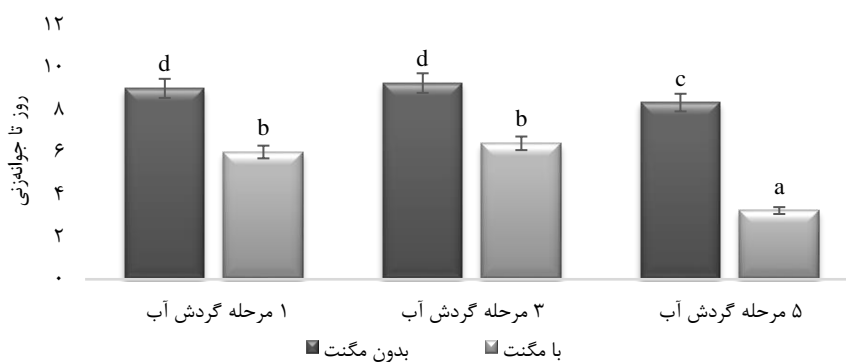
بر اساس شکل ۲، مشاهده شد که نمونه شاهد با میانگین نه روز و نمونه مگنت - پیش و پس فیلتر با میانگین پنج روز به ترتیب طولانی‌ترین و کوتاه‌ترین مدت‌زمان جوانه‌زنی را در اثر متقابل میدان مغناطیسی و نانو فیلتر دارا بودند. همچنین مشاهده شد که اثر متقابل مگنت - دفعات گردش آب بر تعداد روز تا جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی اثر قابل توجهی داشت. نمونه تحت تأثیر مگنت - پنج مرحله گردش آب، کوتاه‌ترین دوره جوانه‌زنی (۳ روز) را نشان داد که حاکی از تأثیر میدان مغناطیسی بر خواص آب است (شکل ۳). کم‌ترین درصد جوانه‌زنی بذر حاصل از نمونه شاهد - ۳ مرحله گردش آب (۸۶/۹۲ درصد) و بیشترین میزان نیز از نمونه حاصل از مگنت - ۵ مرحله گردش آب (۹۹/۳۲ درصد) حاصل گردید. پس از آن در حضور میدان مغناطیسی به ترتیب با سه و یک مرحله گردش آب، بیشترین درصد جوانه‌زنی حاصل شد. این در حالی است که در نمونه‌های فاقد میدان مغناطیسی کم‌ترین سطح جوانه‌زنی حاصل شد (شکل ۴). سرعت جوانه‌زنی نمونه شاهد برابر با ۲۷ بذر در روز بود. این مقدار تحت تأثیر نانو فیلتر افزایش یافت و با اثر میدان مغناطیسی و افزایش توان آن، رشد بیشتری را نشان داد. در اثر متقابل مگنت - نانو فیلتر - ۵ مرحله گردش آب بیشترین سرعت جوانه‌زنی بذر با ۳۶/۱۰ بذر در روز به دست آمد (شکل ۵). ارتفاع گیاه در نمونه شاهد برابر بود ۸/۳۲ سانتی‌متر، این مقدار در نمونه‌های دیگر افزایش نشان داد به طوری که در نمونه تحت تأثیر مگنت - ۵ مرحله گردش آب به ۱۳/۳۷ سانتی‌متر رسید (شکل ۶). نتایج نشان داد که طول ریشه‌چه در نمونه شاهد ۶/۲۹ سانتی‌متر بود. با اعمال تأثیر مگنت و نانو فیلتر این میزان افزایش یافت و بیشترین طول ریشه‌چه از عامل مگنت - پیش و پس فیلتر - ۵ مرحله گردش آب با ۷/۷۸ سانتی‌متر به دست آمد (شکل ۷). وزن تر گیاه در نمونه شاهد برابر با ۱۳/۱۹ گرم بود. این میزان تحت تأثیر عامل پیش فیلتر به ۱۵/۴۳ گرم افزایش یافت (شکل ۸). اثر متقابل میدان مغناطیسی با ۵ مرحله گردش آب، وزن تر گیاه به ۱۶/۵۵ گرم رسید که بیشترین مقدار است (شکل ۹). همچنین وزن خشک در نمونه شاهد برابر با ۸/۴۶ گرم بود و توسط عامل مگنت - پیش فیلتر به ۱۱/۴۸ گرم افزایش یافت (شکل ۱۰). اثر متقابل مگنت - پیش و پس فیلتر نیز وزن خشک را به ۱۱/۸۰ گرم افزایش داد (شکل ۱۱). مقدار کلروفیل a در نمونه شاهد برابر بود با ۸/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ. این مقدار تحت تأثیر عامل‌های تحت آزمون افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان از مگنت به تنهایی با ۱۲/۰۲ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ به دست آمد. پس‌از آن، اثرات متقابل مگنت و نانو فیلتر بیشترین میزان کلروفیل a را داشتند (شکل ۱۲). عامل مگنت به تنهایی (۵/۲۰ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) و نیز اثر متقابل آن با نانو فیلتر به ویژه به همراه پیش فیلتراسیون (۵/۳۷ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) بیشترین محتوای کلروفیل b را به خود اختصاص دادند. این میزان در نمونه شاهد، ۲/۶۱ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ بود (شکل ۱۳). اثر متقابل مگنت - دفعات گردش آب نیز بر محتوای کلروفیل b معنی‌دار بوده و مقدار آن را به ۵/۸۸ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ در عامل مگنت - پنج مرحله گردش آب افزایش داد. این میزان در دو اثر متقابل دیگر نیز به ترتیب برابر با ۵/۲۰ و ۵/۱۸ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ بود (شکل ۱۴). پایین‌ترین نسبت کلروفیل a به b از نمونه مگنت به تنهایی با ۱/۹۸ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ و بالاترین آن از نمونه شاهد با ۳/۳۹ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ به دست آمد. در سایر اثرات،

این نسبت کم‌تر از شاهد بود (شکل ۱۵). محتوای کل کلروفیل در نمونه شاهد ۱۱/۴۷ میکروگرم بر وزن تر برگ بود. این مقدار در نمونه‌های تحت تأثیر نانو فیلتر به تنهایی افزایش کمی را نشان داد. اما در نمونه‌های تحت تأثیر مگنت به تنهایی و اثر متقابل مگنت - نانو فیلتر، بیشترین میزان محتوای کل کلروفیل به‌ویژه در عامل مگنت - پس فیلتر با ۱۷/۰۲ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ به دست آمد (شکل ۱۶). اثر میدان مغناطیسی بر محتوای کل کلروفیل و نیز اثر متقابل آن با دفعات گردش آب، یعنی افزایش توان میدان موجب افزایش محتوای کل کلروفیل تا ۱۷/۹۹ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ تحت تأثیر مگنت - ۵ مرحله گردش آب شد. پس از آن نمونه‌های تحت تأثیر میدان مغناطیسی به ترتیب با سه و یک مرحله گردش آب موجب افزایش محتوای کل کلروفیل شدند. اما در سایر نمونه‌های فاقد میدان مغناطیسی افزایش مشاهده نشد (شکل ۱۷). نمونه شاهد حاوی ۱/۸۷ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ کاروتنوئید بود. این مقدار تحت تأثیر نانو فیلتر افزایش یافت و تحت تأثیر اثر متقابل مگنت - پیش فیلتر بیشترین میزان را نشان داد (۲/۸۴ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) (شکل ۱۸). اثر متقابل مگنت - پنج مرحله گردش آب بیشترین اثر را بر محتوای کاروتنوئیدها با میزان ۳/۲۰ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ داشت (شکل ۱۹). نسبت کاروتنوئیدها به کل کلروفیل در نمونه شاهد برابر با ۰/۱۶ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ بود. این مقدار تحت تأثیر نانو فیلتر به تنهایی (پیش و پس فیلتر)، مگنت به تنهایی و نیز اثر متقابل مگنت - پیش فیلتر به ۰/۱۷ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ افزایش یافت (شکل ۲۰).

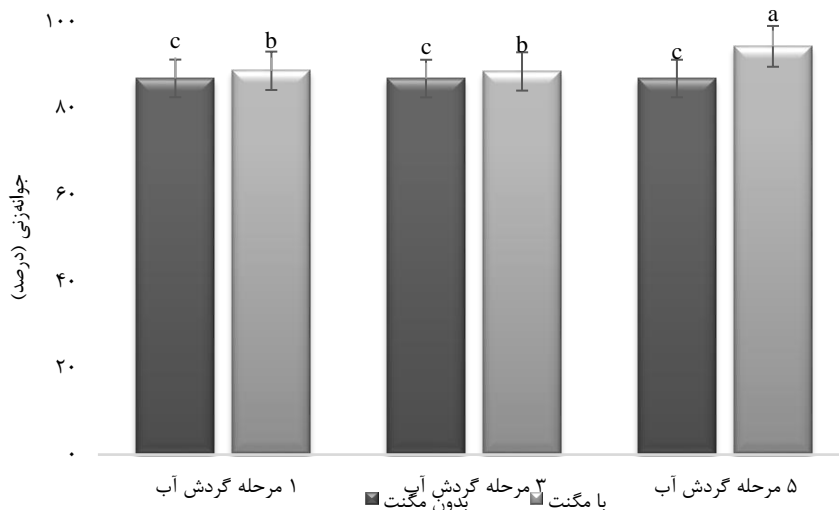
مقدار نیتروژن جذب شده توسط برگ‌ها در نمونه شاهد ۰/۶۸ درصد بود. این مقدار تحت تأثیر مگنت و نانو فیلتر افزایش یافت و بیشترین میزان از تأثیر مگنت - پنج مرحله گردش آب به مقدار ۱/۱۲ درصد به دست آمد (شکل ۲۱). مقدار فسفر جذب شده توسط برگ‌ها در نمونه شاهد ۱۳/۷۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ بود. این مقدار تحت تأثیر مگنت و نانو فیلتر و نیز دفعات گردش آب افزایش یافت و بیشترین مقدار تحت تأثیر مگنت - پنج مرحله گردش آب با ۱۹/۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ حاصل شد (شکل ۲۲). فسفر جذب شده در نمونه شاهد، ۲۰۴/۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ بود. مگنت، نانو فیلتر و دفعات گردش آب این میزان را افزایش دادند و بیشترین میزان از نمونه‌های تحت تأثیر مگنت - ۵ مرحله گردش آب، مگنت - پیش فیلتر و مگنت - پس فیلتر - ۵ مرحله گردش آب ترتیب با ۲۷۵/۲۲، ۲۷۷/۲۰ و ۲۷۴/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ به دست آمد (شکل ۲۳). مقدار آهن جذب شده توسط برگ‌ها ۲۴/۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ بود. این مقدار تحت تأثیر مگنت و نانو فیلتر افزایش یافت. عامل مگنت - پیش فیلتر بیشترین میزان جذب آهن با ۲۷/۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ داشت (شکل ۲۴).



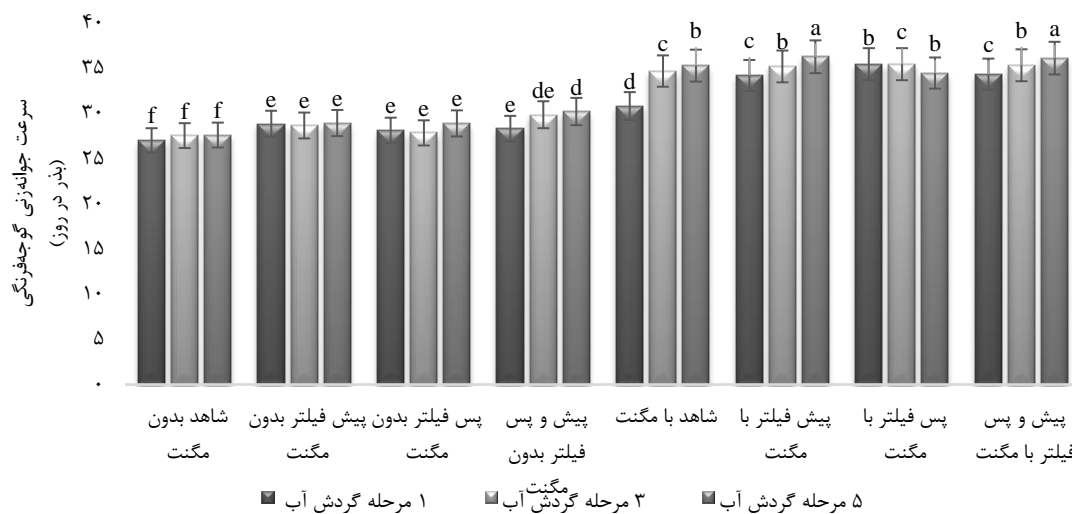
شکل ۲: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر گردش آب بر تعداد روز تا جوانه زنی گوجه فرنگی



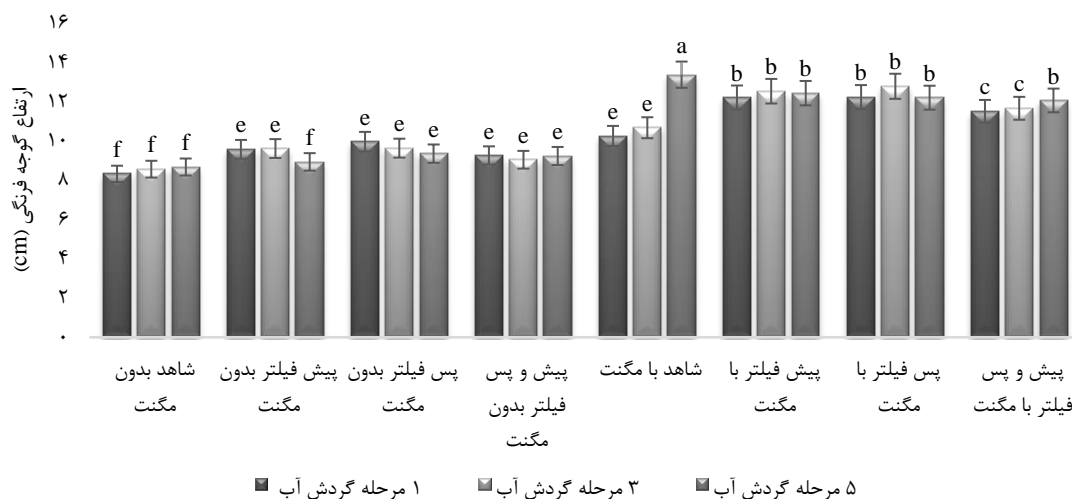
شکل ۳: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر تعداد روز تا جوانه زنی گوجه فرنگی



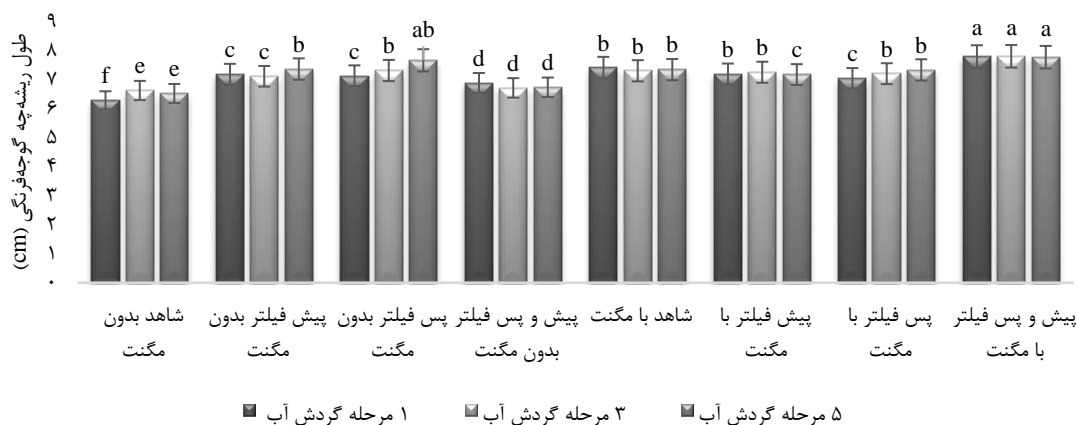
شکل ۴: اثر متقابل میدان مغناطیسی و دفعات گردش آب بر درصد جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی



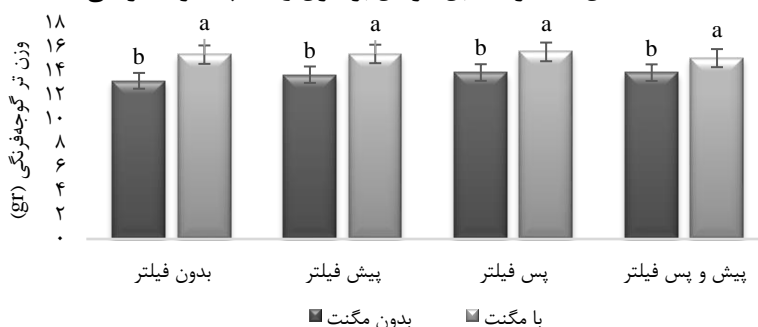
شکل ۵: اثر متقابل عوامل بر سرعت جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی



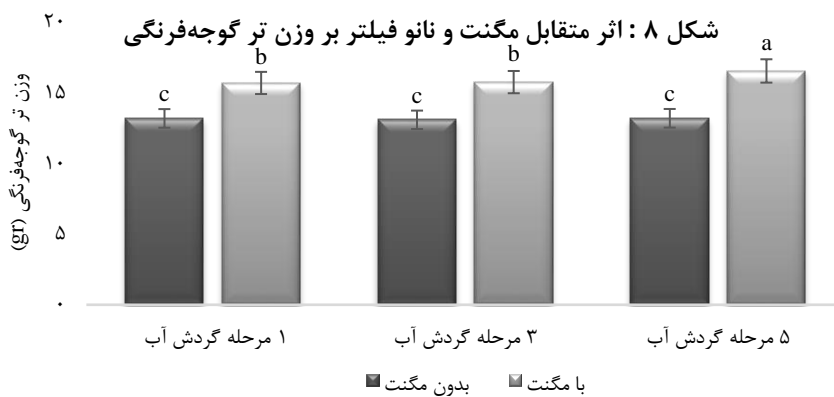
شکل ۶: اثر متقابل عوامل بر ارتفاع گوجه‌فرنگی



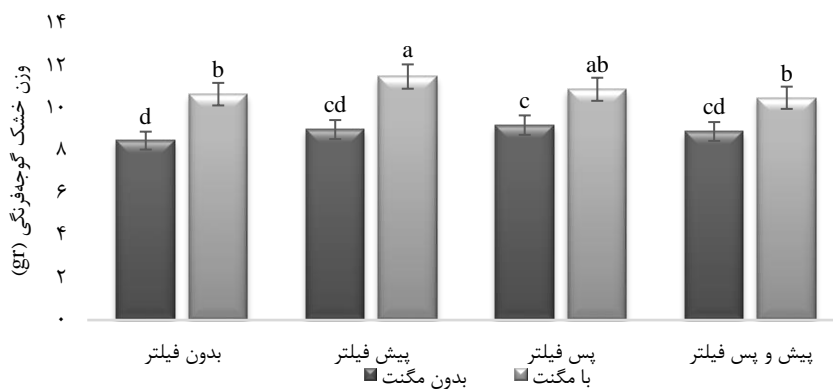
شکل ۷: اثر متقابل عوامل بر طول ریشه چه گوجه فرنگی



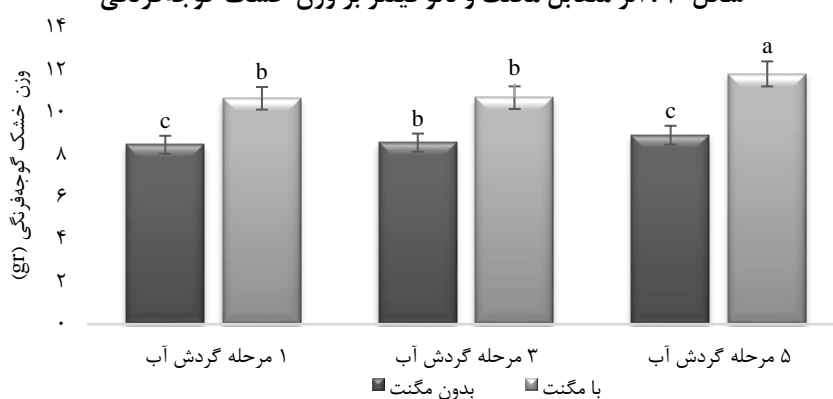
شکل ۸: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر وزن تر گوجه فرنگی



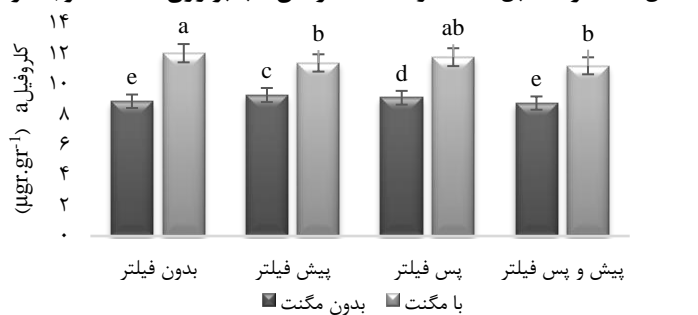
شکل ۹: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر وزن تر گوجه فرنگی



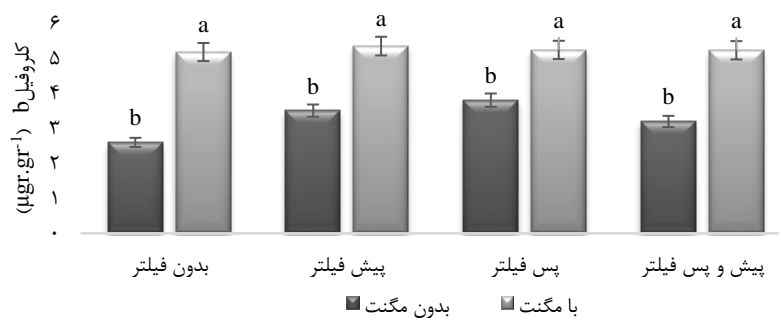
شکل ۱۰: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر وزن خشک گوجه فرنگی



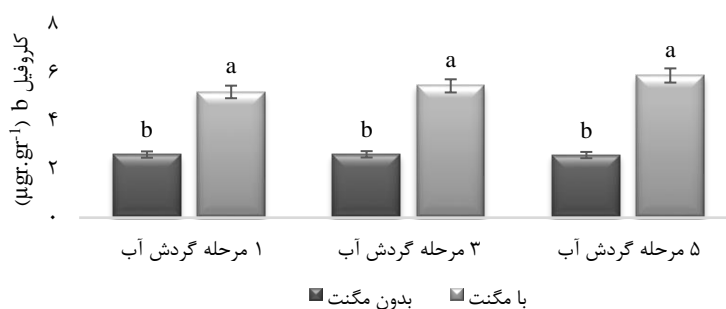
شکل ۱۱: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر وزن خشک گوجه فرنگی



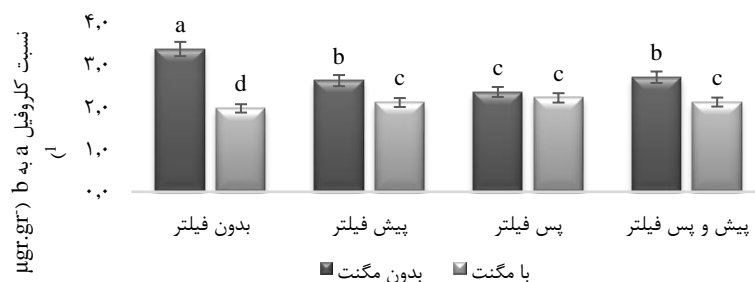
شکل ۱۲: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر محتوای کلروفیل a گوجه فرنگی



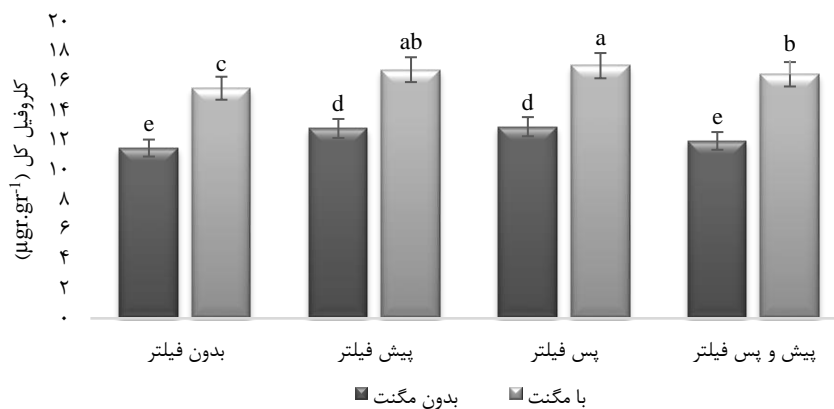
شکل ۱۳: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر محتوای کلروفیل b گوجه فرنگی



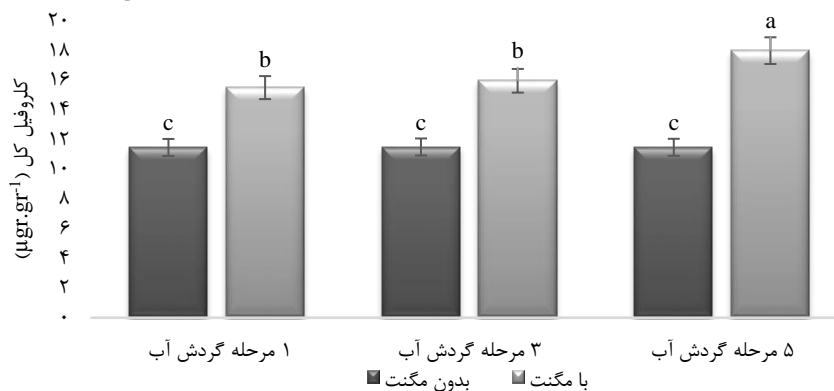
شکل ۱۴: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر محتوای کلروفیل b گوجه فرنگی



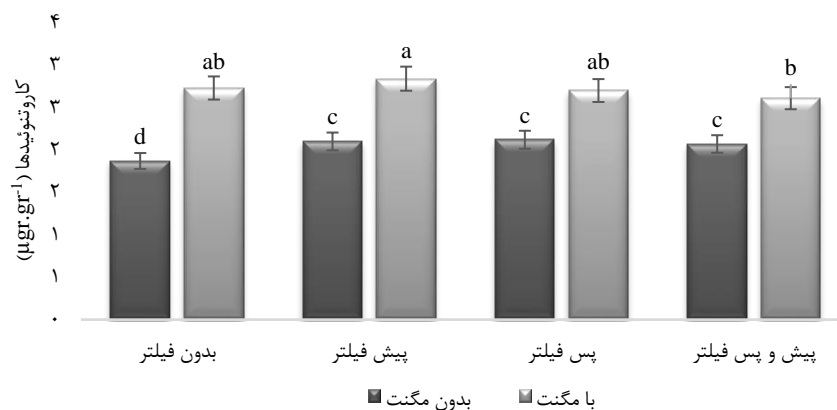
شکل ۱۵: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر نسبت کلروفیل a به b گوجه فرنگی



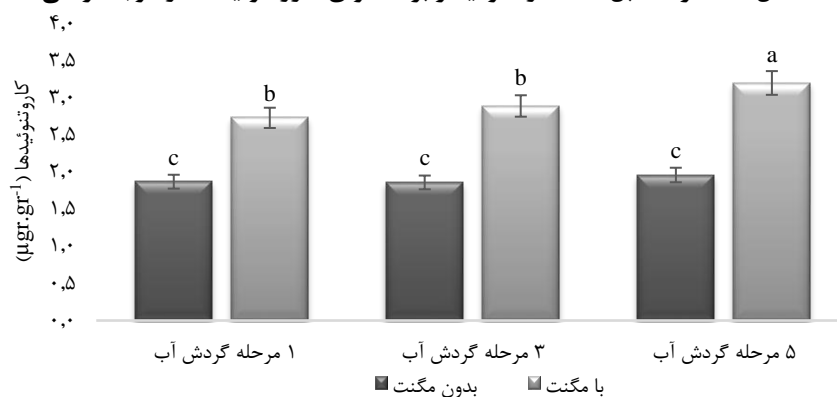
شکل ۱۶: اثر متقابل مگنت و نانوفیلتر بر محتوای کل کلروفیل گوجه فرنگی



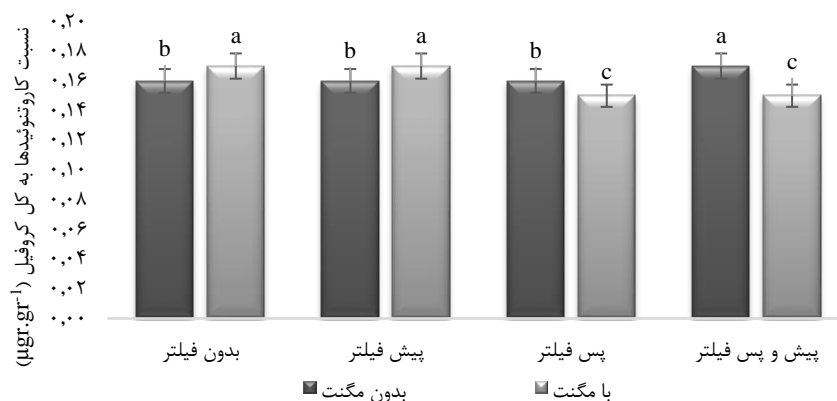
شکل ۱۷: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر محتوای کل کلروفیل گوجه فرنگی



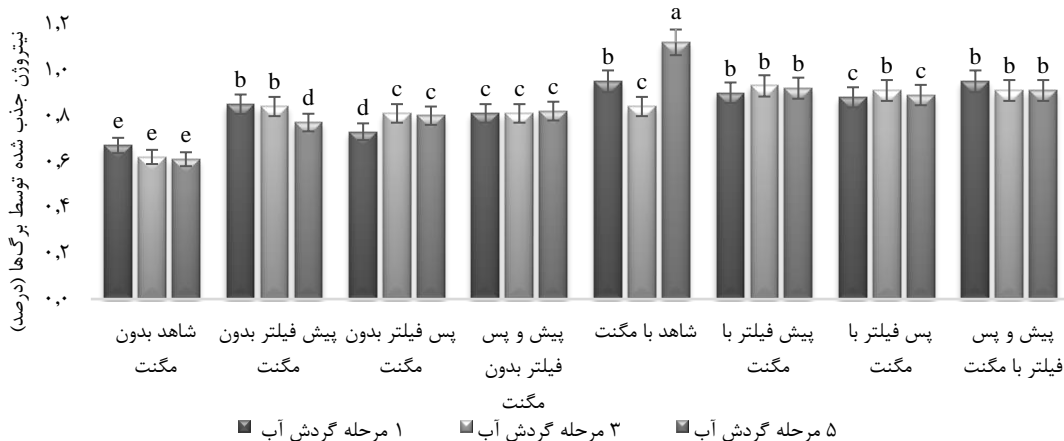
شکل ۱۸: اثر متقابل مگنت و نانوفیلتر بر محتوای کاروتنوئیدها در گوجه فرنگی



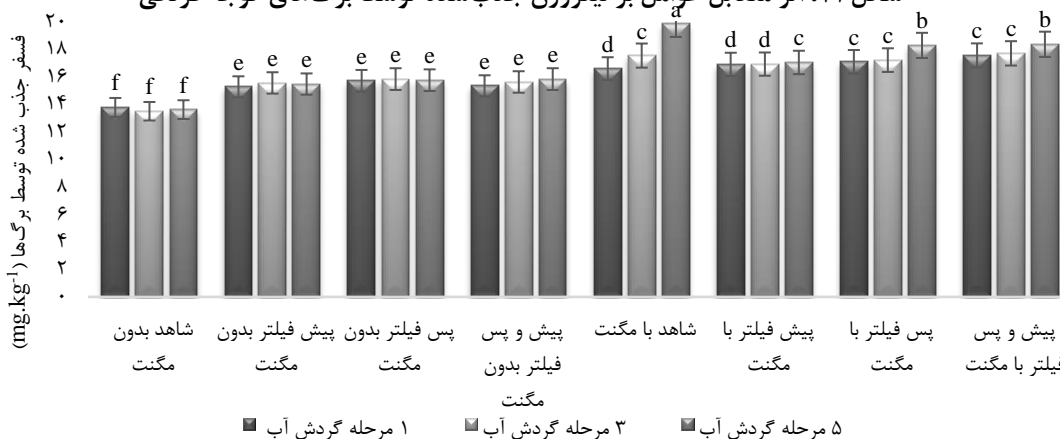
شکل ۱۹: اثر متقابل مگنت و دفعات گردش آب بر محتوای کاروتنوئیدها در گوجه فرنگی



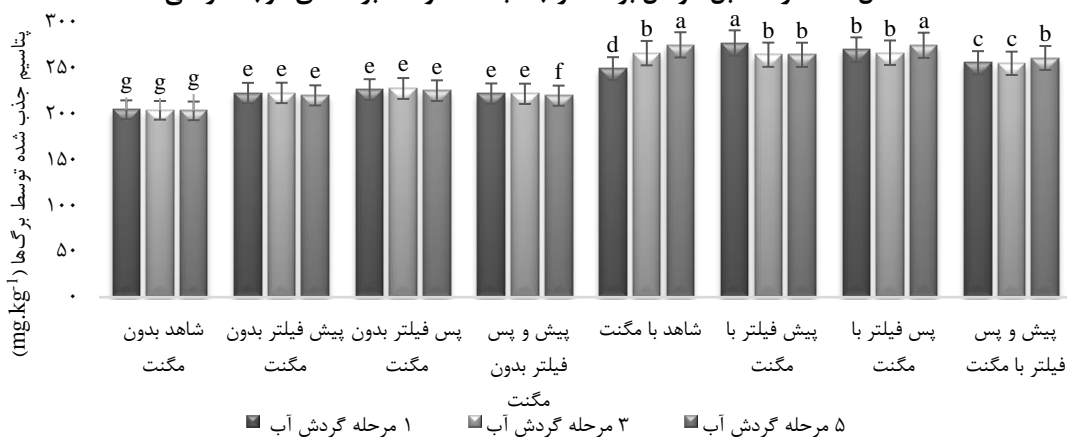
شکل ۲۰: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر نسبت کاروتنوئیدها به کل کلروفیل گوجه فرنگی



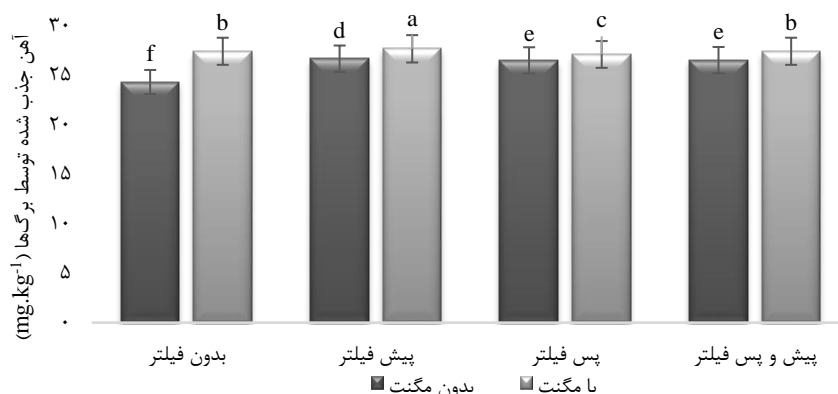
شکل ۲۱: اثر متقابل عوامل بر نیترژن جذب شده توسط برگ‌های گوجه فرنگی



شکل ۲۲: اثر متقابل عوامل بر فسفر جذب شده توسط برگ‌های گوجه فرنگی



شکل ۲۳: اثر متقابل عوامل بر پتاسیم جذب شده توسط برگ‌های گوجه فرنگی



شکل ۲۴: اثر متقابل مگنت و نانو فیلتر بر آهن جذب شده توسط برگ‌های گوجه فرنگی

بحث

نانو فیلتر با اصلاح ساختار شیمیایی آب و زدودن املاح از جمله املاح غیرضروری و غیر قابل جذب برای گیاهان، اثر مثبتی بر گیاهان باقی می‌گذارد اما حذف تمام املاح از جمله املاح حاوی نیترات، پتاسیم، کلسیم و غیره، احتیاج گیاه به مواد غذایی کمکی مانند کودهای شیمیایی را بیشتر می‌کند که خود اثرات زیست محیطی زیادی خواهد داشت (باسانت و همکاران، ۲۰۰۴). در ادامه افزایش درصد جوانه‌زنی، افزایش سرعت جوانه‌زنی امری است طبیعی که به دلیل وجود شرایط بهینه رشد و نمو گیاهان و به دنبال ترشح هورمون‌های رشد رخ می‌دهد (رستگار و صادقی لاری ۱۳۹۴). میدان مغناطیسی با اصلاح فیزیکی آب و کاهش سختی آب ضمن حفظ املاح مفید برای گیاهان، به آب‌رسانی و تغذیه گیاه کمک نموده و منجر به بازده بیشتر گیاه می‌گردد. کیفیت مناسب آب باعث اصلاح ساختار فیزیکوشیمیایی خاک نیز شده و با افزایش سطح جیبرلین و سپس ایندول استیک اسید، جوانه‌زنی و رشد رویشی در گیاه را منجر می‌شود (افتیمیادو و همکاران، ۲۰۱۴). ریشه‌چه مسئول جذب و انتقال مواد معدنی، اسیمیلات و آب به گیاه هستند. با ایجاد توازن مطلوب از نظر رطوبت، مواد آلی و معدنی در خاک، رشد ریشه‌ها اتفاق خواهد افتاد که گیاه توانایی جذب بیشتر عناصر غذایی از جمله آهن را پیدا می‌کند (رستگار و صادقی لاری ۱۳۹۴). کلروفیل a، کلروفیل اصلی در گیاه است و افزایش آن نشان از وضعیت فیزیولوژیکی مطلوب گیاه، رشد و نمو بالاتر و در نتیجه افزایش فتوسنتز است. کلروفیل b، رنگیزه کمکی در گیاه محسوب می‌شود و افزایش آن از جهتی برای پوشش فقدان کلروفیل a به میزان لازم است. نسبت کاروتنوئیدها به کل کلروفیل نشان‌دهنده طول عمر و کارایی کلروفیل‌هاست. هرچه این نسبت بالاتر باشد، یعنی کاروتنوئید بیشتری نسبت به کلروفیل‌ها وجود داشته و در نتیجه کلروفیل‌ها در وضعیت بهتری قرار دارند (تایز و همکاران، ۲۰۱۴). در بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران، مشخص گردید که میدان مغناطیسی با بهبود ساختار فیزیکی آب موجب جذب بیشتر مواد غذایی از جمله ریز مغذی‌هایی مانند آهن که در ساخت کلروفیل نقشی اساسی دارد، موجب افزایش مقدار کلروفیل می‌گردد (بانژاد و همکاران ۱۳۹۲). آهن، موجب افزایش محتوای کلروفیل و در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز و مواد غذایی می‌شود که این امر موجب تولید ماده خشک و عملکرد بیشتری می‌گردد، از طرف دیگر آهن از تخریب کلروفیل

جلوگیری می‌نماید و در نتیجه میزان عملکرد بیشتر می‌شود. افزایش کلروفیل می‌تواند با اثر مستقیم سیترات از طریق فعال ساختن آهن - ریدکتاز غشاء پلاسمایی برگ انجام شود. القای سنتز کاروتنوئیدها می‌تواند به دلیل نقش حفاظتی (آنتی‌اکسیدان‌های محافظ کلروفیل) آن‌ها در تشکیلات فتوسنتزی باشد زیرا این رنگیزه‌ها مسئول خاموش کردن اکسیژن یکتایی و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت تنش اکسیداتیو می‌گردند. با افزایش کاروتنوئیدها، مقدار پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافته و حفاظت بیشتر از غشاهای سلولی و فتوسنتزی و رنگیزه‌های فتوسنتزی صورت گرفته و مانع از کاتابولیسم کلروفیل می‌شود (شرفالدین شیرازی، ۱۳۹۲). نیتروژن به طور کامل تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع، رشد رویشی و عملکرد گیاه دارد. همچنین این عنصر در ساخت پروتئین و کلروفیل نقش دارد. فسفر پس از نیتروژن مهم‌ترین عناصر بوده و نقش مهمی در تولید و انتقال انرژی دارد. پتاسیم برای سنتز و انتقال انرژی و نیز جذب آب توسط گیاه مؤثر است. آهن نیز مهم‌ترین ریزمغذی بوده که در سوخت‌وساز گیاهی و ساخت کلروفیل‌ها نقش اساسی دارد (رستگار و صادقی لاری ۱۳۹۴).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، مشاهده شد که اثر نانو فیلتر و میدان مغناطیسی بر آب آبیاری برای گیاهان مثبت و معنی‌دار بوده ولی از آنجایی که گیاهان نیز مانند سایر جانداران به املاح معدنی موجود در آب نیاز دارند لذا در برخی موارد مشاهده گردید که نانو فیلتر با وجود اثر مثبت بر گیاه، اثری کم‌تری از میدان مغناطیسی داشت، در حالی که میدان مغناطیسی به تنهایی در بیشتر موارد مؤثرتر واقع شد. از طرف دیگر، با عدم استفاده از کودهای شیمیایی و یا به حداقل رساندن مقدار استفاده می‌توان هم به سلامت محصولات و افراد و هم به حفظ پاکیزگی محیط زیست کمک شایانی نمود. با توجه به نتایج به دست‌آمده در این پژوهش، یک نمونه دستگاه مغناطیس کننده برای لوله‌های تا قطر ۱/۲" ساخته شد (شکل ۲۵).



ب

الف

شکل ۲۵: نمونه اصلی دستگاه مغناطیس کننده (الف) و آهنرباهای به کار رفته در آن (ب)

در این نمونه پنج عدد آهنربای دائمی از جنس نئودیم با توان ۴۴۰۰ گوس قرار گرفت. همچنین طراحی دستگاه مذکور در ابعاد و اشکال و توان‌های دیگر نیز امکان‌پذیر می‌باشد. ابعاد دستگاه ۳۸×۵۶×۱۴۰ میلی‌متر است.

منابع

- بانژاد، ح.، مکاری قهرودی، ا.، اثنی عشری، م. و لیاقت، ع. (۱۳۹۲) بررسی اثر متقابل آب مغناطیسی و شوری بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه ریحان. نشریه آبیاری و زهکشی ایران. ۲(۷): ۱۷۸-۱۸۳.
- رستگار، س. و صادقی لاری، ع. (۱۳۹۴) اثر آب مغناطیسی بر جوان زنی و خصوصیات رشد اولیه بذر گوجه فرنگی. نشریه پژوهش آب در کشاورزی. ۲۹(۳): ۴۰۹-۴۱۳.
- شرف‌الدین شیرازی، ش. (۱۳۹۲) بررسی اثر نانو کود کلات آهن و کود آهن بر صفات کمی و کیفی گیاه دارویی آویشن دنیایی (*Thymus daenensis* L.)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، دانشکده کشاورزی.
- کندی، پ.، حسین‌زاده، م. م.، کیانی، و. و عبدی، ف. (۱۳۹۴) بررسی بحران آب و راهکارهای پیش‌رو (تأکید بر کشور پهناور ایران)، دومین همایش ملی راهکارهای پیش‌روی بحران آب در ایران و خاورمیانه، شیراز.
- Ajmal Khan, M., Boer, B., Ozturk, M., Al Abdessalaam, T. Z., Clusener-Godt, M. and Gul, B. (2014) Tasks for Vegetation. *Sci* 47. *Sabkha Ecosystem*, V. IV. Springer Sci+Business Media. USA.
- Alexander, R., Mensah, A., Bill Krantz, W. and Govind, R. (2015) Studies on Polymeric Nano-filtration Based Water Softening and the Effect of Anion Properties on the Softening process. *European J. Polymer*. 44(7): 2244-2252.
- Basant, L. Maheshwari, M. and Harsharn, S. G. (2009) Magnetic Treatment of Irrigation Water: Its Effects on Vegetable Crop Yield and Water Productivity. *Agric. W. M.* (96): 1229-1236.
- Brower, D. (2015) Magnetic Water Treatment, *J. Pollution Engineering*. 33(4): 12-20.
- Chin, A. and Berube, P. R. (2015) Removal of Disinfection by-product precursors with Ozone UV, Nano-Filtration and Advanced Oxidation Process. *J. Water Research*. (39): 2136-2144.
- Davie, T. (2008) *Fundamentals of Hydrology* (2nd Ed.) Taylor and Francis Group. 220pp. London and New York.
- Efthimiadou, A., N. Katsenios, P. Papastylianou, V. Vriantafyllidis, I. Travlos, and D.J. Bilalis. (2014) Effects of Presowing Pulsed Electromagnetic Treatment and Nanofiltration of Tomato Seed on Growth, Yield, and Lycopene Content. *Sci. W. J.* 1-6.
- Karla, Y. P. (1998) *Handbook of reference methods for plant analysis*. Chemical Rubber Company (CRC Press) Washington D. C. USA.
- Karnik, B., Pavies, S., Baumann, M. J., and Masten, S. J. (2015) The Effect of Combined Ozonation and Filtration on Disinfection by-product Formation. *J. Water Research*. 39(13): 2839-2850.
- Mahmood, S. and Usman, M. (2014) Consequences of Magnetized Water Application on Maize Seed Emergence in Sand Culture. *J. Agricultural sci. and Technology*. 1(16): 47-55.
- Mosin, O. and Ignatov, I. (2015) Practical implementation of magnetic water treatment to eliminate scaling salts. *J. Health, Medicine and Nursing*. (10): 111-126.
- Pederson, F. (2015) *Magnets and Bioavailability of Water*. Aquatomic Viewed.

-
- Simonne, E. H., Jones, J. B., Mills, H. A., Snittlean, D. A. and Hussey, C. G. (1993) Influence of catalyst, sample weight, and digestion conditions on Kjeldahl N. *Commun. Communications in Soil Sci and Plant Analysis*. (24): 1609-1616.
- Taiz, L., Zeiger, E. Max Moller, I. and Murphy, A. (2014) *Plant Physiology and Developmetn* (6th Ed.) Sinauer Associates, Inc. 761pp.
- Witham, H. F., Blaydes, D. F. and Delvin, R. M. (1971) *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Company. 245pp.

Design and manufacture of electromagnetic device utilizing Nano filtration in order to increase production and reduce environmental pollution in agricultural irrigation water

S. Sharafaldin Shirazi^{1*}, M. Nejati Jahromi², M. Simiari³

Received: 2017.11.17

Accepted: 2018.08.27

Abstract

Water, the vital element for survival and its quality and resources are substantial for every country. This study was based to investigate the effect of the magnetic field and Nano filtration on some growing characteristics of tomato such as days to germination, germination percentage, germination rate, height, root length, biomass, dry matter, chlorophyll a, b, total, carotenoids, and the absorption rate of NPK, Fe by the leaves, based on a factorial experiment in a randomized complete block design with three replicates was conducted. In this respect, two levels of magnetic field, four levels of Nano filtration and three levels of water circulation were included. Overall, the results indicated that the magnetic field had a positive influence, while the impacts of Nano filter were considerably less. Likewise, it is vital to note that the effect of the magnetic field was significantly higher in interrelationship samples. As a consequence, on the basis of the results, a magnetic water treating device has been manufactured. Overall, with the aim of the device, the required amount of chemical fertilizers would plunge by which their detrimental impacts upon environment could be reduced markedly.

Keywords: Environmental pollution, Growing traits, Magnetic field, Nano filtration, Water

1. MSc, Agricultural Engineering-Agronomy, Tehran-Iran

2. PhD, Telecommunication Engineering, Shahid Sattari Aerial University, Tehran-Iran

3. PhD, Nanophysics, Imam Ali University, Tehran-Iran

(*Corresponding author:sharafaldinshirazi.shahin@gmail.com)

مقایسه ی ترکیبات شیمیایی عضله ماهی تیلاپیای وارداتی (*Oreochromis niloticus*) با عضله

ماهی قزل آلالی پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) استان خوزستان

فاطمه نقیبی^۱، ابوالفضل عسکری ساری^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

این تحقیق به منظور مقایسه ی میزان پروتئین، چربی، کربوهیدرات، فیبر، خاکستر و رطوبت در گونه های مختلف ماهی تیلاپیای وارداتی (*Oreochromis niloticus*) و قزل آلالی پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. نمونه های ماهی از بازار ماهی فروشان اهواز تهیه شدند. تجزیه و تحلیل داده ها به کمک نرم افزار SPSS17، آزمون دانکن و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) انجام شد که وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد ($P=0.05$) تعیین گردید. میزان کربوهیدرات در عضله ی هر دو نمونه ماهی مورد مطالعه در این تحقیق $1/59 \pm 2/72$ و میزان فیبر غیر قابل سنجش و صفر بود. بالاترین میزان پروتئین، چربی، خاکستر به ترتیب ۲۲/۱۴، ۶/۷۶، ۳/۸ گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک بود. بالاترین میزان رطوبت نیز ۷۵/۶ درصد بود. بالاترین میزان پروتئین و چربی در ماهی قزل آلالی پرورشی و بالاترین میزان خاکستر و رطوبت در ماهی تیلاپیای وارداتی بود. میزان خاکستر و پروتئین بین ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلالی پرورشی اختلاف معنی داری نداشت ($P \geq 0.05$)، اما میزان چربی و رطوبت اختلاف معنی داری داشت ($P < 0.05$).

واژه های کلیدی: تیلاپیای وارداتی، قزل آلالی پرورشی، عضله، ترکیبات شیمیایی، پروتئین

مقدمه

آبزیان از گذشته به عنوان یکی از غذاهای بسیار مهم از حیث ارزش های دارویی و غذایی مطرح بوده اند و ماهی با دارا بودن ۱۹ درصد پروتئین و جذب ۹۹ درصد از این میزان پروتئین توسط انسان و همچنین چربی ها و اسید آمینه های ضروری، ویتامین ها و مواد معدنی مهم از نظر غذایی دارای ارزش بالایی می باشد. ترکیب شیمیایی گوشت آبزیان شامل آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، ویتامین ها و مواد معدنی است (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰؛ جان فدا، ۱۳۸۴). ماهی منبع غنی از پروتئین، انواع ویتامین ها (A, B12, B6, B3, D, C, E) و اسید آمینه تریپتوفان (پیش ساز ویتامین نیاسین) B3 بوده و از لحاظ مواد معدنی نیز

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* (نویسنده مسئول: Askary_sary@yahoo.com)

غنی بوده و دارای آهن، سلنیوم، کلسیم، منیزیم، پتاسیم، فسفر، سدیم، روی، منگنز فراوان بوده (کانر، ۱۹۹۲؛ ویجایان و همکاران، ۱۹۹۶). میزان پرورش آبزیان در ایران در سال ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ به ترتیب ۳۷۰۸۷۶ و ۳۷۱۸۴۰ تن و میزان پرورش آبزیان در جهان طبق سالنامه آماری FAO, 2014 برابر با ۶۷ میلیون تن می باشد. سرانه مصرف آبزیان در ایران در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ به ترتیب ۸/۵ و ۹/۲ کیلوگرم و سرانه جهانی مصرف ماهی از میانگین ۹,۹ کیلوگرم در دهه ۱۹۶۰ میلادی به ۱۴,۴ کیلوگرم در دهه ۱۹۹۰ میلادی رسید. در سال ۲۰۱۴ این رقم به ۲۰,۱ کیلوگرم می رسد (گروه بین الملل باشگاه خبرنگاران جوان، ۱۳۹۵، سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳؛ فائو، ۲۰۱۴).

ماهی تیلاپیا یکی از انواع ماهیان پرورشی می باشد که تا سال ۲۰۰۲ بیش از صد کشور جهان به پرورش این ماهی اشتغال داشتند و بیشترین تولید این ماهی در کشورهای آسیایی انجام می شود. چین بزرگترین تولید کننده تیلاپیا در دنیا می باشد (Fitzsimmons et al., 2010). این ماهی دومین ماهی پرورشی بعد از کپور ماهیان بوده و به آسانی تکثیر و با غذاهای متنوع و ارزاقیمت می تواند پرورش داده شود. براساس گزارش های موجود تولید و مصرف این ماهی در دنیا رو به افزایش است بطوریکه تولید آن از محل پرورش از ۱/۴۷۵ میلیون تن در سال ۲۰۰۲ به ۲/۹۱۷ میلیون تن در سال ۲۰۰۸ افزایش یافته است میزان تولید آن در سال ۲۰۱۲ برابر ۳۱۹۷۲۲۰ تن بوده است و همچنین ارزش تولیدات تیلاپیا از ۱۷۴۴۰۴۵۰۰۰ دلار در سال ۲۰۰۷ به ۲۴۵۷۳۱۲۰۰۰ دلار در سال ۲۰۰۹ افزایش داشته است و ارزش آن در سال ۲۰۱۲ برابر ۵۲۶۰۶۹۵۰۰۰ دلار بوده است. مهمترین گونه تجاری تیلاپیا، تیلاپیای نیل است که با نام علمی *Oreochromis niloticus* شناخته می شود و تیلاپیای قرمز (*Red tilapia*) که هیبرید هستند برای اهداف تجاری و بازار پسندی بوجود آمده اند (Pillay and Kutly, 2005) تحقیقات گسترده ای در مورد ماهی تیلاپیا از جمله فرآوری آن در کشورهای مختلف انجام شده اما بدلیل جدید بودن این ماهی در کشور مطالعات در زمینه فرآوری آن محدود است و تنها تحقیق انجام شده در این زمینه قیومی و همکاران (۱۳۹۰) می باشد که با توجه با موارد مطرح شده و شایعات در مورد کیفیت گوشت ماهی تیلاپیا تا کنون گزارشی از بیماری مشترک از این ماهی با انسان یا کیفیت پایین گوشت این ماهی در هیچ یک از مستندات علمی ثبت نشده است (عسکری ساری و همکاران، ۱۳۹۰).

ماهی قزل آلا پرورشی نیز یکی از گونه های تجاری ایران محسوب می شود که در استان های خوزستان، لرستان، کهگیلویه و بویر احمد، کردستان، کرمانشاه، چهارمحال و بختیاری پرورش داده می شود. این ماهی در حال حاضر یکی از گونه های مهم پرورشی جهان به حساب می آید به طوری که تولید این ماهی از ۴۴۷۳۹۴ تن در سال ۲۰۰۰ به ۵۷۶۲۸۹ تن در سال ۲۰۰۸ افزایش یافته و هفدهمین گونه مهم پرورشی آبزیان از نظر تولید می باشد (فائو، ۲۰۱۰). ماهی قزل آلا پرورشی در ایران به دلیل طعم و مزه مناسب و مطلوب دارای طرفداران بسیاری می باشد، به طوری که در سال ۱۳۹۳ به میزان ۱۴۰ هزار تن تولید گردید. همچنین میزان ۲۶۴۷۶۹ تن بچه ماهی قزل آلا پرورشی در کشور تکثیر و تولید شد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳).

مطالعات محدودی در زمینه تعیین ارزش غذایی ماهیان انجام شده است. Ali و همکاران در سال ۲۰۰۵ ترکیبات شیمیایی عضله هفت گونه کپور ماهیان هندی و چینی نظیر فیتوفاگ، کپور معمولی، مریگال، کاتلا کاتلا، Solberg و همکاران در سال ۲۰۰۶ تغییرات ترکیب شیمیایی را در تغذیه و رشد ماهی کاد پرورشی، Yildiz و همکاران در سال ۲۰۰۷ ترکیبات شیمیایی عضله ماهی وحشی و پرورشی باس دریایی، Tzikas و همکاران در سال ۲۰۰۷ تغییرات ترکیبات مختلف بدن ماهی *Trachurus mediterraneus* را مطالعه نمودند (Yildiz et al., 2007). با توجه به جایگاه ماهی قزل آلا ی پرورشی و تیلاپیای وارداتی در سبد غذایی مردم ایران هدف این تحقیق بررسی و مقایسه ترکیبات شیمیایی عضله ماهی تیلاپیای وارداتی با عضله ماهی قزل آلا ی پرورشی می باشد.

مواد و روش ها

این پژوهش در دانشگاه آزاد واحد اهواز در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی انجام شد. برای اجرای آزمایش ۹ نمونه ماهی تیلاپیای وارداتی که هر سه نمونه مربوط به یک محل بود (سه نمونه تیلاپیای وارداتی مربوط به شرکت مه پروتئین تهران، سه نمونه تیلاپیای وارداتی مربوط به شرکت پروتئین آرمان جنوب تهران، سه نمونه تیلاپیای وارداتی مربوط به شرکت مه پروتئین بوشهر) و همچنین ۹ نمونه ماهی قزل آلا ی پرورشی که هر سه نمونه مربوط به یک محل بود (سه نمونه قزل آلا ی پرورشی دزفول، سه نمونه قزل آلا ی پرورشی اهواز، سه نمونه قزل آلا ی پرورشی شوشتر).

۱۸ نمونه ماهی از بازار شیلات در اهواز خریداری شده و با استفاده از جعبه های حاوی یخ در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی واقع در دانشگاه آزاد اهواز منتقل گردید و پس از مشخص کردن طول استاندارد و وزن استاندارد از هر نمونه ۲۰-۳۰ گرم جهت انجام آزمایشات جدا شد.

جهت اندازه گیری پروتئین موجود در نمونه های مورد مطالعه از روش کجداال (AOAC, 1984) استفاده شد. در این روش در حضور اسید سولفوریک یا اسید کلریدریک و کاتالیزور، اتم نیتروژن در ترکیبات آلی نیتروژن دار به سولفات آمونیم تبدیل و سپس آمونیاک از یک واسطه قلیایی تقطیر گردیده و در اسید کلریدریک یا اسید بوریک جذب شده و به وسیله تیتراسیون با یک اسید مقدار آن تعیین گردید. تعیین مقدار پروتئین در سه مرحله انجام شد، مرحله هضم، مرحله تقطیر، مرحله تیتراسیون. اسید بوریک و متیل رد (متیل قرمز) اضافه گردید و در نتیجه آن، رنگ اسید از قرمز به زرد تغییر کرد. پس از حدود ۳۰ دقیقه مرحله تقطیر به پایان رسید و تیتراسیون پروتئین نمونه با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال انجام پذیرفت و میزان پروتئین با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{نرمالیتة اسید} \times \text{میزان اسید مصرفی} \times 0.14 / 100 = \text{درصد ازت (نیتروژن)}$$

وزن نمونه (گرم)

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

جهت اندازه گیری چربی، ابتدا ۳ گرم از نمونه در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری وزن گیری و به آن ۵۰ میلی لیتر اسید کلریدریک اضافه می شود. دهانه ارلن به یک مبرد وصل و حرارت داده شده تا محتوی آن شروع به جوشیدن نماید بعد محتویات ارلن روی کاغذ صافی ریخته شده و با آب کاملاً شستشو و صاف می شود. کاغذ صافی به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو قرار می گیرد و بعد از خنک شدن لوله شده و در درون کارتوش قرار می گیرد و در نهایت درون قسمت استخراج کننده دستگاه قرار داده می شود. داخل قسمت استخراج کننده به مقدار ۲۵۰-۳۰۰ ml محلول n هگزان (حلال) ریخته تا یکبار از استخراج کننده به بالون سرریز کند. سپس مبرد را وصل کرده و هیتر روشن می شود و حدود ۵ ساعت حرارت دهی صورت می گیرد. سپس دستگاه را خاموش و پس از خنک شدن حلال، کاغذ صافی را با پنس خارج کرده و در آن به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو قرار داده تا خشک شود. سپس در دسیکاتور خنک کرده (زیرا اگر نمونه داغ باشد بر روی ترازوهای دیجیتالی تاثیر منفی گذاشته و موجب خطا در آزمایش می شود) در انتها نمونه وزن شده و در فرمول قرار داده شد (Folch et al., 1957).

$$M1_M2$$

$$\text{درصد روغن} = \frac{\text{-----}}{\text{-----}} \times 100$$

$$M1$$

M1: وزن نمونه و کاغذ صافی در ابتدای کار

M2: وزن نمونه و کاغذ صافی در انتهای کار

اندازه گیری کربوهیدرات از طریق محاسبه ریاضی انجام می شود به یان صورت که از اختلاف بین انرژی حاصل از مواد غیر از ته (NFE) و فیبر میزان کربوهیدرات بدست می آید.

$$\text{میزان کربوهیدرات} = \text{NFE انرژی حاصل از مواد غیر از ته} - \text{فیبر}$$

جهت سنجش خاکستر از روش استاندارد (AOAC, 1990) استفاده گردید. تعیین میزان خاکستر از طریق سوزاندن ماده آلی و اندازه گیری ترکیبات غیر آلی صورت می گیرد که برای این منظور از کوره الکتریکی استفاده شد. حرارت دادن طی دو مرحله انجام شد: ۱- حذف آب موجود و تبدیل شدن نمونه به زغال ۲- خاکستر شدن در ۵۵۰ درجه سانتیگراد در کوره

$$100 \times \text{وزن بوته} + \text{میزان خاکستر} - \text{وزن بوته خالی} = \text{درصد خاکستر}$$

وزن نمونه (گرم)

جهت اندازه گیری رطوبت عضله نمونه ها از روش آون (پروانه، ۱۳۷۷) استفاده شد. حدود ۳ گرم از نمونه در داخل سه پلیت با وزن ثابت (در هر یک گرم) قرار داده شد و هر ظرف و محتویات آن به دقت وزن گردید. سپس ظرف ها و محتویات آنها در درون آون با درجه حرارت ۱۱۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ تا ۷ ساعت قرار داده شد. هر چقدر میزان رطوبت موجود در نمونه

بیشتر باشد این مدت زمان نیز افزایش می یابد (ماجدی، ۱۳۷۳). بعد از بیرون آوردن نمونه ها از آون و قرار دادن در دسیکاتور، با توزین مجدد میزان رطوبت با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\text{رطوبت (درصد)} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100$$

درصد ماده خشک-۱۰۰ = درصد رطوبت

W: وزن نمونه بر حسب گرم

w1: وزن نمونه پیش از رطوبت گیری + وزن ظرف بر حسب گرم

w2: وزن نمونه پس از رطوبت گیری + وزن ظرف بر حسب گرم

اندازه گیری میزان فیبر به کمک دستگاه Fibertec 2010 foss tecator انجام شد.

وزن نمونه/(چربی+ رطوبت)-۱۰۰) اختلاف دو توزین

روش آزمون آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS-17 و برای رسم جداول و نمودارها از نرم افزار Excel2007 استفاده شد. میانگین داده ها به کمک آزمون دانکن (Dancans Multiple Rang Tests) و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) مقایسه گردید و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=0.05) تعیین گردید.

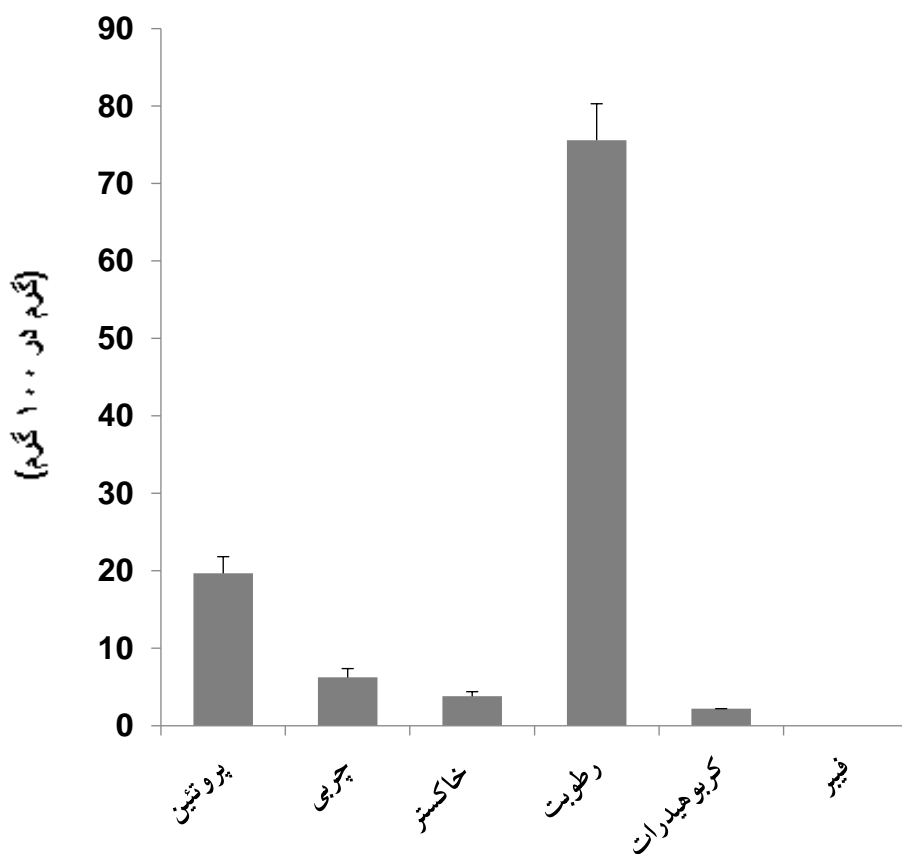
نتایج و یافته ها

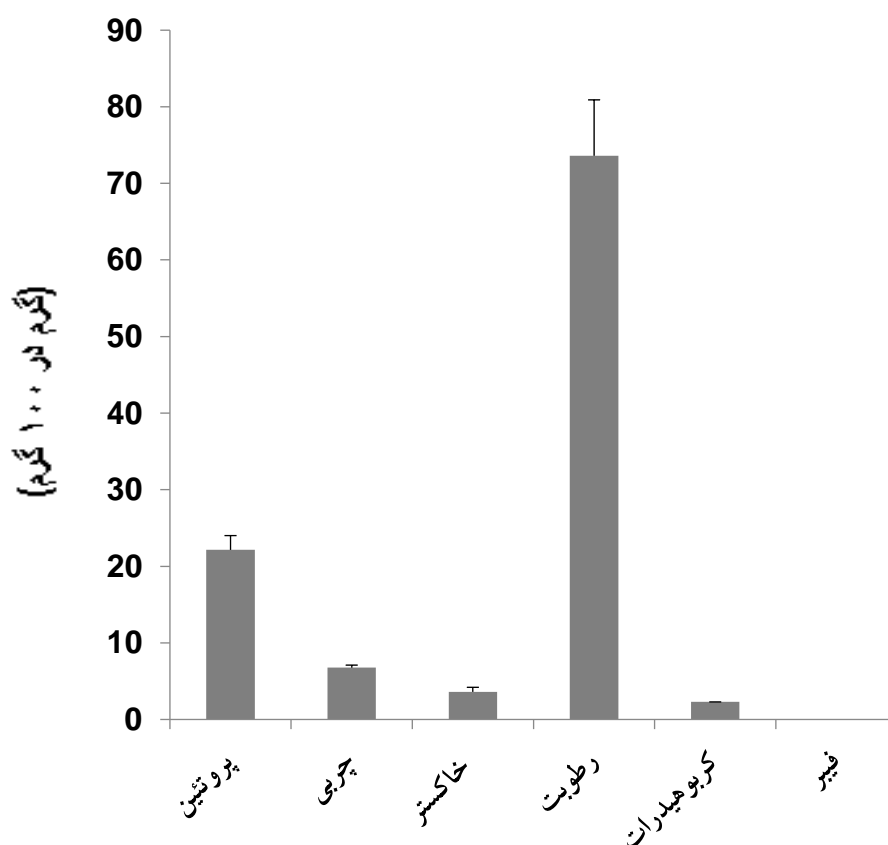
میزان ترکیبات شیمیایی شامل پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در ماهی تیلاپیای وارداتی و ماهی قزل آلی پرورشی در جدول ۱ آمده است. میزان کربوهیدرات در عضله ماهی قزل آلی پرورشی و ماهی تیلاپیای وارداتی مورد مطالعه در این تحقیق به ترتیب $2/39 \pm 2/1$ و $2/72 \pm 1/59$ و میزان فیبر در هر دو گونه مورد مطالعه صفر بود. بالاترین میزان پروتئین و چربی به ترتیب $22/14$ ، $6/76$ در 100 گرم وزن خشک در ماهی قزل آلی پرورشی و بالاترین میزان خاکستر $3/8$ در 100 گرم وزن خشک در ماهی تیلاپیای وارداتی بود. بالاترین میزان رطوبت نیز $75/6$ درصد در ماهی تیلاپیای وارداتی بود. بالاترین میزان پروتئین در ماهی قزل آلی پرورشی و بالاترین میزان خاکستر در ماهی تیلاپیای وارداتی بود. نتایج در جدول شماره ۱ و نمودار ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱: میزان ترکیب شیمیایی در نمونه های مورد مطالعه (درصد)

نمونه مورد مطالعه	ترکیبات شیمیایی	پروتئین	چربی	خاکستر	رطوبت
ماهی قزل آلاهی پرورشی		۲۲/۱±۱۴/۸۷ ^a	۶/۰±۷۶/۳۴ ^a	۳/۰±۶/۶ ^a	±۶/۷۳ ۷/۳ ^a
ماهی تیلاپپای وارداتی		۱۹/۶۸ ۲±/۱۵ ^a	۶/۲۴ ۱±/۱۴ ^b	۳/۸۰±/۶ ^a	۷۵/۶۴±/۷ ^b

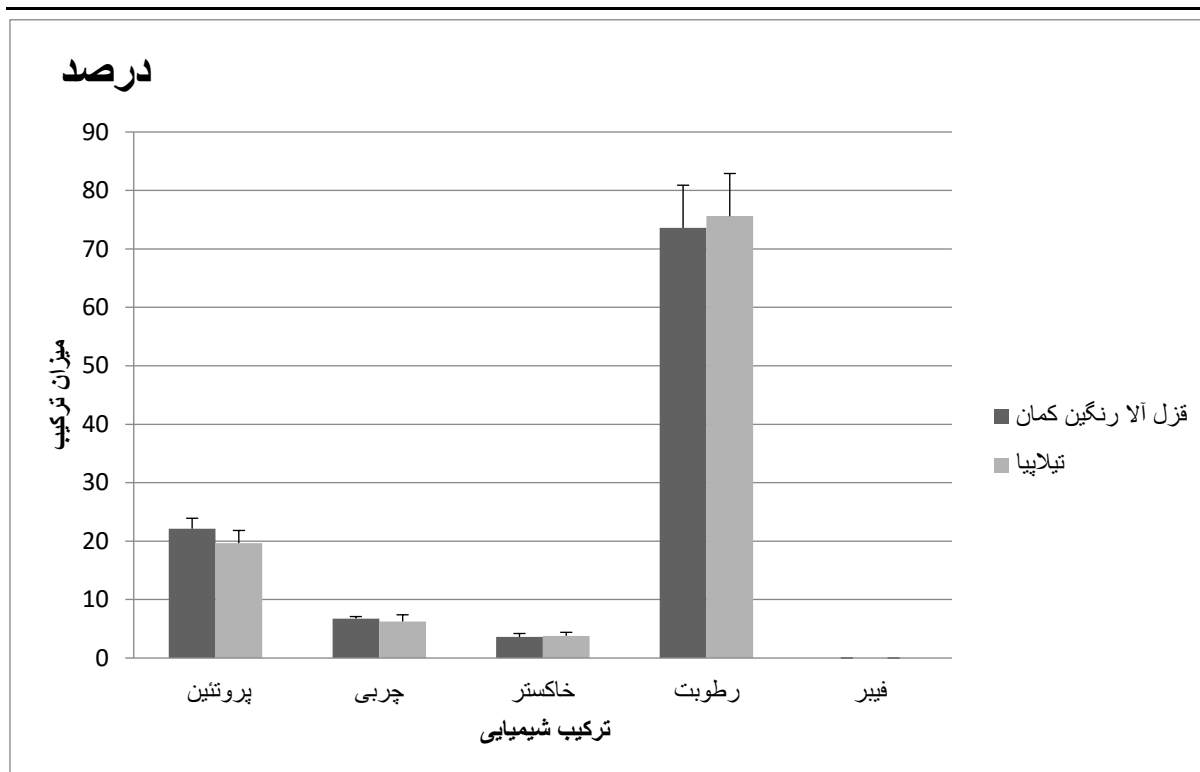
a,b همنام غیر معنی دار ، غیر همنام معنی دار

نمودار ۱: میزان ترکیبات شیمیایی در ماهی تیلاپپای وارداتی
(گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک)



نمودار ۲: میزان ترکیبات شیمیایی در ماهی قزل آلی پرورشی (گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک)

میزان پروتئین بین ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلی پرورشی اختلاف معنی داری نداشت ($P \geq 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان پروتئین به ترتیب در ماهی قزل آلی پرورشی ۲۲/۱۴ درصد و در ماهی تیلاپیای وارداتی ۱۶/۱۵ درصد بود. میزان چربی بین ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلی پرورشی اختلاف معنی داری داشت ($P < 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان چربی به ترتیب در ماهی قزل آلی پرورشی ۶/۷۶ درصد و در ماهی تیلاپیای وارداتی ۴/۱۴ درصد بود. میزان خاکستر بین ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلی پرورشی اختلاف معنی داری نداشت ($P \geq 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان خاکستر به ترتیب در ماهی تیلاپیای وارداتی ۳/۸ درصد و در ماهی قزل آلی پرورشی ۲/۶ درصد بود. میزان رطوبت بین ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلی پرورشی اختلاف معنی داری داشت ($P < 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان رطوبت به ترتیب در ماهی تیلاپیای وارداتی ۷۵/۶ درصد و در ماهی قزل آلی پرورشی ۷۱/۳ درصد بود (نمودار ۳).



نمودار ۳: میانگین ترکیبات شیمیایی در ماهی تیلاپیا و قزل آل (گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک)

بحث و نتیجه‌گیری

میزان پروتئین بین دو نمونه ماهی تیلاپیا و قزل آلا اختلاف معنی داری نداشت ($P \geq 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان پروتئین به ترتیب در ماهی قزل آلا ۲۲/۱۴ درصد و ماهی تیلاپیا ۱۶/۱۵ درصد بود. با توجه به نتایج مشاهده می شود که میزان پروتئین از ماهی قزل آلا در مقایسه با ماهی تیلاپیا کاهش می یابد، اما اختلاف معنی داری ایجاد نمی کند. میزان پروتئین در ماهیان دریایی مانند ماهی مرکب ۱۷ گرم در ۱۰۰ گرم (پاپهن و همکاران، ۱۳۸۹) و ماهی کاد ۱۵/۷ گرم در ۱۰۰ گرم (رضوی شیرازی، ۱۳۸۶) بود که در مقایسه با میزان پروتئین در قزل آلا پرورشی پایین تر بود. میزان پروتئین در گربه ماهی پرورشی ۱۹ (*Pangasianodon gigas*) گرم در ۱۰۰ گرم (Chaijan et al., 2010) بود که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

میزان چربی بین دو ماهی تیلاپیا و قزل آلا اختلاف معنی داری داشت ($P < 0/05$). بالاترین و پایین ترین میزان چربی به ترتیب در ماهی قزل آلا و ماهی تیلاپیا بود. میزان چربی در ماهی قزل آلا و تیلاپیا به ترتیب ۶/۷۶ ، ۴/۱۴ گرم در ۱۰۰ گرم بود. میزان چربی در دو گونه ماهی دریایی، ماهی مرکب ۸/۹ (پاپهن و همکاران، ۱۳۸۹) و تون زردباله ۸ گرم در ۱۰۰ گرم

(رضوی شیرازی، ۱۳۸۶) بود که در مقایسه با میزان چربی در ماهی قزل آلا و تیلاپیا بالاتر بود. میزان چربی در ماهی کاد ۰/۴ گرم در ۱۰۰ گرم (رضوی شیرازی، ۱۳۸۶) بود که در مقایسه با میزان چربی در این تحقیق همخوانی ندارد .

میزان خاکستر بین دو ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلا ی پرورشی اختلاف معنی داری نداشت ($P \geq 0.05$). بالاترین و پایین ترین میزان خاکستر به ترتیب در ماهی تیلاپیای وارداتی ۳/۸ و ماهی قزل آلا ی پرورشی ۲/۶ بود. میزان خاکستر در سه گونه ماهی دریایی، ماهی مرکب ۱ (پاپهن و همکاران، ۱۳۸۹)، ماهی کاد ۱/۲ و تون زردباله ۱ گرم در ۱۰۰ گرم (رضوی شیرازی، ۱۳۸۶) بود که در مقایسه با میزان خاکستر در بررسی حاضر پایین تر بود. میزان خاکستر در ماهیان آب شیرین ماهی انجک ۱-۱/۷ و ماهی خواجه ۱-۱/۹۱ گرم در ۱۰۰ گرم (زکی پور رحیم آبادی و همکاران، ۱۳۸۸)، ماش ماهی ۱/۰۱ و اردک ماهی ۰/۹۹ گرم در ۱۰۰ گرم (Zmijewski et al., 2006)، گربه ماهی پرورشی ۱/۴۷ گرم در ۱۰۰ گرم (Chaijan et al., 2010) بود که با نتایج تحقیق حاضر هماهنگی ندارد.

میزان رطوبت بین دو نمونه ماهی تیلاپیای وارداتی و قزل آلا ی پرورشی اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$). بالاترین و پایین ترین میزان رطوبت به ترتیب در تیلاپیای وارداتی ۷۵/۶ و قزل آلا ی پرورشی ۷۱/۳ بود. میزان رطوبت در سه گونه ماهی دریایی، ماهی مرکب ۷۳/۰۲ (پاپهن و همکاران، ۱۳۸۹)، ماهی کاد ۸۲/۸ و تون زردباله ۶۸/۲ گرم در ۱۰۰ گرم (رضوی شیرازی، ۱۳۸۶) بود که در مقایسه با میزان رطوبت در بررسی حاضر همخوانی ندارد. میزان رطوبت در ماهیان آب شیرین ماهی انجک ۷۶-۸۱/۶۵ و ماهی خواجه ۷۵-۷۹/۷ گرم در ۱۰۰ گرم (زکی پور رحیم آبادی و همکاران، ۱۳۸۸)، ماش ماهی ۷۷/۶۴ و اردک ماهی ۸۰/۳۲ گرم در ۱۰۰ گرم (Zmijewski et al., 2006)، گربه ماهی پرورشی ۷۸/۸۸ گرم در ۱۰۰ گرم (Chaijan et al., 2010)، کپور پرورشی ۷۴/۰۱ گرم در ۱۰۰ گرم (عسکری ساری و همکاران، ۱۳۹۰) و ماهی کاتلا ۷۸/۸۴ گرم در ۱۰۰ گرم (Salam et al., 2000) بود که با نتایج تحقیق حاضر هماهنگی دارد .

باتوجه به نتایج میزان پروتئین و چربی در ماهی قزل آلا ی پرورشی نسبت به ماهی تیلاپیای وارداتی بالاتر بود و میزان خاکستر و رطوبت در ماهی تیلاپیای وارداتی نسبت به ماهی قزل آلا ی پرورشی بیشتر بود.

تشکر و قدردانی

در پایان صمیمانه از همکاری آزمایشگاه بخش تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اهواز و از زحمات جناب دکتر عسکری ساری تشکر و قدردانی مینمایم.

منابع

- ابراهیمی، ع.، پوررضا، ج.، پاناماریوف، س.و.، کمالی، ا. و حسینی، س.ع. (۱۳۸۳). اثر مقادیر مختلف چربی و پروتئین بر شاخص های رشد و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهیان انگشت قد فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علوم و فنون منابع طبیعی و کشاورزی، ۸ (۲)، ۲۲۹ تا ۲۴۱.
- اسماعیل زاده، ج.، روستایان، ع. و مرادی، ش. (۱۳۸۵). شناسایی و بررسی برخی ترکیبات آلی در روغن کبد ماهی کفال طلایی و مقایسه آن با روغن کبد بعضی از ماهیان پرمصرف ایران. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۱ (۲)، ۷۵ تا ۹۵.
- اشجع اردلان، ا.، عمادی، ح.، بهزادی، د. و خوش خو، ژ. (۱۳۸۳). تعیین ارزش غذایی اویستر صخره ای (*Saccostrea cucullata*) در سواحل دریای عمان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۳ (۲)، ۲۳ تا ۳۲.
- اشجع اردلان، ا.، خوش خو، ژ.، معینی، س. و ربانی، م. (۱۳۸۵). تعیین ارزش دوکفه ای *Anodonta cygnea* در منطقه سلکه تالاب انزلی در دو فصل پاییز و بهار. مجله علمی شیلات ایران، ۱۵ (۳)، ۹ تا ۲۲.
- اشجع اردلان، ا.، سهرابی، م.ر. و کرمی، ب. (۱۳۸۶). تعیین ارزش غذایی اردک ماهی (*Esox lusius*) در دو منطقه آبکنار و شیجان تالاب انزلی. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۲ (۵)، ۴۳ تا ۵۳.
- بهزادی، د. (۱۳۸۰). تعیین ارزش غذایی اویستر صخره ای *Saccostrea cucullata* در سه منطقه بريس، چابهار و تنگ در سواحل دریای عمان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۷۱ صفحه.
- پاپهن، ف.، جزایری، ا.، معتمدی، ح. و محمودی اصل، ص. (۱۳۸۹). بررسی ماهی مرکب (*Sepia arabica*) خلیج فارس از نظر ارزش غذایی. اولین همایش علوم آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر. ۱۱ صفحه.
- پروانه، و. (۱۳۷۷). کنترل کیفی و آزمایش های شیمیایی مواد غذایی، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، چاپ سوم. ۳۲۵ صفحه.
- تاکون، ا.ج. (۱۳۸۴). غذا و تغذیه ماهی و میگوی پرورشی (دستورالعمل آموزشی مواد مغذی ضروری)، (ترجمه: نائره بشارتی)، تهران: انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. ۱۸۹ صفحه.
- جاننسون، و.ا.، نیکلسون، ف.ج.، راجر، ا. و استوارد، ج.د. (۱۳۸۴). انجماد و نگهداری محصولات شیلاتی در سردخانه ها، (ترجمه: ترانه سادات جان فدا)، تهران: انتشارات نقش مهر، چاپ اول. ۲۶۹ صفحه.
- جان فدا، ت. (۱۳۸۴). انجماد و نگهداری محصولات شیلاتی در سردخانه ها (ترجمه). انتشارات نقش مهر، چاپ اول، تهران. ۲۶۹ صفحه.
- خواجه پور، ف. و حسینی، س.ع. (۱۳۸۹). ترکیب شیمیایی، فسفر و کلسیم عضله فیل ماهیان تغذیه شده با اسید سیتریک. مجموعه مقالات همایش کشوری ایمنی مواد غذایی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ساری، صفحه ۲۴۸.

خورشیدپور، ب. (۱۳۷۱). بررسی تغییرات پروتئین، چربی، خاکستر و کربوهیدرات در برخی از تون ماهیان. مجله علمی شیلات ایران، ۱، ۶۰ تا ۷۶.

چوی، ر. (۱۳۸۹). بررسی اثر زمان نگهداری میگوی پرورشی لیپتوپنائوس وانامی منجمد در سردخانه بر کیفیت چربی و اسیدهای چرب آن. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان.

رضوی شیرازی، ح. (۱۳۸۰). تکنولوژی فرآورده های دریایی (علم فرآوری جلد دوم)، تهران: انتشارات نقش مهر، چاپ اول. ۲۹۲ صفحه.

رضوی شیرازی، ح. (۱۳۸۶). تکنولوژی فرآورده های دریایی (اصول نگهداری و عمل آوری جلد اول)، تهران: انتشارات پارس نگار، چاپ دوم. ۳۲۵ صفحه.

رکنی، ن. (۱۳۸۵). علوم و صنایع گوشت، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، چاپ چهارم. ۳۲۰ صفحه.

روستایان، ع.، کمیلی زاده، ح. و سهرابی، ا. (۱۳۸۵). بررسی و شناسایی ترکیبات طبیعی موجود در بافت های کبد و عضله ماهی حلوا سفید (*Pampus argenteus*). مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۱ (۳)، ۶۵ تا ۷۸.

روستایان، ع.، کمیلی زاده، ح. و فتوحی، م. (۱۳۸۵). شناسایی و بررسی ترکیبات عضله و کبد ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در خلیج فارس. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۱ (۳)، ۵۳ تا ۶۰.

سالنامه آماری شیلات ایران. (۱۳۸۹). سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۸-۱۳۷۹، تهران: انتشارات سازمان شیلات ایران، چاپ اول. ۶۰ صفحه.

ستاری، م.؛ شاهسونی، د.؛ شفیعی، ش. ۱۳۸۲. ماهی شناسی ۲ (سیستماتیک). چاپ اول، تهران: انتشارات حق شناس، ۵۰۲ صفحه.

سعیدی، ه. و اشجع اردلان، ا. (۱۳۸۹). ارزش غذایی صدف دوکفه ای دسته چاقویی (*Solen dactylus*) در دو دوره رسیدگی و استراحت جنسی در ساحل گلشهر بندر عباس (خلیج فارس). مجله علمی شیلات ایران، ۱۹ (۲)، ۵۱ تا ۵۸.

سیف آبادی، ج.، نگارستان، ح. و مقدسی، ب. (۱۳۸۳). تعیین ترکیب شیمیایی گاماروس (*pontogammarus maeoticus*) در طول سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علوم دریایی ایران، ۹، ۵۱ تا ۵۵.

شعبان پور، ب.، شعبانی، ع.، معینی، س.، حامدی، م. و پور کبیره، م. (۱۳۸۵). اثر شرایط مختلف شستشو بر ترکیب شیمیایی و خواص تولید ژل سوریمی کیلکای آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*). مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، ۷۲، ۸۴ تا ۹۲.

شعبی، ش.، روستایان، ع. و اشجع اردلان، ا. (۱۳۸۶). استخراج و شناسایی اسیدهای چرب موجود در عضله و کبد خامه ماهی (*Chanos Chanos*) در بندرعباس. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۲ (۵)، ۵۴ تا ۶۵.

- شهبازی، پ. و ملک نیا، ن. (۱۳۸۶). بیوشیمی عمومی، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، چاپ بیست و ششم. ۵۰۲ صفحه.
- صادقی، ن. (۱۳۸۰). پرورش قزل آلی رنگین کمان. انتشارات نقش مهر، چاپ اول، تهران. ۳۹ صفحه.
- صفری، ر.، ایمان پور، م.ر. و شعبان پور، ب. (۱۳۸۶). بررسی ارتباط ترکیب شیمیایی بافت عضله با مراحل سیکل رسیدگی جنسی گنادر ماهی کپور دریای خزر. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، ۷۷، ۶۳ تا ۶۹.
- صفری، ر.، ایمان پور، م.ر. و شعبان پور، ب. (۱۳۸۸). اثر مراحل رسیدگی جنسی روی ترکیب شیمیایی عضله ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در خلیج گرگان. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۶ (۱).
- عربی، س.، روستاییان، ع. و تقوایی گنجعلی، س. (۱۳۸۶). بررسی و شناسایی برخی از ترکیبات طبیعی و اسیدهای چرب موجود در روغن کبد ماهی قزل آلی رنگین کمان، ۲ (۴)، ۱ تا ۸.
- عسکری، ر. (۱۳۸۴). مروری بر ماهی شناسی سیستماتیک، تهران: انتشارات نقش مهر، چاپ اول. ۲۶۷ صفحه.
- عسکری ساری، ا.، آذربور، م. و بزرگ پور، ا. (۱۳۹۰). بررسی مقایسه ای ترکیب شیمیایی عضله ماهی کپور پرورشی (*Cyprinus carpio*) و میگوی سفید هندی پرورشی (*Penaeus indicus*). مجله تالاب، ۲ (۷)، ۵۷ تا ۶۳.
- علوی، م.، روستاییان، ع. و اشجع اردلان، ا. (۱۳۸۷). استخراج و شناسایی ترکیبات طبیعی غیرقطبی موجود در کبد و عضله سرخو ماهی معمولی (*Lutjanus johni*). مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۳ (۲)، ۴۰ تا ۵۶.
- عمادی، ح. (۱۳۸۶). تاریخچه و نقش آبزیان در تأمین غذای انسان. ماهنامه آبزیان، ۸۳: ۱۰ تا ۱۵.
- عمادی، ح.، معینی، س. و محمودی، ا. (۱۳۸۶). مقایسه برخی عوامل بیوشیمیایی گوشت تاس ماهی ایرانی در محیط های پرورشی و دریایی. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۲ (۴)، ۱۸ تا ۲۸.
- عمادی، ح. (۱۳۸۷). راهنمای تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و ماهی آزاد (ترجمه). انتشارات آبزیان، چاپ نهم، تهران.
- فرزانفر، ع. (۱۳۸۴). تکثیر و پرورش آزاد ماهیان، تهران: انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. ۱۸۲ صفحه.
- فلاحی، ف.، اشجع اردلان، ا. و روستاییان، ع. (۱۳۸۶). بررسی و شناسایی چربی های موجود در کبد، عضله و خاویار تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۲ (۵)، ۱۱ تا ۱۸.
- کلبی، د. (۱۳۸۷). چکیده بیوشیمی، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دهم. ۳۷۹ صفحه.
- محبوبی صوفیانی، ن.، فانی، ع.، فیضی، ز. و پوررضا، ج. (۱۳۸۲). اثر سطوح مختلف روغن ماهی کیلکا در جیره، بر صفات پرورشی و ترکیب شیمیایی بدن ماهی قزل آلی رنگین کمان. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۷ (۱)، ۲۴۵ تا ۲۵۲.
- مشایی، م. (۱۳۸۶). راهنمای پرورش و تکثیر ماهی قزل آلا، (ترجمه مهرداد عبدا... مشایی)، تهران: انتشارات دریا سر، چاپ سوم. ۲۰۸ صفحه.

نادری جلودار، م. و عبدلی، ا. (۱۳۸۳). اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر (آب های ایران)، تهران: انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، چاپ اول. ۸۰ صفحه

Adeyeye, E.I. and Adubiaro, H.O. (2004) Chemical composition of shell and flesh of three prawn samples from Lagos lagoon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 411–414.

Ali, M., Ighbal, F., Salam, A., Iram, S. and Athar, M. (2005) Comparative study of body composition of different fish species from brackish water pond. *International Journal of Environment Science and Technology*, 2 (3), 229-232.

AOAC, 1995. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists. INC., Arlington, Virginia, USA.

Bhourri, A.M., Bouhleb, I., Chouba, L., Hammami, M., Cafsi, M.El. and Chaouch, A. (2010) Total lipid content, fatty acid and mineral compositions of muscles and liver in wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *African Journal of Food Science*, 4 (8), 522-530.

Chaijan, M., Jongjareonrak, A., Phatcharat, S., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. (2010) Chemical compositions and characteristics of farm raised giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle. *Food Science and Technology*, 43, 452–457.

Carvallho, A.F.U., Farias, D.F., Barroso, C.X., Sombra, C.M.L., Silvino, A.S., Menezes, M.O.T., Soares, D.A.O. and Gouveia, S.T. (2007) Nutritive value of three organisms from mangrove ecosystem (*Ucides cordatus*, *Mytella* sp. and *Crassostrea rhizophora*). *Brazilian Journal of Biology*, 787-788.

Conner, W.E., Neuringer, M. and Reisbick, S., (1992) Essential fatty acids: The importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr. Rev.*, 50, 21-29.

Echina, L., Granado, L. (2001) Seasonal variation in the physiological status and energy content of somatic and reproductive tissues of chub. *Marine biology*, 120 (4), 503-511.

Eliassen, J.E. and Vahl, O. (1982) Seasonal variations in the gonad size and the protein and water content of cod, *Gadus morhua* (L.), muscle from Northern Norway, *Journal of Fish biology*, 20, 527-531.

FAO (Food and Agriculture Organization). (2010) Yearbook annuaire anuario. Fishery and Aquaculture Statistics. Roma. 100P.

Fawole, O.O., Ogundiran, M.A., Ayandiran, T.A. and Olagunju, O.F. (2007) Proximate and Mineral Composition in Some Selected Fresh Water Fishes in Nigeria. *Internet Journal of Food Safety*, 9, 52-55.

Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S., (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.

Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A., and Hole, M., (2002) Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 477-485.

Jafari, A.K., and Khawaja, D.K., (1968) Seasonal changes in the biochemical composition of the freshwater murrel, *Ophiocephalus punctatus* Bloch. *Hydrobiologia*, 32, 502-511.

Jey, T., Douglas, R. and George, F. (1996) Nutritional value of winter foods for whooping cranes. *Wilson Bull*, 108, 278-739.

- Khalko, V.V. and Khalko, N.A. (2002) Composition analysis of diurnal variations in lipid composition of juvenile roach *Rutilus rutilus* at unlimited food availability and starvation. *Journal of Ichthyology*, 42, (9), 795-806.
- Khalko, V.V. and Khalko, N.A. (2003) Diurnal Change in Quantitative Composition of Phospholipids in Young Roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes, Cyprinidae) under Natural Fluctuations of Water Temperature and Foraging Intensity. *Journal of Ichthyology*, 43, 471-482.
- Komova, N.I. (2001) Dynamics of the biochemical composition of tissue in *Abramis brama* (cyprinidae) at gonad maturation. *Journal of Ichthyology*, 41 (4), 334-342.
- Leslie, N., Kimberly, L. and Robert, L. (2005) Nutritional composition and marketable shelf-life of blood ark clams and Ponderous ark clams. University of Florida. Gainesville, USA, 1-6.
- Mohamed, H.A.E., Al-Maqbaly, R. and Mohamed Mansour, H. (2010) Proximate composition, amino acid and mineral contents of five commercial Nile fishes in Sudan. *African Journal of Food Science*, 4 (10), 650-654.
- Oksuz, A., Ozilmaz, A., Aktas, M., Gercek, G. and Motte, J. (2009) A Comparative Study on Proximate, Mineral and Fatty Acid Compositions of Deep Seawater Rose Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) and Red Shrimp (*Plesionika martia*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8 (1), 183-189.
- Oksuz, A., Ozilmaz, A. and Kuver, S. (2011) Fatty Acid Composition and Mineral Content of *Upeneus moluccensis* and *Mullus surmuletus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 69-75.
- Onyia, L.U., Milam, C., Manu, J.M. and Allison, D.S. (2010) Proximate and mineral composition in some freshwater fishes in Upper River Benue, Yola, Nigeria. *Continental Journal Food Science and Technology*, 4, 1- 6.
- Ozden, O. (2010) Seasonal differences in the trace metal and macrominerals in shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from Marmara Sea. *Environment Monitoring and Assessment*, 162, 191-199.
- Ravichandran, S., Rameshkumar, G. and Rosario Prince, A. (2009) Biochemical Composition of Shell and Flesh of the Indian White Shrimp *Penaeus indicus* (H.milne Edwards 1837). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4 (3), 191-194.
- Rosa, R., Costa, P.R., Bandarra, N. and Nunes, M.L. (2005) Changes in tissue biochemical Composition and energy reserve associated with sexual maturation in the squids *Illex coindetii* and *Ommastrephid Todaropsis elanae*. *Marin biological laboratory*, 208, 100-103.
- Salam, A., Ali, M. and Masud, S. (2000) Effect of Various food deprivation regimes on body composition dynamics of Thailand, *Catla catla*. *Journal of Research (Science) Bahauddin Zakariya University*, 11 (1), 26-32.
- Solberg, C., Williamsen, L., Ambles, S., Johanessen, T. and Sreier, H. (2006) The effects of feeding frequencies on seasonal changes in growth rate and chemical composition of farmed cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquaculture Nutrition*, 12, 157 -165.
- Sudhakar, M., Manivannan, K. and Soundrapandian, P. (2009) Nutritive Value of Hard and Soft Shell Crabs of *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 1 (2), 44-48.
- Tzikas, Z., Amvrosiadis, I., Soultos, N. and Georgakis, Sp. (2007) Seasonal variation in chemical composition of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) muscle from North Aegean Sea (Greece). *Food Control*, 18, 251-257.
- Vijayan, K. and Diwan, A.D., (1996) Fluctuations in Ca, Mg and P levels in the hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during moulting cycle of the Indian white prawn, *Penaeus indicus* (Decapod; Penaeidae). *Comp. Biochem. Physio.*, 114A, 91-97.

-
- Yildiz, M., Şener, E. and Timur, M. (2007) Effects of variations in feed and seasonal changes on body proximate composition of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7, 45-51.
- Walton, M.J. and Cowey, C.B. (1982) Intermediary metabolism in fish. *Com. Biochem. Physiol*, 73, 59-72.
- Zmijewski, T., Roman, K., Jankowska, B. and Mamcarz, A. (2006) Slaughter yield, proximate and fatty acid composition and sensory properties of Rapfen (*Aspius aspius*) with tissue of bream (*Abramis brama*) and pik (*Esox lucius*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 176-181.

Chemical composition compared on *Oreochromis niloticus* and *Oncorhynchus mykiss* muscle from Khouzestan province

F. Naghibi¹, A. Askary Sary^{2*}

Received:2017.02.04

Accepted:2018.11.11

Abstract

This study has about to compare the protein, fat, carbohydrate, fiber, ash and humidity between *Oreochromis niloticus* (import fish) and *Oncorhynchus mykiss* (farmed trout). The samples were collected from Ahwaz bazars by determining their entry origin. Data analysis was carried out using the SPSS17 software, Duncan's test and the one-way variance analysis (ANOVA). The significant difference was determined level of 95% ($P=0.05$). The level of carbohydrate in the muscle of both studied fish was 2.72 ± 1.59 and the rate of fiber was non-measurable and zero. The maximum rate of protein, fat and ash were respectively 22.14, 6.76, 3.8g per 100g dry weight. The maximum rate of the humidity was also 75.6%. The maximum amount of protein and fat was seen in farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the maximum rate of ash and humidity was observed in *Oreochromis niloticus*. The rate of ash and protein didn't have a significant difference between two species ($P\geq 0.05$) but there was a significant difference between the rate of humidity and the amount of fat ($p<0.05$).

Keywords: *Oreochromis niloticus*, *Oncorhynchus mykiss*, Muscle, Chemical compounds, Protein

1- Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2-Department of Fishery, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

*(Corresponding Author: Askary_sary@yahoo.com and naghibifatemeh25@yahoo.com)

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* تیمار شده با اشعه UV در

فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم

ملوس شیدایی^۱، رضا حاج حسینی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* از مهمترین باکتری‌های شرکت کننده در فرآیند فروشویی میکروبی اورانیوم بوده که در آن، آهن فریک به عنوان یک پذیرنده الکترون عمل کرده و U^{+4} نامحلول را به U^{+6} محلول، تبدیل می‌کند. در مطالعه حاضر، باکتری دخیل در فرآیند فروشویی میکروبی اورانیوم با استفاده از اشعه UV در سه دوز ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه جهش داده شد. باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف سنگ اورانیوم قرار داده شده و بازده فروشویی میکروبی آنها بررسی گردید. سپس، در توالی‌های ۲۴ ساعته میزان استخراج اورانیوم، تغییرات pH و Eh آنها اندازه‌گیری شد. نهایتاً، بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف با استفاده از روش *Real time PCR* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان می‌دهد تغییرات Eh، pH و استخراج اورانیوم در فرآیند فروشویی میکروبی توسط باکتری‌های جهش یافته و وحشی با چگالی پالپ بالای سنگ نسبت به باکتری‌های کشت یافته با چگالی پالپ پائین‌تر به تأخیر افتاده است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی در غلظت‌های مختلف کانسنگ نشان داد که جهش و غلظت سنگ بر روی بیان ژن مذکور موثر بوده است. به عبارتی دیگر می‌توان اذعان داشت که تغییرات بیان ژن *rus* عامل تاثیر گذاری بر فعالیت باکتری در استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، می‌باشد. در تحقیق حاضر، باکتری بومی تا ۵۰٪ کانسنگ معدن سازگار شده که مقدار بسیار قابل توجهی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فروشویی میکروبی اورانیوم، *Acidithiobacillus ferrooxidans* ژن *rus* *Real time*

PCR

مقدمه

نیاز روزافزون به مواد اولیه، کاهش ذخایر معدنی با عیار بالا، ضرورت مصرف بهینه انرژی و رعایت دقیق معیارهای زیست محیطی، بروز تحولاتی در عرضه فرآوری مواد معدنی و استخراج فلزات را به دنبال داشته است (Smith, 2009).

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۲- دانشگاه پیام نور گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه تهران

* نویسنده مسئول: hosseini@pnu.ac.ir

در این راستا، یکی از راه حل هایی که در طی دهه های گذشته در دنیا مطرح شده فروشویی میکروبی (Bioleaching) است. فروشویی میکروبی شامل فنونی است که از میکروارگانیسم ها و یا بخشی از سلول برای دسترسی به برخی از اهداف صنعتی، معدنی و زیست محیطی بهره برداری می شود. در این روش غالباً از میکروارگانیسم های اسیددوست اکسید کننده آهن و گوگرد استفاده می شود. این فرآیند از کاربردهای بیو هیدرومتالوژی است که برای استخراج فلزاتی مانند مس، روی، آرسنیک، نیکل، مولیبدن، طلا، نقره، کبالت و اورانیوم استفاده می گردد (Kinnunen and Puhakka, 2005). اگر غلظت فلز در کانسنگ از نظر اقتصادی به قدری پائین باشد که نتوان با روش های معمول شیمیایی آن را استخراج کرد، بیولیچینگ مناسب ترین گزینه است (Dong et al., 2010). فرآیندهای میکروبی مزیت های اقتصادی آشکاری در بازیافت فلزات از رسوبات معدنی با عیار پائین داشته اند. فرآیندهای استخراج میکروبی فلزات نسبت به فرآیندهای فیزیکی- شیمیایی، علاوه بر ایجاد آلودگی های کمتر در محیط زیست، نسبت به فرآیندهای برشته کردن و ذوب کردن به انرژی کمتری نیاز دارند. به علاوه، باقیمانده های معدنی و فاضلاب های تولید شده از فرآیندهای فیزیکی- شیمیایی در معرض باران و هوا، به صورت بیولوژیکی استخراج شده و تولید اسید ناخواسته و آلودگی فلزی می کنند (Rawlings, 2005).

میکروارگانیسم های مختلفی قادر به انجام این فرایند هستند که *Acidithiobacillus ferrooxidans* از مهمترین باکتری های دخیل در این فرایند است (Rawlings, 2005). اکسایش یون آهن (II) توسط اسیدیتیبیواسیلوس فروکسیدانس در دو مسیر downhill و uphill صورت می گیرد، اما هر دو مسیر در طبیعت با یکدیگر رابطه دارند. در مسیر downhill، الکترون ها به صورت بیولوژیکی از آهن (II) به کمک یک سری از ناقل های الکترونی از غشای خارجی به سیتوپلاسم منتقل می شوند، جایی که از آنها برای احیای اکسیژن به آب استفاده می شود. این مسیر انتقال الکترون به شرح زیر می باشد (Appia-Ayme et al., 1999):

$$\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Cyc2} \rightarrow \text{rusticyanin} \rightarrow \text{Cyc1} \rightarrow \text{cytochrome oxidase aa3 (Cox BACD)} \rightarrow \text{O}_2 \text{ cytoplasmic}$$

راستی سیانین، یک پروتئین مس-آبی محلول ۱۶/۵ کیلودالتونی با پتانسیل ردوکس بالا (۶۸۰ میلی ولت) و پایداری اسیدی، یکی از پروتئین هایی است که کامل ترین مطالعات روی آن انجام شده است. این پروتئین در مسیر انتقال الکترون از طریق اکسیداسیون آهن غشای پلاسمایی نقش ایفا می کند (Appia-Ayme et al., 1999).

بهبود عملکرد باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* به منظور افزایش راندمان فروشویی میکروبی کانسنگ اورانیوم شماره ۲ ساغند یزد یکی از اهداف اصلی تحقیق حاضر می باشد. به منظور تحقق بخشیدن به این هدف، در مطالعه حاضر تاثیر جهش با اشعه UV در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

از آنجایی که غلظت کانسنگ مورد استفاده در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم بسیار موثر بوده، بر آن شدیم تا در حضور غلظت های مختلف کانسنگ اورانیوم، میزان عملکرد و بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی را مورد بررسی قرار

مواد و روش‌ها

کشت باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans*

به منظور رشد بهینه و تهیه مایه تلقیح، ابتدا محیط کشت اختصاصی 9K باکتری *Jahani Acidithiobacillus* sp. FJ2 (Jahani *et al.*, 2015)، تهیه شد. این محیط شامل: ۳ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم KCl ، ۰/۱۰ گرم $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و ۲۰ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در یک لیتر آب مقطر می باشد. پس از آماده سازی، pH محیط کشت با استفاده از اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۱۰ نرمال، سود (NaOH) ۱۰ نرمال، به روی ۲ تنظیم و ۱۰٪ باکتری/اسیدیتوباسیلوس اضافه گردید (Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). سپس، نمونه آماده شده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکردار با دور همزن ۱۸۰ rpm به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید (Shahroz *et al.*, 2012).

القای جهش در باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans*

به منظور ایجاد جهش در باکتری مورد نظر، باکتری در فاز لگاریتمی برداشته و با استفاده از سانتریفیوژ با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جمع آوری شد. سپس، رسوب باکتری سه بار با استفاده از آب اسیدی شسته شده و در نهایت در محیط کشت فاقد منبع آهن حل گردید. در ادامه، ۱۰ میلی لیتر از باکتری های آماده سازی شده در ۴ پلیت ریخته شد. فاصله بین پلیت ها و منبع نور UV به اندازه ۳۰ سانتی متر تنظیم گردیده و نمونه ها به مدت ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه در معرض نور UV با قدرت ۳۰ وات و طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار داده شدند. پس از جهش، به منظور حفظ تغییر ایجاد شده و عدم بازسازی ژنوم باکتری، نمونه ها به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Yuan *et al.*, 2013). در نهایت، نمونه ها در محیط کشت 9k در شرایط بهینه رشد کشت داده شده و برای آزمایشات فروشویی میکروبی اورانیوم مورد استفاده قرار گرفتند.

سازگاری باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* با غلظت های متفاوت پودر سنگ معدن اورانیوم

به منظور بررسی اثر غلظت اورانیوم (به عنوان یک ماده سمی و تنش زا) بر بیان ژن *rus* و همچنین عملکرد باکتری های جهش یافته در استخراج اورانیوم، باکتری های *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی با درصدهای مختلف پودر سنگ معدن اورانیوم کشت داده شدند. بدین منظور، از غلظت های متفاوت کانسنگ اورانیوم برابر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰٪ برای بررسی تاثیر بر روی بیان ژن *rus* باکتری ها استفاده گردید.

در نمونه کنترل منفی موجود در این مطالعه، به جای مایه تلقیح، از مخلوط متانول- فرمالدهید به نسبت ۱:۹ استفاده شد. در این مطالعه، از پودر کانسنگ اورانیوم آنومالی (II) ساغند یزد استفاده گردید که خصوصیات شیمیایی کانسنگ مورد استفاده در جدول ۱ قابل مشاهده می باشد.

جدول ۱: ترکیبات موجود در پودر کانسنگ اورانیوم با استفاده از آنالیز XRF

MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	U
19.03 wt %	1.49 wt %	24.83 wt %	49.67wt%	465 ppm

برای انجام این مرحله، ۱۰٪ از مایه تلقیح تغلیظ شده شامل باکتری های جهش یافته و وحشی با تعداد مشخصی از سلول در حدود 10^8 ، به میزان معینی از محیط کشت 9K اضافه شد (۱۰۰ ml باکتری به ۹۰۰ ml محیط کشت اضافه شد). سپس، به این محلول میزان ۵٪ کانسنگ آنومالی دو ساغند یزد با ابعاد $106 \mu m$ اضافه گردیده و با استفاده از اسید سولفوریک ۱۰ نرمال، سود ۱۰ نرمال، pH محیط کشت بر روی ۲ تنظیم گردید. سپس، تمام ارلن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکردار با دور همزن 150 rpm انکوبه شدند. در مرحله بعدی، در توالی های ۲۴ ساعته میزان ۱۰ cc از لیچ‌لیکور (Leach liquor) به منظور بررسی میزان اورانیوم (با استفاده از آنالیز ICP) محلول برداشته شد و این میزان با آب مقطر pH=2 جبران گردید. همچنین، میزان تغییرات pH و Eh محیط در توالی های ۲۴ ساعته اندازه گیری و pH بر روی ۲ تنظیم گردید. زمانی که میزان استخراج اورانیوم به ۱۰۰٪ رسید، باکتری از محیط دارای چگالی پالپ کمتر به محیط حاوی چگالی پالپ بیشتر منتقل شد. در این مرحله، محیط کشت 9K در حجم مشخصی تهیه و با ۱۰٪ از باکتری‌های جمع آوری شده از چگالی پالپ ۵٪ توسط سانتریفیوژ با دور $2422 \times \text{rpm} = 4500 \text{ rpm}$ در زمان ۳۰ دقیقه، تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با دور همزن 150 rpm انکوبه شد. همچنین، همانند دفعات پیشین در توالی های ۲۴ ساعته میزان اورانیوم محلول موجود در نمونه، اندازه‌گیری شد. به علاوه، میزان تغییرات pH و Eh محیط در توالی های ۲۴ ساعته اندازه گیری و pH بر روی ۲ تنظیم گردید (Abhilash et al., 2009).

در ادامه، ۱۰٪ از لیچ لیکور مرحله قبل به محیط کشت جدید حاوی چگالی پالپ بیشتر که به ترتیب ۱۵، ۲۵ و ۵۰٪ سنگ اورانیوم می‌باشد، اضافه گردید (Abhilash et al., 2009).

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی

در این مطالعه، به منظور بررسی بیان ژنهای مورد نظر از qPCR استفاده شد. بررسی‌های ملکولی که در پی سازگارسازی باکتری‌ها وجود دارند، نیازمند غلظت بالای باکتری می‌باشد که بدین منظور، زمانی که در هر چگالی پالپ، استخراج اورانیوم به بالاترین میزان خود رسید (۱۰۰٪)، باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور $2400 \times \text{rpm} = 4500 \text{ rpm}$ در زمان ۳۰ دقیقه، جمع آوری شدند.

در این مطالعه، به منظور استخراج RNA از کیت تجاری استخراج RNA شرکت Thermo Scientific، آمریکا استفاده شد. به منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، میزان ۶ میکرولیتر RNA با ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم DNase (شرکت

از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. (ThermoScientific, #EN0521) و ۱ میکرولیتر بافر 10X آن که حاوی $MgCl_2$ می‌باشد، مخلوط شده و سپس با آب مقطر عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد.

به دنبال مرحله بالا، محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و محلول حاصل برای مرحله بعد که ساخت cDNA است، مورد استفاده قرار گرفت (Vera et al., 2009). قبل از انجام مرحله بعد، به منظور یکسان بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با Dnase، توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) خوانده شد. در نهایت، میزان معینی از RNA برای ساخت تمامی cDNAها استفاده شد.

در ادامه، به منظور ساخت cDNA از RNA استخراج شده، از کیت تجاری شرکت Thermo Scientific، آمریکا (#K1622) استفاده شد. به منظور تأیید ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (Polymerase Chain Reaction) برای ژنهای مورد نظر انجام شد که چرخه حرارتی آن به شرح زیر می‌باشد:

دناوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. چرخه تکثیر شامل ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای دناوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. تکمیل نهایی ساختار DNAهای تکثیر یافته، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. برای انجام واکنش PCR و Real time PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظرمان یعنی ژن *rus* و قسمتی از ژن 16S rRNA باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* استفاده گردید. ژن 16S rRNA در این مطالعه به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است، زیرا این ژن به عنوان یک ژن خانه دار (Housekeeping Gene) می‌باشد که میزان بیان آن در شرایط مختلف یکسان می‌باشد و به عنوان یک ژن استاندارد برای مقایسه با بیان سایر ژن‌ها استفاده می‌گردد (Yarzabal et al., 2004). جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی (5'-3')
<i>rus</i> (F)	GGCATAACCGCATAAGGAGGT
<i>rus</i> (R)	GAACCCGACCTTGGAGATTCC
<i>16S rRNA</i> (F)	CCTACGGGAGGCAGCAG
<i>16S rRNA</i> (R)	CGGTGCTTCTTCTTGGATTCACG

Real-Time PCR

واکنش Real time PCR، پس از ساخت cDNA و اطمینان حاصل کردن از صحت انجام آن، با استفاده از پرایمر اختصاصی و کیت تجاری شرکت TaKaRa، ژاپن انجام پذیرفت.

انجام این واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتری صورت پذیرفت. هر واکنش حاوی اجزایی به شرح جدول ۳ می‌باشد

جدول ۳: اجزای تشکیل دهنده یک واکنش Real-Time PCR

مقدار مصرفی	مواد مورد استفاده
5 μ l	Master Mix
0.2 μ l (10mM)	Forward primer
0.2 μ l (10mM)	Reverse primer
0.5 μ l (50 ng)	cDNA
0.2 μ l	ROX
3.9 μ l	Water (Nuclease free)

پس از مخلوط کردن مواد بالا، به منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن مورد آزمایش (*rus*) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (۱۶s rRNA) در پلیت‌ها به صورت سه تایی ریخته شد. همچنین، برای اطمینان حاصل کردن از عدم آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن، سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین گردید. به علاوه، برای اطمینان از جواب‌های حاصل و محاسبه میزان خطای کار، این آزمایش برای هر نمونه سه بار انجام شد. همچنین، بررسی بیان ژنهای مورد نظر در دیگر چگالی پالپ‌ها نیز با همین آرایش، در چندین پلیت ۴۸ خانه‌ای دیگر نیز صورت گرفت. برای انجام واکنش Real time PCR از دستگاه Applied Biosystems (StepOne) استفاده شد.

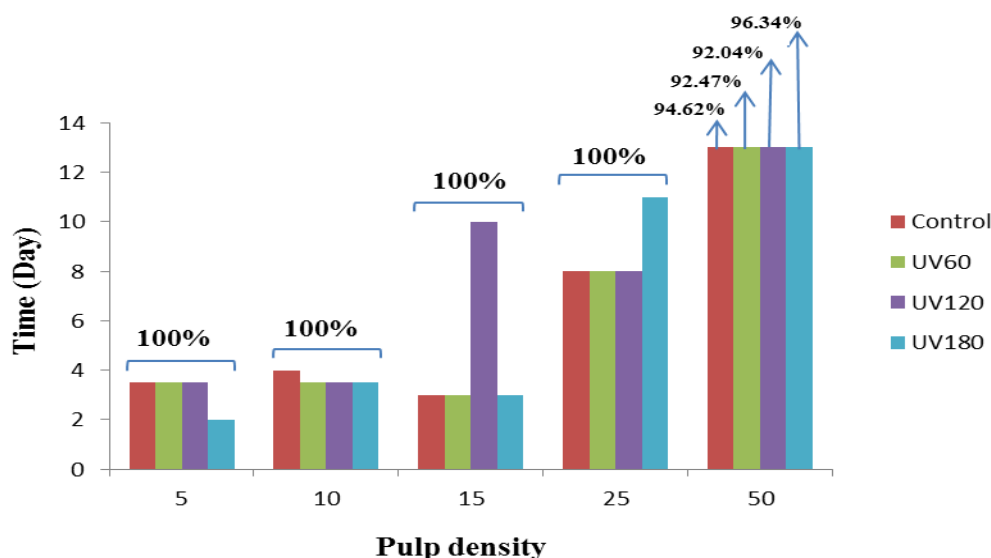
آنالیز آماری

قابل ذکر است که در این مطالعه تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام و آنالیز آماری صورت گرفت و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم افزار P-value داده‌ها، محاسبه گردید و $P < 0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم در پنج گروه مورد آزمایش: باکتری جهش یافته با سه دوز مختلف UV (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه)، کنترل (باکتری فاقد جهش) و کنترل منفی (نمونه بدون باکتری) به شرح زیر می‌باشد:

شکل ۱ تاثیر چگالی پالپ بر روی باکتری های جهش یافته و وحشی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم را نشان می دهد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که با افزایش چگالی پالپ، میزان استخراج اورانیوم کاهش یافته و مدت زمان لازم برای استخراج کامل فلز بیشتر شده است. در چگالی پالپ های ۵، ۱۰ و ۵۰٪، سرعت استخراج اورانیوم بوسیله باکتری های جهش یافته بیشتر از باکتری وحشی بوده است. در چگالی پالپ ۵٪، کل اورانیوم، پس از دو روز توسط باکتری جهش یافته با دوز ۱۸۰ ثانیه استخراج گردیده، در حالی که در سایر باکتری ها این مدت به سه روز افزایش یافته است. به علاوه، نتایج نشان دادند که در چگالی پالپ ۱۰٪ تمامی باکتری های جهش یافته دارای عملکرد بهتری نسبت به باکتری وحشی بوده اند. همچنین، در چگالی پالپ ۵۰٪ باکتری جهش یافته با دوز ۱۸۰ ثانیه دارای بهترین عملکرد در استخراج اورانیوم بوده است. به طور کلی می توان ادعان داشت که جهش دارای تاثیری مثبت بر روی عملکرد باکتری است.



شکل ۱: میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* (جهش یافته و نمونه وحشی) در حضور غلظت های مختلف از سنگ معدن اورانیوم.

نتایج آزمایش سازگارسازی حاکی از آن است که کاهش نرخ استخراج اورانیوم با افزایش دانسیته پالپ رخ می دهد. عوامل متعددی بر فرآیند فروشویی فلزات تاثیر می گذارند. این موارد شامل pH، دما، آمینواسیدها، فلزات سنگین، یون فریک، چگالی پالپ، مواد معدنی و ترکیبات آلی، نوع سنگ، نور و اشعه های مختلف، محیط کشت، سویه باکتری، دی اکسید کربن، اکسیژن، ORP (پتانسیل اکسیداسیون و احیا) می باشند (Chen and Lin, 2001). برخی از آن ها نظیر هومئوستازی، pH، ترکیبات معدنی و منبع انرژی، متعلق به محیط و شرایط اکولوژیکی فرآیند هستند. برخی دیگر نظیر غشای سلولی، پتانسیل ذخیره آن و فعالیت باکتری مربوط به خود میکروارگانیسم بوده و مواردی نظیر چگالی پالپ و اندازه ذرات، متعلق به فلز درگیر در فرآیند می باشند. برخی از این عوامل با توجه به محدوده عملکرد بهینه خود، باعث مهار یا بهبود فروشویی میکروبی می

شوند (Brandl, 2008). عناصر سنگین به شدت اثر مهاری روی رشد میکروارگانیسم ها دارند و می توانند برای میکروارگانیسم ها مرگ آور باشند. این فلزات شامل تورיום (Th)، اورانیوم (U)، جیوه (Hg) و نقره (Ag) می باشند که متابولیت های سلول را مهار می کنند و اثر سمی برای باکتریها دارند (Brandl, 2008). میزان مقاومت به فلزات سنگین در هر گونه، به سویه بستگی دارد. احتمالاً سازگار شدن با سطوح بالای فلز، دلیل عمده ی تغییر سویه ای باشد. تجربه پیشنهاد می کند که با اعمال فشار انتخابی بر جمعیت میکروارگانیسم ها برای رشد در حضور یون فلزی، میزان مقاومت آنها به میزان قابل توجهی نسبت به اغلب فلزات افزایش می یابد؛ هر چند که ممکن است این فرآیند در برخی موارد زمان زیادی طول بکشد. افزایش مقاومت به یون های فلزی می تواند از دو منبع اصلی ناشی شود: ایجاد جهش ژنتیکی در ژن های موجود در سلول یا اکتساب ژن های جدید از دیگر ارگانیسم های مقاوم به فلز از طریق فرآیندی موسوم به اشتراک ژنی افقی (Horizontal gene pool) دلیل این امر که تماس میکروب ها با فلزات موجب افزایش مقاومت آنها می شود را می توان در نتیجه تغییرات داخلی سلول دانست که به صورت جامع آزموده نشده است (Sand et al., 1995). یکی از دلایل دیگر که در چگالی پالپ های کمتر میزان استخراج اورانیوم نرخ بالایی دارد این است که O_2 یکی از اساسی ترین مواد مغذی برای رشد باکتری ها محسوب می شود و با افزایش چگالی پالپ میزان O_2 کاهش می یابد. در نتیجه افزایش چگالی پالپ را می توان با تعداد باکتری ها، کاهش میزان استخراج یون های فلزی در محلول، محدودیت دسترسی باکتری ها به O_2 و CO_2 و تخریب سلول های باکتری ها با ذرات کانسنگ مرتبط دانست. در چگالی پالپ های کمتر میزان انتقال جرمی اکسیژن بین تولید و مصرف آن متعادل است در حالی که برای چگالی پالپ های بالا نرخ اکسیژن مورد نیاز با میزان اکسیژن تولید شده طی انتقال آن بین گاز و مایع کمتر می باشد (Boon et al., 1998; Moon-Sung et al.,).

2005

همانگونه که از نتایج قابل مشاهده می باشد، در چگالی پالپ های پایین تر فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم بهتر و سریعتر بوده است. به بیانی دیگر، کاهش قابلیت فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می تواند به دلیل افزایش مالش بین ذرات سنگ باشد که باعث کم شدن چسبندگی بین ذرات و باکتری خواهد شد (Chong et al., 2002). از طرفی دیگر، سمیت در دوزهای بالای فلزات و یا سختی شرایط زیستی که رشد و فعالیت باکتری ها را درگیر می کند، اغلب از دلایل اصلی کاهش بهره وری فرایند فروشویی میکروبی در چگالی پالپ های بالا است. به علاوه، افزایش چگالی پالپ، باعث افزایش pH محیط می شود که خود باعث کاهش فعالیت باکتری های دخیل در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم خواهد شد (Chen et al., 2016). همچنین، نتایج نشان می دهد که در بالاترین چگالی پالپ استخراج اورانیوم به طور کامل صورت نگرفته و بیشترین میزان استخراج اورانیوم مربوط به باکتری جهش یافته می باشد. به علاوه، نتایج این آزمایشات حاکی از آن است که کاهش نرخ استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ رخ می دهد. تحقیقات بینگبو و همکارانش نشان داده است که پرتو فرابنفش می تواند منجر به یک جهش

مشهود در باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* LD-1 شده و فعالیت زیستی و قابلیت فروشویی میکروبی آن را افزایش دهد که تاییدی بر نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر می باشد (Yingbo et al., 2011).

در مطالعه حاضر، باکتری ها توانستند تا ۵۰٪ کانسنگ اورانیوم سازگار شوند که نتیجه قابل توجهی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می باشد. تووینن و کلی (Tuovnen and Kelly) اظهار داشتند سمیت اورانیوم باعث ضعیف شدن پیوند و اتصال بین سطوح و سلولها می شود که در نتیجه باعث کاهش CO₂ و اکسیداسیون یون فرو می گردد. به علاوه، بیان کردند که غلظت های اورانیوم بالای ۱۰-۴-۱۰-۳×۵ mol/dm³ برای اسیدیتوباسیلوس فرواکسیدانس سمی است (Rossi, 1990).

بررسی نتایج حاصل از پتانسیل اکسیداسیون و احیا در حضور غلظت های متفاوت پودر سنگ معدن اورانیوم و باکتری جهش یافته و وحشی

اشکال ۲ تا ۶ نشان دهنده نتایج حاصل از پتانسیل اکسیداسیون احیا در باکتری های جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ های مختلف از سنگ معدن اورانیوم می باشد. همانگونه که مشاهده می شود، در تمامی نمونه ها با گذشت زمان میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا به صورت معنی داری افزایش یافته است ($P < 0.05$). این نتایج نشان دهنده روند فعالیت باکتری و فرایند فروشویی میکروبی می باشد. به علاوه، سرعت فعالیت اکسیداسیونی باکتری در چگالی پالپ های پایین تر سریعتر از چگالی پالپ های بالاتر است. از این رو، با افزایش چگالی پالپ، زمان بیشتری برای اکسیداسیون طبق الگوی به دست آمده از نتایج لازم می باشد. در نمونه ۱۸۰ در حضور چگالی پالپ ۵٪، پس از سه روز، پتانسیل اکسیداسیون و احیا از ۳۶۹ میلی ولت به ۵۹۰ میلی ولت افزایش یافته است ($P < 0.05$). در حالی که، پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری وحشی در همین زمان فقط به ۵۶۷ میلی ولت رسیده است. لازم به ذکر می باشد که در تمامی نمونه ها کمترین میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا در نمونه کنترل منفی فاقد باکتری مشاهده شده است.

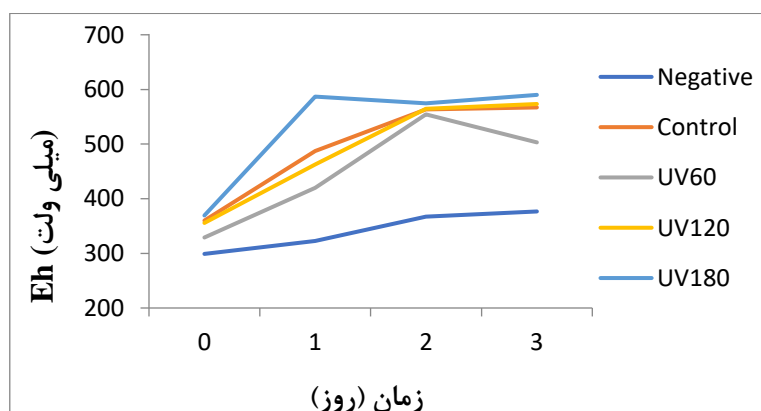
مهمترین عامل استخراج اورانیوم در فروشویی میکروبی، یون فریک تشکیل شده از اکسیداسیون یون فرو توسط باکتری می باشد. بنابراین، افزایش Eh در استخراج اورانیوم که به معنی انجام فرایند اکسیداسیون آهن می باشد دارای نقش تعیین کننده ای می باشد (Akci, 2004). همانطور که در نمودارهای مربوط به تغییرات Eh، قابل مشاهده می باشد در نمونه کنترل منفی به دلیل عدم وجود باکتری در محیط، تغییرات Eh کمتر می باشد و افزایش اندک Eh به دلیل اکسیداسیون یون فرو توسط هوا می باشد (Akci, 2004).

آهن فریک و اسید سولفوریک به منظور استحصال اورانیوم در طی فرایند فروشویی زیستی ضروری هستند (Azizur Rahman, 2016). آهن فریک یک عامل اکسیدکننده مؤثر اورانیوم ۴ ظرفیتی می باشد و اگر در شرایط اسیدی به سنگ معدن های اضافه شود، اورانیوم را به صورت محلول یا ۶ ظرفیتی تبدیل می کند. غلظت آهن فریک در طی اکسیداسیون اورانیوم

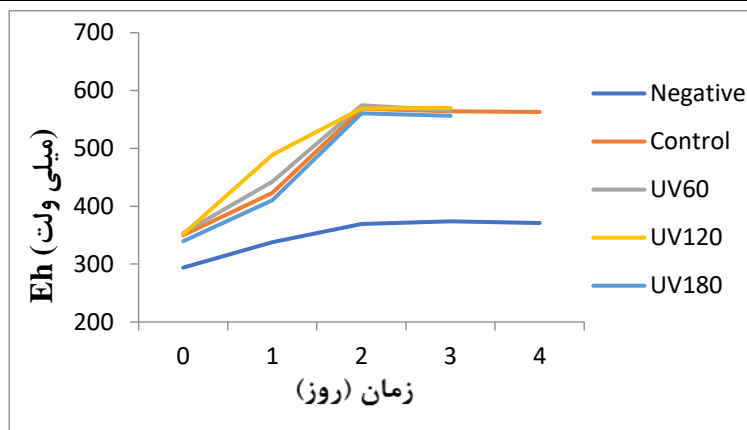
کاهش می‌یابد، اما می‌تواند توسط باکتری‌های اکسیدکننده آهن و اسیددوست، مانند باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* دوباره تولید شود اما به سبب تشکیل رسوب ژاروسیت این بازیابی با سرعت کندی صورت می‌گیرد. لازم به ذکر می‌باشد، که بسیاری از سنگ معدن‌هایی که دارای اورانیوم هستند دارای پیریت نیز می‌باشند (Keith-Roach & Livens, 2002). در فروشویی اورانیوم، باکتری‌ها مستقیماً به سنگ معدن اورانیوم حمله نمی‌کنند، بلکه این میکروارگانیسم‌ها پیریت و آهن فرو را اکسید می‌کنند و باعث تولید آهن فریک (واکنش ۱) می‌شوند. سپس، آهن فریک براحتی به اورانیوم (IV) که به صورت ترکیب با مواد معدنی وجود دارد حمله می‌کند (واکنش ۲) و آنرا به اورانیوم (VI) که محلول در اسید سولفوریک رقیق است تبدیل می‌کند (Sapsford *et al.*, 2012).



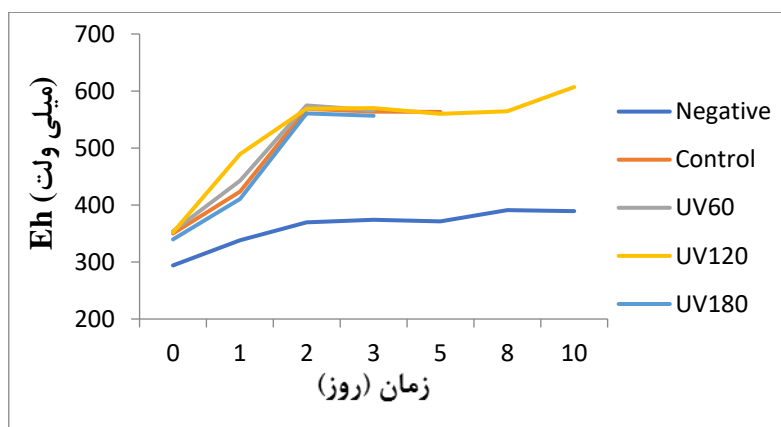
آهن فریک از اکسیداسیون پیریت که اغلب همراه با سنگ معدن اورانیوم است و یا در طی فروشویی زیستی اضافه می‌گردد، تولید می‌شود. *Acidithiobacillus ferrooxidans* با حضور میزان زیادتری از آهن فرو می‌تواند سرعت واکنش‌های اکسیداسیون خود را افزایش دهد (Abhilash *et al.*, 2010) که موجب افزایش میزان Eh در فرایند می‌شود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با انجام مرحله اکسیداسیون آهن فرو به آهن فریک میزان Eh در محیط افزایش پیدا می‌کند. در نتیجه افزایش این پارامتر در نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده افزایش فعالیت اکسیداسیونی باکتری می‌باشد.



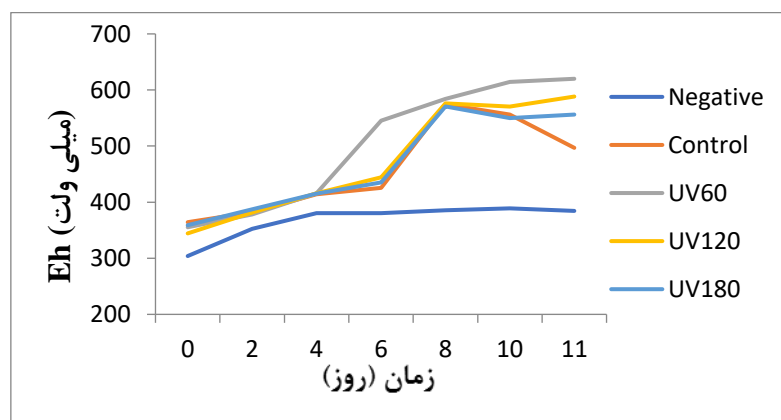
شکل ۲: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵٪



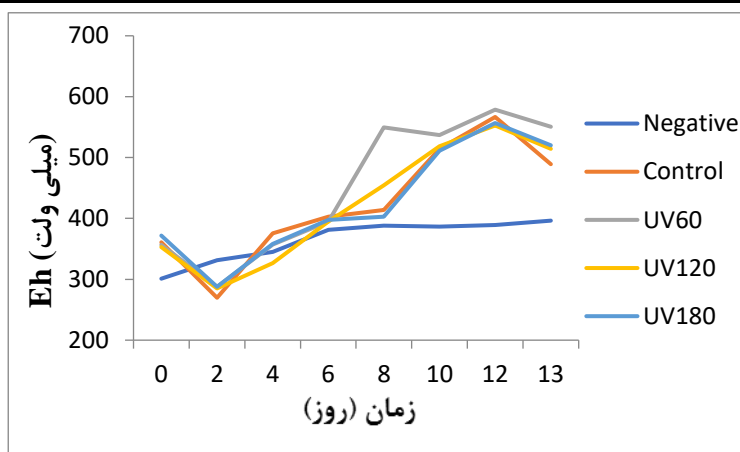
شکل ۳: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۰٪



شکل ۴: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۵٪



شکل ۵: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۲۵٪

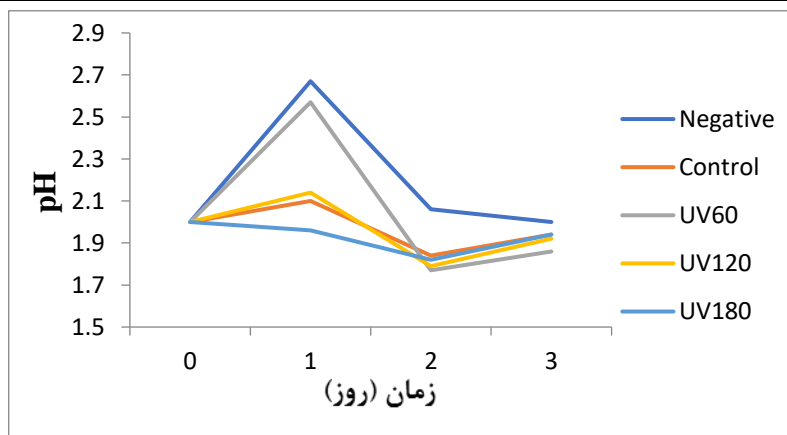


شکل ۶: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵۰٪

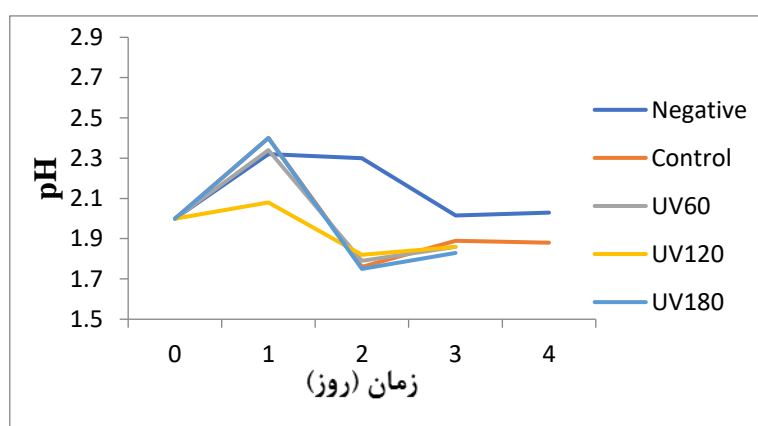
در مطالعه ای مشخص شده است که سرعت اکسیداسیون آهن فرو در باکتری جهش یافته، پس از ۲۴ ساعت کشت می‌تواند به ۱۰۰٪ برسد (۱۸ ساعت کمتر از زمان متعلق به باکتری اصلی، تحت شرایط فروشویی مشابه). پس از ۳۰ روز مشخص شد که استخراج مس توسط باکتری جهش یافته در مقایسه با باکتری اصلی، ۱۷٪ افزایش داشته است. این در صورتی است که میزان استخراج توسط باکتری اصلی در مقایسه با فروشویی شیمیایی، ۷۰٪ می‌باشد. نتایج آزمایشات آنها نشان داد که اثرات باکتری جهش یافته پس از پرتوتابی فرابنفش، بهتر از پرتوتابی باکتری‌های اصلی و بسیار بهتر از فروشویی شیمیایی نیز می‌باشد که تاییدی بر نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد (Yingbo *et al.*, 2011).

بررسی تغییرات pH در باکتری جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ های مختلف

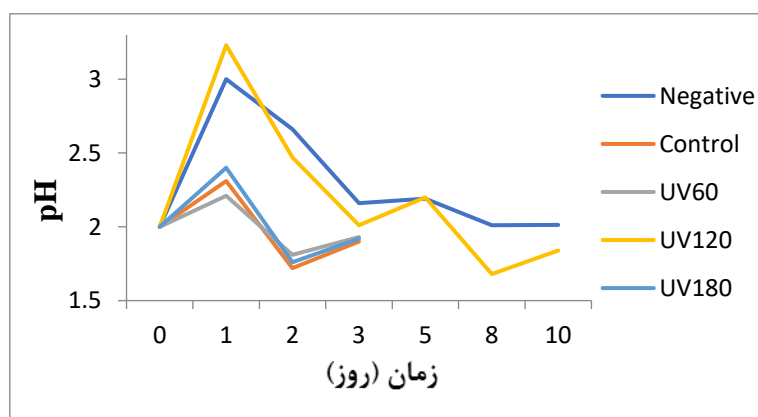
اشکال ۷ تا ۱۱ نشان دهنده تغییرات pH در باکتری های جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ های مختلف از سنگ معدن اورانیوم می‌باشد. در همه نمونه ها به جز نمونه کنترل منفی، میزان pH در روزهای ابتدایی روند افزایشی داشته و بعد از آن روند به صورت کاهشی مشاهده شده است ($P < 0.05$) که عمدتاً به دلیل فعالیت اکسیداسیونی آهن و سولفور توسط باکتری می‌باشد. لازم به توضیح می‌باشد که افزایش اولیه pH به دلیل واکنش های شیمیایی مصرف کننده اسید می‌باشد (Sandstorm & Petersson, 1997). همانطور که در شکل ۱۱ قابل مشاهده می‌باشد، میزان pH در روزهای ابتدایی روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است ($P < 0.05$) که کمترین میزان آن در چگالی پالپ ۵۰٪ در نمونه ۱۸۰ در روز دهم با توجه به فعالیت بیشتر باکتری، در نتیجه تولید اسیدسولفوریک بیشتر مشاهده شده است.



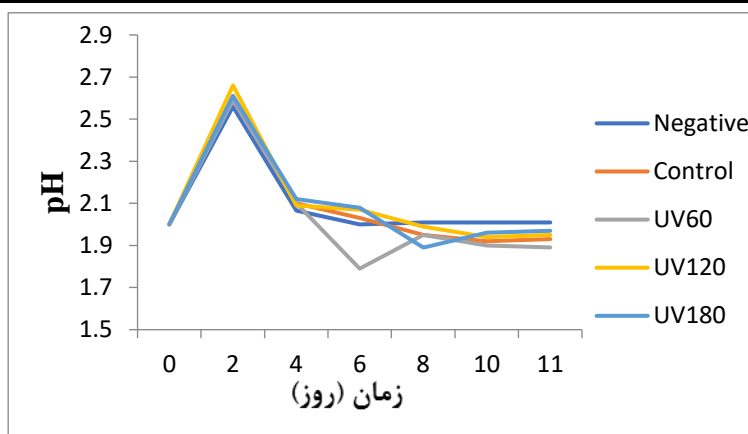
شکل ۷: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵٪



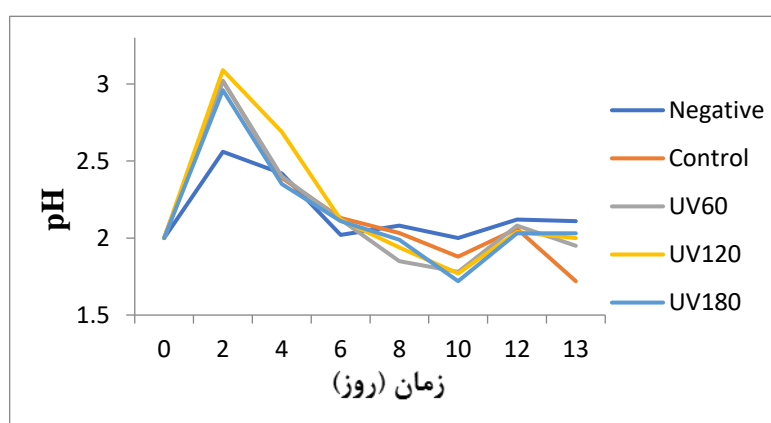
شکل ۸: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۰٪



شکل ۹: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۵٪



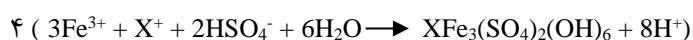
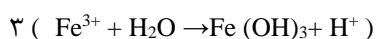
شکل ۱۰: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۲۵٪

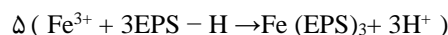


شکل ۱۱: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵۰٪

در طی فرآیند فروشویی زیستی، آهن فریک و اسید سولفوریک به منظور استحصال اورانیوم ضروری هستند. آهن فریک یک عامل اکسیدکننده مؤثر (U(IV) می‌باشد و زمانیکه به سنگ معدن‌های اورانیومی که تحت شرایط اسیدی هستند اضافه شود، اورانیوم را به صورت محلول یا U(VI) تبدیل می‌کند.

با پیشرفت زمان، میزان آهن فریک در محیط افزایش می‌یابد و این آهن در واکنش‌های هیدرولیزی که منجر به تولید H^+ می‌شود شرکت می‌کند که این واکنش‌ها می‌توانند باعث کاهش pH محیط در مراحل بعدی فرآیند شوند (Dong *et al.*, 2010). این واکنش‌ها عبارتند از: هیدرولیز آهن فریک (واکنش ۳)، تشکیل رسوب ژاروسیت (واکنش ۴) که این رسوبات، حاصل از اکسید شدن سولفید آهن در سنگ معدن می‌باشد و واکنش‌های مربوط به مربوط به اگزوپلی ساکارید خارجی (EPS) که حاوی $-OH$ و $-COOH$ می‌باشند که باعث آزاد شدن H^+ در محیط می‌شوند.





در کشت باکتری pH یکی از فاکتورهای مهم می‌باشد و همچنین می‌تواند بر روی رشد باکتری و اکسیداسیون آهن فرو تاثیرگذار باشد (Meruane & Vargas, 2003). همانطور که در بخش نتایج، تغییرات pH نشان داده شده است، در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم، pH محیط در روزهای ابتدایی روند افزایشی داشته و با گذشت زمان، این روند به صورت کاهشی مشاهده می‌شود (نمودارهای ۷ تا ۱۱). در مطالعات پیشین نشان داده شده است که در مراحل اولیه فروشویی میکروبی مهمترین واکنشی که باکتری در آن دخیل می‌باشد، اکسیداسیون آهن فرو می‌باشد که این واکنش، مصرف کننده H^+ می‌باشد و همین امر باعث افزایش pH محیط در مراحل اولیه می‌شود. یا به بیان دیگر، افزایش pH در حضور باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* را می‌توان درگیر با واکنش‌هایی دانست که مصرف کننده اسید هستند. با پیشرفت زمان فروشویی باکتریایی، Fe^{2+} به Fe^{3+} اکسیده می‌شود و همانطور که واکنش‌های ۳، ۴ و ۵ نشان می‌دهد، باعث تشکیل شدن H^+ می‌شود، بنابراین، در مراحل بعدی فروشویی میکروبی باعث کاهش تدریجی pH محیط می‌شود (Meruane & Vargas, 2003; Dong et al., 2010).

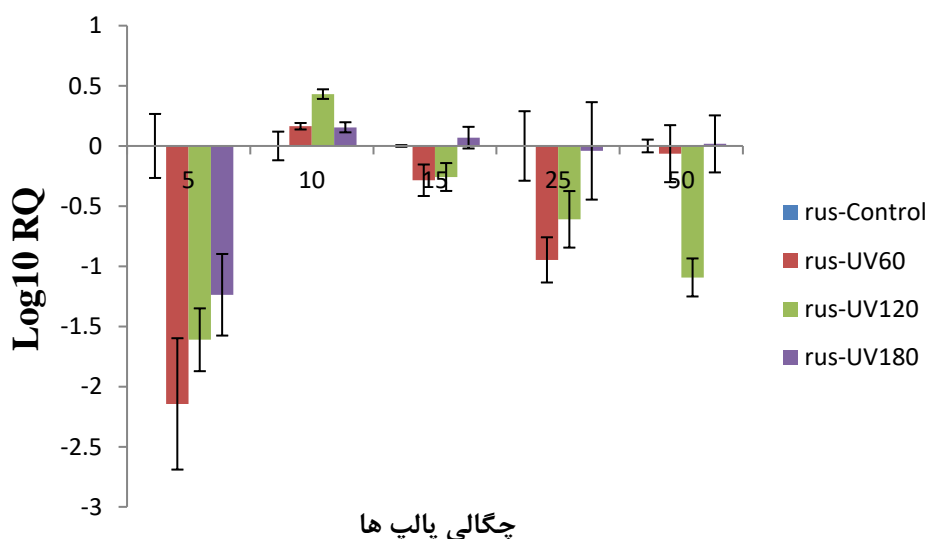
انحلال پذیری آهن فریک و تولید رسوب آهن به خصوص ژاروسیت، تحت تاثیر pH می‌باشد و همچنین انحلال پذیری آهن فریک توسط رسوب ژاروسیت کنترل می‌شود و مانع از بازایی و تولید مجدد یون فریک می‌شود (Grishin et al., 1989). همانطور که اشاره شد، تولید رسوب از امکان اکسیداسیون مجدد آهن فرو ممانعت به عمل می‌آورد پس در نتیجه، این امر از تولید انرژی در داخل سلول جلوگیری می‌نماید و همچنین رسوب حاصل بر روی لایه خارجی غشای سلولی می‌نشیند. لایه خارجی غشای سلولی اشغال شده توسط این رسوب‌ها، مکان‌هایی هستند که آنزیم‌های کلیدی آغازگر فرآیند اکسیداسیون آهن در آنجا وجود دارند و عمل می‌نمایند و وجود این رسوبات باعث کاهش و یا عدم کارایی این آنزیم‌ها می‌گردند (Gomez et al., 1998).

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* وحشی و جهش یافته در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم

بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور غلظت‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم، بر طبق پروتکل ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به شرح زیر می‌باشد. پس از انجام هر واکنش Real-Time PCR، جهت اطمینان از عدم تکثیر غیر اختصاصی، منحنی ذوب توسط دستگاه رسم و ثبت می‌شود. منحنی دارای تک قله در T_m اختصاصی مربوط به هر ژن، نشان دهنده تکثیر کاملاً اختصاصی همان ژن می‌باشد. همچنین، قابل ذکر می‌باشد که در تمامی نمونه‌ها پس از انجام هر واکنش از نظر منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن *rus* از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده شد. نمودار ۱۲ مربوط به تغییرات بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم آنومالی ۲ ساغند یزد می‌باشد. همانگونه

که از نتایج مشخص می باشد، بیان ژن مورد نظر با افزایش میزان چگالی پالپ در باکتری های جهش یافته تغییر پیدا کرده است ($P < 0.05$). در حضور ۰.۵٪ کانسنگ اورانیوم کاهش چشمگیری در بیان ژن *rus* باکتری های جهش یافته قابل مشاهده می باشد. در صورتی که در حضور غلظت ۱۰٪ کانسنگ، بیان این ژن در باکتری های جهش یافته افزایش داشته که این افزایش در غلظت های بالاتر کانسنگ بجز نمونه ۱۸۰ در غلظت ۱۵٪ مشاهده نشده است.

بسیاری از مطالعات نشان داده اند که بیان ژنهای کدکننده حاملین الکترون ها، در بسیاری از موارد، تحت تاثیر محیط رشد میکروارگانیسم می باشند تا باکتری بتواند در مقابل تغییر شرایط محیطی انعطاف پذیر باشد. در میان این حاملین الکترون ها، سیتوکروم های c در طیف وسیعی از موجودات مانند یوکاریوتها، آرکی ها و یوباکترها در انتقال الکترون ایفای نقش می کنند (Meyer, 1996). اسیدیتئوباسیلوس فرواکسیدانس به طور غیر معمولی دارای غلظت بالایی از سیتوکروم های c می باشد به طوری که حدود ۱۰ درصد از کل پروتئین های ساخته شده در سلولهای رشد یافته در محیط حاوی آهن فرو، سیتوکروم های نوع c می باشند (Vernon et al., 1960).



شکل ۱۲: نمودار بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور غلظت های مختلف سنگ معدن اورانیوم.

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان دهنده این مطلب است که در ابتدای فروشویی میکروبی که باکتری با درصد سنگ کمتری مواجه است، سعی در تطبیق خود با محیط دارد و بیان این ژن که برای اکسیداسیون آهن مورد نیاز است افزایش پیدا می کند و با بالا رفتن میزان چگالی پالپ افزایش بیشتری مشاهده می شود. اما با افزایش بیشتر سنگ اورانیوم، بیان ژن دخیل در اکسیداسیون آهن در اثر مواجهه شدن با عوامل تنشی که از حد آستانه تحمل باکتری بیشتر می باشد، دارای روند کاهشی می باشد که این تغییرات کاهشی نیز به طور واضح در نتایج استخراج اورانیوم قابل مشاهده است.

با توجه به تغییر بیان ژن *rus*، این احتمال وجود دارد که باکتری تا حد آستانه خاصی قادر به تحمل شرایط سمی اورانیوم می‌باشد و میزان بالاتر از این آستانه باعث کاهش چشمگیر بیان ژنهای دخیل در اکسیداسیون آهن می‌شود. یارزابال و همکاران، در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که اپرون *rus*، حاوی کلاسترهای ژنی اصلی دخیل در انتقال الکترون از آهن به اکسیژن است (Yarzabal *et al.*, 2004). اپرون *rus* دارای دو سیتوکروم نوع *c* (*cyc1*، *cyc2*)، یک اپرون با عملکرد ناشناخته و یک سیتوکروم اکسیداز *aa3*-type (*coxBACD*) و راستی سیانین است (Appia-Ayme *et al.*, 1999). بر اساس نتایج این مطالعه، پیشنهاد شد که بیان اپرون *rus* به صورت مثبتی تحت تاثیر Fe(II) است. به علاوه، سطح ترجمه این اپرون بعد از اینکه آهن موجود در محیط کاملاً اکسیده شد کاهش می‌یابد (Yarzabal *et al.*, 2004). می‌توان اینگونه استنباط کرد که بیان ژنهای موجود در این اپرون به دلیل نقش کلیدی که در اکسیداسیون آهن دارند، در شرایط تنش تغییر پیدا می‌کنند.

از طرفی دیگر، تکنیک سازگارسازی یکی از روشهایی است که برای افزایش عملکرد باکتریایی استفاده می‌شود (Babiz & Madgwick, 1993). بیشتر یونهای فلزی برای میکروارگانیسم‌ها سمی هستند ولی با روش سازگارسازی می‌توان به زنده ماندن و تحمل این شرایط استرس‌زا کمک کرد. گونه تیوباسیلوس و میکروارگانیسم‌های اسیددوست توانایی رشد در حضور انواع یونهای فلزی دارند. سازگارسازی کمک به کاهش دوره تاخیر (lag period) در رشد و عملکرد می‌کند، در نتیجه باعث افزایش کلی سینتیک لیچینگ می‌شود (Attia *et al.*, 1993). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل کاهش میزان استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، کاهش در بیان ژن *rus* می‌باشد.

نتیجه گیری

از بررسی نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اینگونه استنباط کرد که تغییرات بیان ژن *rus* عامل تاثیر گذاری بر فعالیت باکتری در استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، می‌باشد. البته این نکته حایز اهمیت می‌باشد که به منظور کسب اطلاعات جامع‌تر در رابطه با عملکرد باکتری جهش یافته و بیان ژنهای کد کننده حاملین الکترون، بررسی سایر حاملین الکترون نیز لازم است.

منابع

- Abhilash, S., Mehta, K.D., Kumar V., Pandey B.D., and Pandey V.M. (2009) Dissolution of uranium from silicateapatite ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 95:70-75.
- Abhilash, S., Mehta, K.D., Kumar, V., Pandey, B.D and Tamrakar, P.K. (2010) Bioleaching - An Alternate Uranium Ore Processing Technology for India. *Energy Procedia*, 7:158-162.
- Akcil, A. (2004) Technical note: potential bioleaching developments towards commercial reality. *Minerals Engineering*, 17:477-480.

- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J. and Bonnefoy, V. (1999) Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa3-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus Ferrooxidans* ATCC 33020. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4781-4787.
- Attia, Y.A., Eleky, M., Ismail, M. (1993) *Int J Min Proc* 37:61.
- Azizur Rahman, M; (2016) Development of bioleaching: proteomics and genomics approach in metals extraction process. *AIMS Microbiology* 2(3):332-339.
- Babij, T and Madgwick, J.C.; (1993) High yeild bacterial leaching of copper Concentrates. *proc. Australas. Instr. Min. Metal*, 287:61-64,
- Boon, M. and Heijnen, J.J. (1998) Gas-liquid mass transfer phenomena in biooxidation experiments of sulphide minerals: a review of literature data. *Hydrometallurgy*, 48:187-204.
- Brandl, H. (2008) *Microbial Leaching of Metals*. Wiley-VCH 8.
- Chen, G., Sun, Z. and Liu, Y. (2016) Continued Multicolumns Bioleaching for Low Grade Uranium Ore at a Certain Uranium Deposit. *Journal of Nanomaterials*, 2016:7.
- Chen, P., Yan, L., Wang, Q., Li, Y. and Li, H. (2012) Surface alteration of realgar (As₄S₄) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International microbiology*, 15:9-15.
- Chen, S. and Lin, J. (2001) Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of PH. *Chemosphere*, 44:1093-1102.
- Chong, N., Karamanev, D.G. and Margaritis, A. (2002) Effect of particle-particle shearing on the bioleaching of sulfide minerals. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3):349-357.
- Dong, X., Li, C. and Liu, J. (2010) A novel approach for soil contamination assessment from heavy metal pollution: A linkage between discharge and adsorption. *J. Hazard. Mater*, 175:1022-1030.
- Dong, X., Li, C. and Liu, J. (2010) A novel approach for soil contamination assessment from heavy metal pollution: A linkage between discharge and adsorption *J. Hazard. Mater*, 175:1022-1030.
- Gomez, C., Blazquez, M.L. and Ballester, A. (1998) Bioleaching of a Spanish complex sulfide ore bulk concentrate. *Minerals Engineering*, 12:93-106.
- Grishin, S.I., Bigam, J.M. and Tuovinen, O.H. (1989) Characterization of jarosite formed upon bacterial. Oxidation of ferrous sulfate in a packed-bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 3101.
- Jahani, S., Fatemi, F., Firoz-e-zare, M.A. and Zolfaghari, M.R. (2015) Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain FJS from Ramsar, Iran. *Electronic Journal of Biology*, 11(4):138-146.
- Keith-Roach, M.J. and Livens, F.R. (2002) *Interactions of microorganisms with radionuclides*. 1st edition. Elsevier.
- Kinnunen, P.H. and Puhakka, J.A. (2005) High-rate iron oxidation at below pH 1 and at elevated iron and copper concentrations by a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm. *Process Biochemistry*, 40(11):3536-3541.
- Meruane, G. and Vargas, T. (2003) Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5-7.0. *Hydrometallurgy*, 71(1-2):149-158.
- Meyer, T.E. (1996) "Evolution and classification of c-type cytochromes In: *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach* (Scott, R.A. and Mauk, A.G., Eds.). University Science Books, Sausalito, CA 33-99.

- Moon-Sung, C., Kyung-Suk, C., Dong-Su, K and Hee-Wook, R; (2005) Bioleaching of uranium from low grade black schists by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:377-380.
- Rawlings, D.E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 10:1475-2859.
- Rossi, G. (1990) *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill, Hamburg.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R and Schippers, A. (1995) Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism—critical evaluation of bacterial leaching. *App Microbiol Biotechnol*, 43:961–966.
- Sandstorm, A. and Petersson, S. (1997) Bioleaching of a complex sulphide ore with moderate thermophilic and extreme thermophilic microorganism. *Hydrometallurgy*, 46(1–2):181-190.
- Sapsford, D.J., Bowell, R.J., Geroni, J.N., Penman, K.M. and Dey, M. (2012) Factors influencing the release rate of uranium, thorium, yttrium and rare earth elements from a low grade ore. *Minerals Engineering* 39:165–172.
- Shahroz, K., Faizul, H., Fariha, H., Kausar, S. and Rahat, U. (2012) Growth and biochemical activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* collected from Black Shale. *Journal of Microbiology Research*, 2(4):78-83.
- Smith, J.E; (2009) *Biotechnology*. Cambridge University Press. 5th edition.
- Vera, M., Rohwerder, T., Bellenberg, S., Sand, W., Denis, Y. and Bonnefoy, V. (2009) Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. *Advanced Materials Research* 71: 175-178
- Vernon, L.P., Mangum, J.H., Beck, J.V. and Shafia, F.M. (1960) Studies on a ferrous-ion-oxidizing bacterium. II. Cytochrome composition. *Arch. Biochem. Biophysics*, 88:227-231.
- Yarzabal, A. and Appia-Ayme, C. (2004) Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology*, 150:2113-23.
- Yingbo, D., Hai, L., Han, W., Xiaolan, M., Kaibin, F. and Hongwei, W. (2011) Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. *Minerals engineering*, 24:870–875.
- Yuan, X., Xie, X., Fan, F., Zhu, W., Liu, N. and Liu, J. (2013) Effects of mutation on a new strain *Leptospirillum ferriphilum* YXW and bioleaching of gold ore. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23:2751-2758.
- Zhang, Y., Qin, W., Wang, J., Zhen, S., Yang, C., Zhang, J., Nai, S. and Qiu, G. (2008) Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18:1491-1496.

Evaluation of *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* gene expression treated with UV radiation in uranium bioleaching process

M. Sheydaie¹, R. Haji Hosseini^{2*}

Received:2017.04.02

Accepted:2018.11.11

Abstract

Acidithiobacillus ferrooxidans is the main bacteria involved in the uranium bioleaching in which the ferric ion acts as an electron acceptor and converts insoluble U^{+4} to soluble U^{+6} . The oxidation process involved the electron transport chain which would occur through several periplasmic carriers. In this research, the bacterium involved in uranium bioleaching process was mutated using UV radiation at doses of 60, 120 and 180 seconds. Mutant and wild bacteria were placed in the presence of various concentrations of uranium ore (5, 10, 15, 25 and 50 %) and their bioleaching yields were examined. Then, uranium extraction, variation of pH and Eh were measured in the 24 hour intervals. Finally, *rus* gene expressions of mutant and wild *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of various uranium ore were analyzed using Real time PCR method. The results showed that, the changes of Eh, pH and uranium extractions at bioleaching process by mutant and wild bacteria have been delayed in the presence of high pulp density in compare with lower one. The results of *rus* gene expressions in mutant and wild bacteria in the presence of ore different concentrations showed that mutations and ore concentration has been effective on the expression of this gene. It should be noted that, in the present project, the native bacteria were adapted to 50% uranium ore that is very significant at uranium bioleaching process.

Keywords: Uranium bioleaching, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *rus* gene, Real time PCR

حفاظت انجمادی بذر گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.) به روش شیشه‌ای شدن

1- PhD. Student of Biochemistry, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- Biology Departments, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

* (Corresponding Author: hosseini@pnu.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

چکیده

در این تحقیق، حفاظت انجمادی به روش شیشه‌ای شدن بذر کنجد با دو نوع محلول حفاظت‌کننده PVS2 و PVS3 در هفت سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) صورت پذیرفت. این آزمون به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با دو فاکتور محلول حفاظت‌کننده (دو سطح) و سطوح زمانی (هفت سطح) و سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای زمان تیمار و نوع محلول جهت سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی‌دار مشاهده گردید. اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) و برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) معنی‌دار بود. بطور کلی نتایج تجزیه واریانس، نوع محلول حفاظت‌کننده و سطوح زمانی تیمار در فرآیند شیشه‌ای شدن و حفاظت انجمادی گیاه کنجد در شاخص‌های مورد ارزیابی را مؤثر نشان داد.

واژه‌های کلیدی: روغن، مواد ضدانجماد، شیشه‌ای شدن.

مقدمه

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یکی از گیاهان دیرینه زراعی و با ارزش و مهم‌ترین گیاه روغنی دنیا بوده که در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران کشت و کار می‌شود (Sepaskhah & Andam, 2001؛ رضوانی مقدم و سیدی، ۱۳۹۵). دانه کنجد بیشترین میزان روغن را در بین گیاهان دانه روغنی دارا است. این روغن کمتر از ۱۵ درصد اسید چرب اشباع دارد که بیشترین مقدار آن پالمیتیک و استئاریک و بیش از ۸۵ درصد مجموع اسیدهای چرب آن غیراشباع است که شامل ۴۵ درصد اسیداولئیک و ۴۰ درصد اسیدلینولئیک می‌باشد (حسینی‌خواه و همکاران، ۱۳۹۳). استفاده از کنجد با واسطه چند سازوکار متفاوت به صورت قابل توجهی سبب افزایش سطح ویتامین E در بافت‌ها می‌شود (Parker et al., 2000). عوامل بسیاری در فرسودگی بذر مشارکت دارند

۱- استادیار دانشگاه پیام‌نور، بخش مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نیات و ژنتیک)

* (رایانامه نویسنده مسئول: M_Kakaei@pnu.ac.ir, MehdiKakaei37@gmail.com)

۲- مرکز تحقیقات طب سنتی ایرانی در رزم و بحران

که شامل ژنتیک، خسارت‌های مکانیکی، شرایط دما و رطوبت محیط، ذخیره بذر، رطوبت محتوی بذر، وجود موجودات ذره‌بینی و رسیدگی بذر است که در این میان رطوبت و گرما از مهمترین این عوامل هستند (Miller & Mc Donald, 1994).

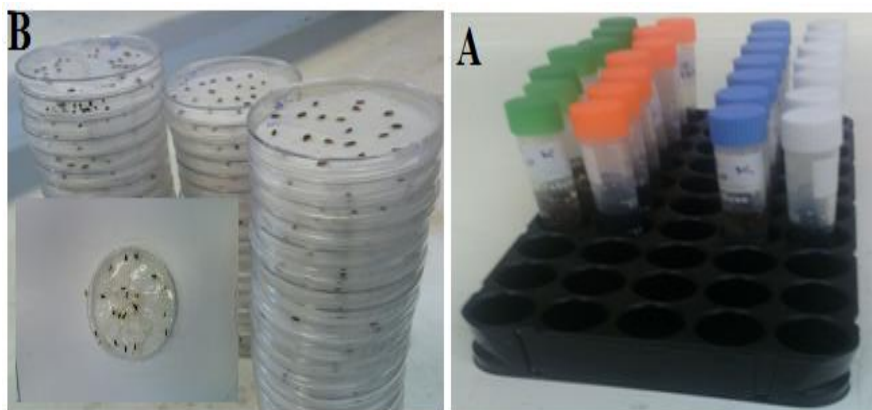
حفاظت و نگهداری بذر یکی از عوامل مهم جلوگیری از این عوامل است که در این میان تکنیک حفاظت انجمادی یک روش توانا جهت حفظ و نگهداری بذرهای این گیاه می‌باشد. شیشه‌ای شدن یک روش ساده و سریع برای حفاظت انجمادی است که از تشکیل کریستال‌های یخ در حین انجماد جلوگیری می‌کند (منصوری و همکاران الف، ۱۳۹۲). در برخی از این مطالعات، پیش تیمارهایی برای محافظت از بافت‌ها در برابر انجماد معرفی شده است که در برخی موارد می‌توانند طولانی و پیچیده باشند. سوکروز که تحمل به آبیگری را افزایش داده و باعث حفظ توانایی زیستی بافت‌ها می‌شود، اغلب به عنوان پیش تیمار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dumet *et al.*, 1993). شایان ذکر است تاکنون بالغ بر ۱۵۰ گونه مختلف گیاهی در بانک کرایو مرکز ملی ذخیره ژنتیکی و زیستی ایران حفظ و نگهداری می‌شوند (<http://ibrc.ir>). امروزه اهمیت تنوع زیستی در توسعه پایدار بر کسی پوشیده نیست. مرکز بین‌المللی منابع ژنتیک گیاهی ژرم‌پلاسماهای گیاهی را به عنوان ماده ژنتیکی گیاهان که ویژگی و توانایی سازگاری و بقای آن‌ها را تعیین کرده و قابل حفظ و استفاده شدن هستند، معرفی کرده است (FAO, FLD & IPGRI, 2004). مواد ژنتیکی گیاهی شامل توده‌های بومی، واریته‌های سنتی، قدیمی، فرم وحشی و علف‌هرز، گونه‌های وحشی وابسته، پایه‌های ژنتیکی، لاین‌های اینبرد و ارقام امروزی می‌باشند. این مواد شامل ژن‌های خاص و آلل‌های آن‌ها، پیوستگی و لینکاژ ژن‌ها، مجموعه‌ای از اپیستازی ترکیبات ژنی و ترکیب ژنوم‌های مختلف و غیره می‌باشند. امروزه از ژن‌های موجود در ژرم‌پلاسماهای طبیعی برای انتقال ژن استفاده می‌شود در نتیجه حفظ ژرم‌پلاسماهای گیاهی اهمیت خیلی بیشتری می‌یابد (Tay, 2005 & Tray, 2006). نگهداری ژرم‌پلاسما گیاهی، ذخیره سالم تنوع ژنتیکی گیاه و گونه‌های وابسته به آن بصورت بذر یا گیاه زنده برای استفاده در آینده می‌باشد. روش‌های مختلفی از جمله برای همین منظور وجود دارند که روش حفاظت انجمادی با استفاده از ازلت مایع روش امیدوارکننده‌تر و مقرون به صرفه‌تری برای حفظ ژرم‌پلاسماها در دوره‌های بلندمدت در این زمینه می‌باشد (باقری و ساکی، ۱۳۹۵). مسئله حفاظت از گیاهان و پوشش‌های گیاهی در بسیاری از کشورهای جهان به طور جدی دنبال می‌شود و فعالیت‌های وسیعی برای جلوگیری از انهدام آن‌ها صورت گرفته است. در کنار تمهیداتی که تاکنون در این زمینه انجام شده است روش حفاظت انجمادی می‌تواند به عنوان روش تکمیلی و مطمئنی در کنار حفاظت آن‌ها در بانک ژن و بانک بذر و یا حفاظت آن‌ها در باغ گیاه‌شناسی و حتی حفاظت آن‌ها در مناطق قرق‌شده طبیعی بکار رود. روش حفاظت انجمادی به منظور حفاظت گونه‌های جانوری در حال انقراض برای سال‌های طولانی روش متداولی بوده ولی تاکنون این روش برای سلول‌های گیاهی بصورت محدودی صورت گرفته است. منصوری و همکاران، (۱۳۹۲) در تحقیقی با عنوان مطالعه حفاظت انجمادی بذرهای گیاه کلزا به روش شیشه‌ای شدن ابراز داشتند که برای صفت طول ریشه چه دو فاکتور زمان تیمار و ژنوتیپ و اثر متقابل این دو فاکتور دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بودند. در مطالعه‌ی خولینا و وارونکوا (Kholina and Voronkova, ۲۰۱۲) از تکنیک حفاظت انجمادی در دانه برخی

از لگوم‌های دارویی استفاده کردند و ابراز نمودند که حفاظت انجمادی فاقد اثر منفی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه می‌باشد. در پژوهش دیگری مارتینکوا و هونیک (Martinkova and Honek, ۲۰۰۷) با عنوان اثر حفاظت انجمادی روی جوانه‌زنی بذر قاصدک بیان کردند که حفاظت انجمادی روشی مناسب جهت حفظ و نگهداری دانه می‌باشد چرا که در اثر استفاده این تکنیک هیچ تغییری در درصد جوانه‌زنی ایجاد نشده و تنها یک تغییر کوچک و سیستماتیک در سرعت جوانه‌زنی رخ داده است. تکنیک حفاظت انجمادی یک روش سودمند و کم هزینه برای نگهداری بذرهای گیاه دارویی کنجد به روش شیشه‌ای شدن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذر دانه روغنی گیاه کنجد جهت یافتن روش مناسب برای حفاظت انجمادی ژرمپلاسم این گیاه در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور اسدآباد صورت پذیرفت. شکل ۱ تیمار نمونه‌های بذر کنجد با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی (A) و نمونه‌های بذر کنجد کشت شده در درون پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی (B) را نشان می‌دهد. بذور کنجد با کمک هیپوکلریت سدیم ۳ درصد برای مدت ۲۰ دقیقه و الکل (متانول) ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه استریل شدند و تعداد ۲۰ بذر پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، به ویال‌های انجمادی ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و مورد تیمار با محلول‌های حفاظت‌کننده قرار گرفتند. محلول‌های استفاده شده دو محلول پر کاربرد در حفاظت انجمادی بافت گیاهی به اسامی محلول شیشه‌ای کردن گیاهی ۲ (PVS2) (Plant Vitrification Solution 2) و محلول شیشه‌ای کردن گیاهی ۳ (PVS3) (Plant Vitrification Solution 3) (Volk et al., 2006). این محلول‌ها با کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل گردیدند و در زیر هود لامینار با کمک محلول‌های مذکور، تیمار بذرهای صورت پذیرفت. محلول PVS2 شامل ۳۰٪ گلیسرول، ۱۵٪ اتیلن‌گلاکول، ۱۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید با زمینه محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) و محلول PVS3 شامل ۴۰٪ گلیسرول و ۴۰٪ ساکارز (WV) بود. جهت تیمار کردن بذرهای در دمای آزمایشگاه در هفت سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) آبیگری صورت گرفت. پس از اتمام زمان‌های یاد شده، محلول‌های قبلی از ویال‌های مربوط خارج گردید و محلول تازه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر در ویال قرار گرفت. سپس به مدت ۵۰ ساعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان مربوطه ویال‌ها در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۱۵ دقیقه ویال‌ها در دمای محیط به مدت ۰/۵ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعدی محلول‌های حفاظت‌کننده از ویال‌ها خارج گردیده و جهت تمیز کردن محلول‌های حفاظت‌کننده از نمونه‌های بذری، نمونه‌ها با یک محلول غلیظ (ساکارز ۰/۵ مولار) شستشو شدند. بعد از این مرحله بذرهای با آب مقطر استریل چند بار شستشو شدند و در نهایت در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری روی کاغذ صافی کشت و با آب مقطر تغذیه شدند (شکل ۱). جوانه‌زنی بذرهای بعد از

۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه یادداشت برداری گردید و طول ریشه چه مورد اندازه گیری قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (در هر پتری دیش ۲۰ عدد بذر قرار گرفت). عملیات آماری برای سه صفت طول ریشه چه، طول ساقه چه و درصد جوانه زنی با کمک نرم افزار SPSS صورت پذیرفت.



شکل ۱: تیمار نمونه های بذر کنجد با محلول های مختلف حفاظت کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی (A)، نمونه های بذر کنجد کشت شده در درون پتری دیش های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی (B).

نتیجه و بحث

حفاظت از تنوع زیستی گیاهی برای طبقه بندی گیاهان و مهندسی ژنتیک در برنامه های به نژادی ضروری به نظر می رسد (Panis & Lambardi, 2005) که این مطالعه پیرامون این ضرورت صورت پذیرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) برای زمان تیمار جهت سه صفت درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی دار بود و نوع محلول برای صفت درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و صفت طول ساقه چه در سطح احتمال یک درصد نیز ($P < 0.01$) معنی دار مشاهده گردید و اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفت طول ریشه چه و طول ساقه چه در سطح احتمال یک درصد ($P < 0.01$) معنی دار و برای صفت درصد جوانه زنی در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.01$) معنی دار بود این نتیجه مؤید این مطلب است که اثر متقابل مدت زمان تیمار در نوع محلول، در کلیه صفات مؤثر بوده است. در بخشی از مطالعه اثر حفاظت انجمادی روی جوانه زنی بذور *Vanda tricolor*، جایسوپاکول و همکاران (Jitsopakul et al., 2012)، بیان کردند که تفاوت معنی داری بین رشدونمو بذرها تحت حفاظت انجمادی و فاقد تیمار حفاظت انجمادی وجود ندارد. جدول ۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان تیمار روی درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه بذر کنجد را نشان می دهد. بر این اساس صفت طول ساقه چه در زمان های ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه بیشترین رشد را داشته است که در یک گروه آماری نیز قرار دارند. که این مطلب نشان دهنده این است که هر چقدر مدت زمان تیمار با مواد انجمادی افزایش یابد (البته تا حدی)، صفت طول ساقه چه و طول ریشه چه افزایش می یابد. بر این اساس صفت طول ریشه چه متناسب با صفت طول ساقه چه، دارای بیشترین میزان هستند

که در یک گروه بر اساس روش مقایسه میانگین دانکن قرار گرفتند. در خصوص صفت درصد جوانه‌زنی نیز نظیر دو صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در زمان ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه بیشترین مقدار به این زمان مربوط می‌شود.

پس نتیجه می‌شود که در خصوص صفت جوانه‌زنی نیز افزایش مدت زمان تیمار با مواد حفاظت انجمادی افزایش درصد جوانه‌زنی را بدنبال دارد. جدول ۳، مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی را نشان می‌دهد. بر اساس این جدول، کلیه صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی در شرایط شاهد از وضعیت مطلوب‌تری برخوردار است که این نشان‌دهنده اثرات محدود تخریبی مواد ضد انجماد نسبت به شرایط شاهد می‌باشد. جدول ۴ و ۵ به ترتیب مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر کنجد را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۴، در خصوص ماده PVS2 در زمان ۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۷/۹۵) و زمان ۸۰ دقیقه (۴/۷۹) دارای کمترین مقدار بود و در خصوص ماده PVS3 زمان ۶۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۷/۵۶) و زمان ۴۰ دقیقه دارای کمترین مقدار (۵/۹۲) بود. در خصوص شاهد بیشترین میزان مربوط به زمان ۲۰ دقیقه بود و کمترین آن مربوط به زمان ۸۰ دقیقه تظاهر نشان داد. بر اساس جدول ۵، در خصوص ماده PVS2 در زمان ۱۰۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۳/۵۷) و زمان ۸۰ دقیقه (۲/۴۱) دارای کمترین مقدار بود و در خصوص ماده PVS3 زمان ۱۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۳/۸) و زمان ۸۰ دقیقه دارای کمترین مقدار (۲/۹۵) بود. در خصوص شاهد نیز بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب زمان‌های ۱۴۰ و ۸۰ دقیقه بود. بر اساس جدول ۶ که مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت درصد جوانه‌زنی بذر کنجد را نشان می‌دهد بیشترین مقدار PVS2 مربوط به زمان ۱۲۰ دقیقه و کمترین آن مربوط به زمان ۲۰ دقیقه بود یعنی هر چقدر زمان تیمار با محلول PVS2 بیشتر شود (۱۲۰ دقیقه) درصد جوانه‌زنی بهبود می‌یابد و در خصوص محلول PVS3 نیز بیشترین مقدار مربوط به زمان ۱۲۰ دقیقه می‌باشد. در مورد شرایط کنترل بایستی ابراز نمود که زمان ۱۲۰ دقیقه مناسب‌ترین حالت بود.

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تیمار و نوع محلول محافظت‌کننده روی درصد جوانه‌زنی،

طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر گیاه کنجد

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	درصد جوانه‌زنی		
۹/۲۶**	۵۹/۹۵**	۲۰/۵۴**	۶	زمان تیمار
۱۲/۳۲**	۹۷/۷۲**	۲۵/۲۰**	۲	نوع محلول
۱/۷۶**	۳۴/۷۸**	۳/۶۳*	۶	زمان تیمار × نوع محلول
۰/۵۵	۲/۵۵	۱/۳۸	۸۲۶	اشتباه
۲۲/۱۸	۲۳/۴۵	۶/۷۹		ضریب تغییرات (%)

*, **, و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیرمعنی‌دار

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان تیمار روی درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و طول ساقه چه بذر کنجد

زمان اعمال تیمار (دقیقه)	درصد جوانه زنی	طول ریشه چه (سانتی متر)	طول ساقه چه (سانتی متر)
۲۰	۰/۷۴ ± ۰/۰۴ d	۷/۵۵ ± ۰/۳۳ a	۳/۴۹ ± ۰/۱۳ ab
۴۰	۰/۸۶ ± ۰/۰۳ c	۶/۴۱ ± ۰/۲۹ d	۳/۳۲ ± ۰/۱۲ bc
۶۰	۰/۸۷ ± ۰/۰۳ bc	۶/۶۹ ± ۰/۲۹ cd	۳/۳۰ ± ۰/۱۳ c
۸۰	۰/۸۹ ± ۰/۰۲ bc	۵/۶۴ ± ۰/۲۲ e	۲/۸۳ ± ۰/۰۹ d
۱۰۰	۰/۹۳ ± ۰/۰۲ ab	۶/۹۱ ± ۰/۲۳ bc	۳/۵۲ ± ۰/۰۸ a
۱۲۰	۰/۹۵ ± ۰/۰۲ a	۷/۱۸ ± ۰/۲۵ ab	۳/۵۴ ± ۰/۰۹ a
۱۴۰	۰/۷۸ ± ۰/۰۳ d	۷/۳۳ ± ۰/۳۱ a	۳/۵۳ ± ۰/۱۳ a

جدول ۳: مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت کننده روی صفت طول ریشه چه،

طول ساقه چه و درصد جوانه زنی گیاه کنجد

صفت	نوع محلول		
	شاهد	PVS3	PVS2
طول ریشه چه (سانتیمتر)	۷/۴۳ a	۶/۶۳ ± ۰/۱۶ b	۶/۴۲ ± ۰/۱۶ b
طول ساقه چه (سانتیمتر)	۳/۴۹ ± ۰/۰۲ a	۳/۴۶ ± ۰/۰۶ a	۳/۱۵ ± ۰/۰۵ b
درصد جوانه زنی	۰/۹۱ ± ۰/۰۵ a	۰/۸۶ ± ۰/۰۱ b	۰/۸۱ ± ۰/۰۱ c

جدول ۴: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت کننده

روی صفت طول ریشه چه در بذر کنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)						
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰
ماده PVS2	۷/۹۵a	۷/۱۵b	۴/۸۷d	۴/۷۹d	۶/۴۵c	۶/۴۸c	۷/۲۳ab
ماده PVS3	۶/۳۱a	۵/۹۲e	۷/۵۶a	۶/۱۰d	۶/۵۲d	۷/۲۳ab	۶/۷۷b
شاهد	۸/۴۱a	۶/۱۵bc	۸/۱۰a	۶/۰۱c	۷/۷۶c	۷/۸۲b	۷/۹۸ab

جدول ۵: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت کننده

روی صفت طول ساقه چه در بذر کنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)						
	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰
ماده PVS2	۳/۴۷ab	۳/۱bc	۲/۹۴c	۲/۴۱d	۳/۵۷a	۳/۱۴bc	۳/۳۸b
ماده PVS3	۳/۵۵b	۳/۵۸b	۳/۴۲c	۲/۹۵d	۳/۴۲bc	۳/۸a	۳/۵۱b
شاهد	۳/۴۴bc	۳/۲۸c	۳/۶۷a	۳/۱۲d	۳/۵۸b	۳/۶۸a	۳/۶۹a

جدول ۶: مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت کننده

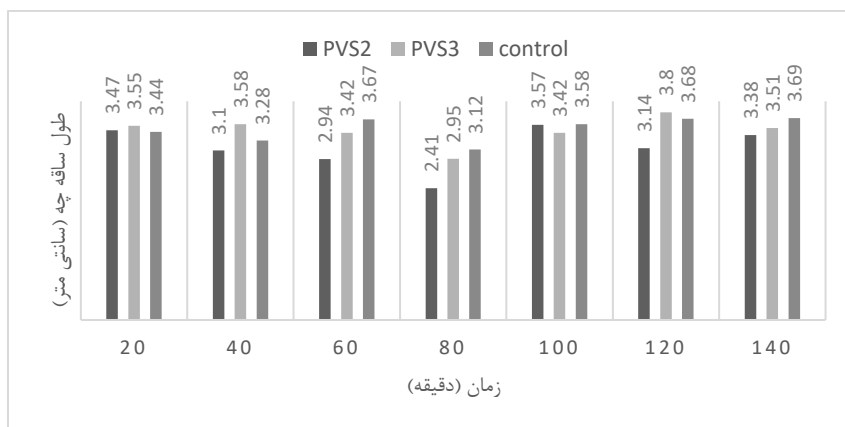
روی صفت درصد جوانه زنی بذر کنجد

نوع محلول	زمان اعمال تیمار (دقیقه)
-----------	--------------------------

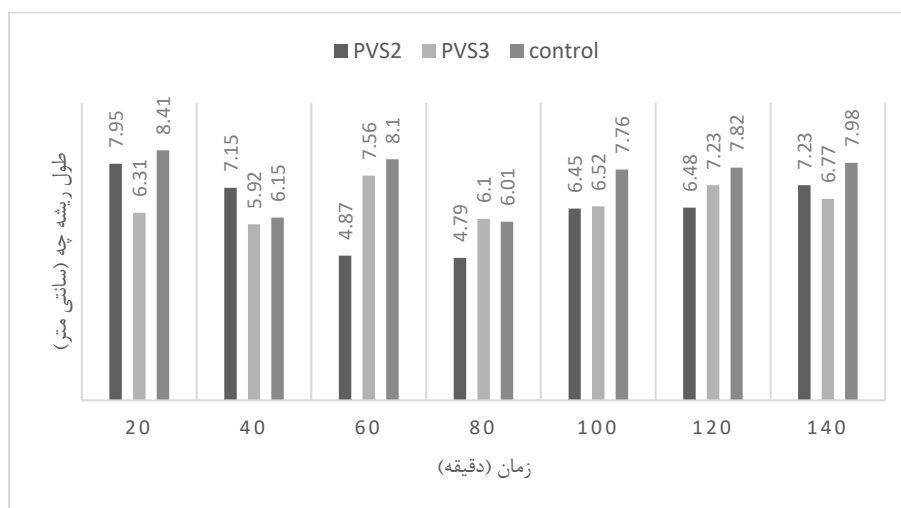
	۱۴۰	۱۲۰	۱۰۰	۸۰	۶۰	۴۰	۲۰	
ماده PVS2	۰/۷۳ab	۰/۹۶c	۰/۹۵c	۰/۸۶d	۰/۷۶d	۰/۷۵b	۰/۶۳d	
ماده PVS3	۰/۷۶b	۰/۹۳ab	۰/۹۰d	۰/۹۰d	۰/۹۳a	۰/۹۰e	۰/۷۳c	
شاهد	۰/۸۶ab	۰/۹۶b	۰/۹۵c	۰/۹۱c	۰/۹۳a	۰/۹۳bc	۰/۸۶a	

به ترتیب شکل ۲ و ۳ نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت طول ساقه‌چه و ریشه‌چه را نشان می‌دهد. همانطوری از شکل ۲ مشخص است تأثیر محلول PVS2 در زمان ۱۰۰ دقیقه بر صفت طول ساقه‌چه زیاد بوده است و در زمان ۸۰ دقیقه کمترین اثر را روی طول ساقه‌چه داشته است. کمترین اثر را محلول PVS3 در زمان ۸۰ دقیقه روی صفت طول ساقه‌چه داشته است و این محلول در زمان ۱۲۰ دقیقه بیشترین اثر را روی صفت طول ساقه‌چه ایجاد کرده است. بر اساس شکل ۳ تیمار شاهد نسبت به سایر مواد پیش تیمار نظیر PVS2 و PVS3 از طول ریشه‌چه بیشتری برخوردار بوده است. لذا نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که احتمالاً و شاید قطعاً مواد پیش تیمار نمی‌توانند بطور کامل و صددرصد از بذرها محافظت نمایند. بر اساس نمودار مذکور بیشترین و کمترین مقدار عددی به ترتیب مربوط به زمان‌های ۲۰ و ۴۰ دقیقه در تیمار شاهد بود. محلول PVS2 در زمان‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۴۰ دقیقه از وضعیت رشد ریشه‌چه مطلوب‌تری نسبت به محلول PVS3 برخوردار بوده و در زمان‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۲۰ دقیقه دارای وضعیت مطلوب‌تری نسبت به محلول PVS2 از نظر رشد ریشه‌چه بود و در زمان ۱۰۰ دقیقه تقریباً هر دو محلول اثر یکسانی روی رشد ریشه‌چه داشتند. شکل ۴ نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی را نشان می‌دهد. کمترین و بیشترین مقدار PVS2 به ترتیب مربوط به زمان‌های ۲۰ و (توأم ۱۰۰ و ۱۲۰) دقیقه بود. در مورد PVS3 کمترین میزان مربوط به زمان ۱۴۰ دقیقه و بیشترین آن مربوط به زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بود. در خصوص شاهد بیشترین و کمترین میزان به ترتیب در زمان‌های ۴۰ و ۱۴۰ دقیقه مشاهده شد. در زمان ۱۲۰ دقیقه بر اساس تصویر شماره ۴، توان جوانه‌زنی هر دو محلول بالا می‌باشد با این تفاوت که محلول PVS2 اندکی در این زمان توان جوانه‌زنی بالاتری نسبت به PVS3 دارد. در زمان‌های پایین‌تر مثلاً ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ دقیقه PVS3 در توان جوانه‌زنی، موفق‌تر بوده در حالی که در زمان‌های بالاتر محلول PVS2 توان جوانه‌زنی بالاتری داشته است که این نتیجه با نتایج منصوری و همکاران ۱۳۹۲ کاملاً منطبق می‌باشد و آنها این علت تفاوت را وجود ماده دی‌متیل سولفوکساید دانستند. چرا که این ماده قابلیت نفوذ در سلول‌ها را دارد و با افزایش زمان توانسته است بیشترین نفوذ را داشته باشد. محققین بسیاری از حفاظت انجمادی در حوزه گیاهی در تحقیقات خود استفاده نموده‌اند جایتسوپاکول و همکاران (Jitsopakul *et al.*, 2012) در گونه *Vanda tricolor*: سوربسیسکای و همکاران (Surebciski *et al.*, 2012) بر روی گونه *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae): سوربسیسکای و همکاران (Surebciski *et al.*, 2012) در گیاه *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae): تیکان و همکاران (Tecan *et al.*, 2017) در بذر و

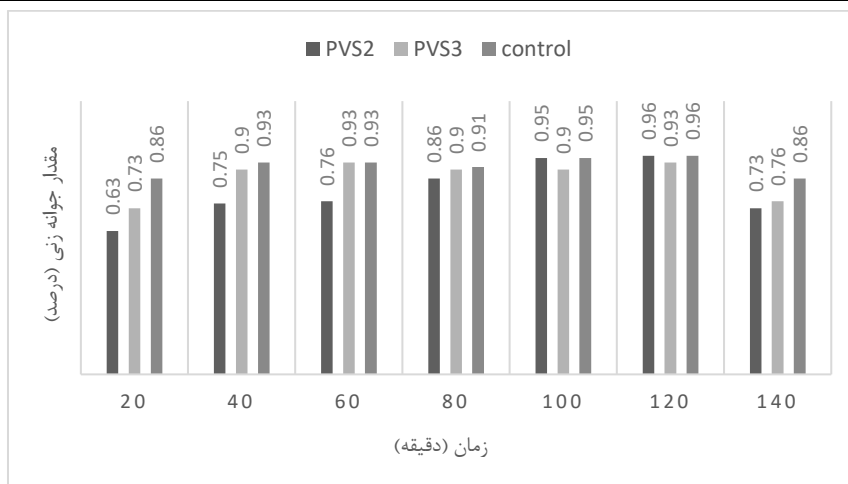
محور جنین گیاه *Phaseolus vulgaris*: کاپیانی (Kaviani, 2010) در *tea (Camellia و Lilac (Melia azedarach L.)* و همچنین مهاجر و همکاران (Mohajer et al., 2016) در بذر *(Onobrychis viciifolia sinensis L.)*



شکل ۲: نمودار مقایسه اثر زمان های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت کننده بر روی صفت طول ساقه چه



شکل ۳: نمودار مقایسه اثر زمان های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت کننده بر روی صفت طول ریشه چه



شکل ۴: نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور کنجد با دو نوع محلول محافظت‌کننده بر روی صفت درصد جوانه‌زنی

نتیجه‌گیری کلی

نگهداری ژرم‌پلاسم به روش انجماد در ازت مایع از جمله روش‌های نگهداری گیاهان در شرایط برون محیطی (ex situ) می‌باشد که در حفظ طولانی مدت ذخایر توارثی، حفظ ثبات ژنتیکی پایه مادری، کاهش هزینه‌های نگهداری در شرایط مزرعه، نسخه پشتیبان برای گیاهانی که به صورت کلونی تکثیر می‌شوند و یا به عنوان یک سیستم حفاظتی برای کشت‌های ویژه محسوب می‌شود، نقش دارند. در این تکنولوژی با استفاده از تکنیک‌های مختلف، ماده ژرم‌پلاسم تا حد ممکن آگیری شده و در دمای بسیار پایین نیتروژن مایع (-196°C) به مدت طولانی (ده‌ها سال) ذخیره می‌گردد. با استفاده از تکنیک نگهداری در ازت مایع می‌توان روش نگهداری بذر و سایر بافت‌های گیاهی را فراهم ساخت که در آن مواد گیاهی را به طور نامحدودی و بدون از دست دادن قوه‌نامیه ذخیره‌سازی می‌کنند. منابع ژنتیکی بومی هر کشور، حاصل میلیون‌ها سال تکامل و سازگاری با شرایط اقلیمی هر کشور می‌باشند. این منابع ذخایر ژنتیکی ارزشمند و مورد نیاز برای اصلاح و استفاده از ژن‌های مفید در پژوهش‌های جاری و آینده کشور هستند. (باقری و ساکی، ۱۳۹۵). که در این مطالعه نیز اثر دو ماده ضدانجماد PVS2 و PVS3 بررسی شد و ارتباط صفات اندازه‌گیری شده با زمان تیمار در مواد ضدانجمادی مشخص گردید. در مطالعات آتی استفاده از سایر توده‌ها و ژنوتیپ‌های کنجد جهت مطالعات حفاظت انجمادی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه دانشگاه پیام‌نور اسدآباد و همه‌ی عزیزانی که در مسیر انجام این گزارش علمی، اینجانبان را یاری کردند بویژه دکتر محسن سعیدی دانشیار دانشگاه رازی قدردانی می‌گردد.

منابع

باقری، ه. و ساکی، س. (۱۳۹۵) ضرورت و راهکارهای حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی گل و گیاهان زینتی کشور. مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی. ۱ (۲): ۳۳-۲۴.

حسینی خواه، ف.، پارسا، س.، توکل افشاری، ر.، جامی الاحمدی، م. و اسماعیلی، ع. (۱۳۹۳). تأثیر هورمون‌های اسیدسالیسیلیک و اسید جیبرلیک بر فرآیندهای پیشگیری و بهبود زوال دو رقم کنجد. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴ (۴۵): ۶۲۴-۶۱۳.

رضوانی مقدم، پ. و سیدی، س.م. (۱۳۹۵). بررسی صفات جوانه‌زنی کنجد در ارتباط با اسیدهای چرب. مجله نهال و بذر ایران. ۵ (۲): ۱۱۹-۱۳۱.

منصوری، م.، مرزبانی، خ. و مردانیپور، ف. (الف) (۱۳۹۲) حفاظت انجمادی بذر کاسنی بوسیله شیشه‌ای شدن. پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اصفهان. صفحه ۴-۱.

منصوری، م.، کاکایی، م.، عبدالهی، م.ر. و شریفی، ش. (ب) (۱۳۹۲) مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا به روش شیشه‌ای شدن. مجله فن‌آوری زیستی در کشاورزی. ۴ (۲): ۳۹-۳۳.

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duval, Y. and Dereuddre, J. (1993) Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to dessication and cryopreservation of oil palm somatic embryos, *Cryo-letters*. 14: 243-250.

FAO, FLD and IPGRI. (2004) Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Forest and Landscape Denmark (FLD) and International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

Jitsopakul, N., Thammasiri, K., Yukawa, T. and Ishikawa, K. (2012) Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. *Science Asia*. 38: 244-249.

<http://ibrc.ir/index.aspx>.

Kholina, A.B. and Voronkova, N.M. (2012) Seed Cryopreservation of Some Medicinal Legumes. *Journal of Botany*. 1-7 pp.

Kaviani, B. (2010) Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (*Melia azedarach* L.), and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant omics journal*. 3 (6): 177-182.

Mohajer, S., Taha, R.M. and Mohajer, M. (2016) Effects of cryopreservation and relative humidity on viability and nutritional composition of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*). *Journal of Animal & Plant Sciences*. 26 (1): 116-122.

Martinkova, Z. and Honek, A. (2007) The effect of cryopreservation on germination of dandelion seeds. *Plant Protection Science*. 43: 63-67.

Miller, B. and McDonald, D. T. (1994) Viability, vigor and field performance. *Seed Science and Technology*. 22: 421-425.

Panis, B. and Lambardi, M. (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (Crops and forest trees). The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy. 5-7 March.

Parker, R.S., Sontag, T.J. and Swanson, J.E. (2000) Cytochrome P450- A-dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 3 (2): 531-534.

-
- Sepaskhah, A.R. and Andam, M. (2001) Crop coefficient of sesame in a semi-arid region of I.R. Iran. *Agricultural water management*. 49: 51-63.
- Surenciski, M.R., Flachslan, E.A., Terada, G., Mroginski, L.A. and Rey, H.Y. (2012) Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. *Biocell*. 36 (1): 31-36.
- Tay, D. (2005) Conserving herbaceous ornamental plant germplasm. In: M. McDonald and F.Y. Kwong (Eds). *Flower seeds: Biology and Technology*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Tray, D. (2006) *Seeds: Trade, Production and Technology*. The US national plant germplasm system: the ornamental plant germplasm center.
- Tacan, M., Tapia, C. and Perez, C. (2017) Effects of accelerated ageing and cryopreservation on seeds and embryonic axes of *Phaseolus vulgaris* L and *Arachis hypogaea* L. *Germination and seedlings vigor*. *PeerJ Preprints* | <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3203v1> | CC BY 4.0 Open Access | rec: 29 Aug 2017.
- Volk, G.M. and Walters, C. (2006) Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*. 52: 48-61.

Cryopreservation plant seed of sesame (*Sesamum indicum* L.) by Vitrification

M. Kakaei*¹, M. Mansouri²

**Received: 2017.8.17
accepted: 2018.11.21**

Abstract

In this research, cryopreservation was performed by vitrification method with two types of solution protecting PVS2 and PVS3 in 7 time levels (20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 minutes). This factorial experiment was conducted in completely randomized design (CRD) with two factors of protective solution (two level) and time levels (seven level) and three replications. The results of analysis of variance for treatment time and type of solution, in three traits, germination percentage, root and shoot length showed significant differences at the level of 1% ($P < 0.01$). Interaction effect of time treatment in solution type for the length of root and shoot length were significant at the level of 1% ($P < 0.01$) and for germination percentage was insignificant at the level of 5% ($P < 0.05$). Overall, analysis of variance showed that the protective solution type and levels of treatment time in the process of vitrification and the cryopreservation sesame plant is effective in assessment indicators.

Key words: Oil, Cryoprotectants, Vitrification.

1- Assistant Professor, Department of Agriculture (Plant Breeding and Genetics), Faculty of Sciences, Payame Noor University, PO BOX 19395-4697, Tehran-Iran

* (Corresponding Author: Mehdikakaei37@gmail.com & M_Kakaei@pnu.ac.ir)

2- Persian medicine in combat and crisis research center

Content

Skeletal structure of Shir mahi *Schizothorax pelzami* from Dasht-e-Kavir basin

P.Jalili, S. Eagderi, Sh. Latifnezhad, M.Seifali.....22

Increased expression of recombinant activin A using optimized cell culture medium

Z. Hajihassan, N. Nazari.....35

The production of fatty acids with biofuel potential by *Yarrowia lipolytica* from glucose

F. Darvishi, N. salmani.....47

Study of the binding affinity of anticancer drug, vincristine, to chromatin histone proteins by using spectroscopic methods

A.Rabbani-Chadegani,A.Mohammadgholi.....60

The study of fruit structure in endemic and semi-endemic species of *Veronica L. (Plantaginaceae)* in Iran

Sh. Saeedi Mehrvarz, S. Ramzi78

Effect of salinity stress on rice varieties (*Oryza Sativa L.*) in seedling and reproductive stage under hydroponic culture conditions

F. Saeidzadeh, R. Taghizadeh.....94

Study of vascular plant species diversity in Bidouiyeh protected area in Bardsir, Kerman

S. Shakib, M. Sharifi-Tehrani, Z. Hasanabadi.....110

Isolation and characterization of a bacterium with free glutaminase L-Asparaginase II from the Persian Gulf

S. Shoaee Naeeni, O. Ranaei Siadat, Gh.h. Ebrahimipour, B. Bambai.....132

Design and manufacture of electromagnetic device utilizing Nano filtration in order to increase production and reduce environmental pollution in agricultural irrigation water

S. Sharafaldin Shirazi, M. Nejati Jahromi, M. Simiari.....153

Chemical composition compard on *Oreochromis niloticus* and *Oncorhynchus mykiss* muscle from Khouzestan provice

A.Askary Sary, F.Naghibi,169

Evaluation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus gene expression treated with UV radiation in uranium bioleaching process

M. Sheydaie, R. Haji Hosseini.....189

Cryopreservation medicinal plant seeds of sesame (*Sesamum indicum L.*) by Vitrification

M. Kakaei, M. Mansouri.....201

Journal of Applied Biology
summer2019

AlZahra University - Vice Chancellery for Research

Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor of Alzahra University

Chief Editor: E. Abdi ali, Associate Professor of Alzahra University

Editorial Boards

F. Eftekhar, Associate Professor Of Shahid Beheshti University

M. Pakravan, Associate Professor Of Alzahra University

Z. Minochehr, Associate Professor Of Tehran University

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

P. Ghadam, Associate Professor Of Al-Zahra University

M. Seyyedi , Associate Professor Of Tehran University

T. Falsafi Momughani, Associate Professor Of alzahra University

A. Saboora, Associate Professor Of Alzahra University

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Al-Zahra University - Vice Chancellery for Research

English& Persian Editor: Dr. Seyyed Abolghasem Ghadami

Printing and Binding: Graduate Publishing

Circulation: 20 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