



مجله زیست‌شناسی کاربردی

پاییز 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، استاد 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 دانش‌نگاران اوج

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

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

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

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

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

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 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 نام گذار اشاره نشود. اسم نام گذار 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 (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. اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری
- 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 (Abstarct): 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).
- 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.
- ۹- برای بیان اوزان و مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
- ۱۰- نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها
- استفاده از جدول و شکل تنها هنگامی مجاز است که نتوان اطلاعات بدست آمده (نتیجه) را براحتی بیان کرد.
- عنوان جدول و شکل باید گویا باشد به نحوی که نیاز به مراجعه به متن مقاله نباشد. علائم اختصاری یا زیرنویس‌ها در پایین جدول یا شکل معرفی شوند.
- داده‌ها یا بصورت جدول و یا شکل نمایش داده شوند، یعنی داده‌هایی نباشند که به هر دو صورت شکل و جدول ارائه شوند.
- شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند، بصورت سیاه و سفید، با بافت ساده طراحی و شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند، بدون سایه و با کیفیت بالا، ارسال شوند.
- در هر قسمت که به یک جدول یا شکل اشاره می‌شود، حتی المقدور بلافاصله ارائه شوند و ارائه آنها به صفحات بعد موکول نشود.
- ابعاد جدول یا شکل طوری تنظیم شود که حداکثر در یک صفحه مجله جا بگیرد.
- جدول با ۳ خط افقی رسم شود. (دوخط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول) و بقیه خطوط عمودی و افقی غیر فعال شوند.
- تمامی اعداد و متن درون جداول و شکل‌ها، انگلیسی (وسط چین، ۱۰ نازک) باشد. اعداد در صورت اعشاری بودن، تنها تا دو رقم اعشار ادامه داشته باشد.
- عنوان جدول (در بالای جدول) و شکل (در پایین شکل) به زبان فارسی باشد. عنوان وسط چین ۱۱ توپر (Bold)
- زیرنویس و علائم اختصاری زیر جداول و شکل‌ها، فارسی نازنین ۸ نازک باشد.
- شکل‌ها در جای مناسب در متن ارائه شود.
- کادر اطراف شکل‌ها حذف شود.
- ۹- سپاسگزاری: اختیاری است، نازنین ۱۲ معمولی.
- ۱۰- منابع: ۱۲ معمولی.
- تمام منابع پایان مقاله، بدون شماره باشند، بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشند.
- عنوان مجله‌ها کامل نوشته شوند.
- (برای استفاده از نام‌های اختصاری استاندارد یا کامل مجلات علمی، به سامانه مجلات مربوطه مراجعه شود.)
- بین حروف اختصاری نام‌های اول یک نگارنده، فاصله نباشد (مثال: A.D.C).
- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده اند، به جای ذکر سال، از عبارت in press استفاده شود.

- بر حسب نوع منبع، فقط مطابق الگوی زیر عمل و 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/projectsummary.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

اثر تیمار پاکلوبوترازول بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی موثر در تحمل تنش سرما در جوانه انگور رقم بیدانه سفید پروانه روستایی، موسی رسولی، آرش بابایی..... ۹

اثر نانو ذرات نقره بر ظرفیت آنتی اکسیدان و الگوی پروتئین محلول کل در گیاهچه‌های گوجه در شرایط این ویترو رویا رضوی زاده ۲۲

سطوح فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت‌های عضله و آبشش سه گونه ماهی کاراس طلائی (*auratus Carassius*)، سیاه کولی (*Vimba persa*) و زردپر (*Luciobarbus capito*) در سد منجیل عیسی سلگی، حسن بیگدلی، آرزو سلیمانی..... ۳۹

تاثیر سوپرچادب نانوکامپوزیت بر میزان مقاومت چمن اسپورت به تنش خشکی حسین باقری، موسی سلگی، مینا تقی زاده، عباس میرزاخانی ۵۴

مقایسه روش‌های مختلف تانن زدایی برگ گردوی ایرانی (*Junglans regia L.*) و اثر آنها بر ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون تنی بهزاد امیر، سعید سبحانی راد..... ۶۹

تجزیه ارتباط مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات مورفولوژیک برنج با استفاده از در شرایط غرقاب و تنش خشکی ISSR نشانگرهای محمدرضا کریم، حسین صبوری، احمد رضا دادرس..... ۸۳

بررسی انعطاف پذیری ریختی ماهی خواجه (*Schizotorax pelzami Kessler 1870*) در شرق ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی آمنه سازگار، امید صفری، شهناز دانش، فائزه یزدانی مقدم..... ۱۰۴

مقایسه ریخت‌سنجی هندسی ماهی تیله‌خوس (*Capoeta capoeta*) در سه حوضه ایران یزدان کیوانی، محمود بنی‌مسنی، عیسی ابراهیمی..... ۱۱۵

بهبود سازی کالوس زایی و بازایی مستقیم گلرنگ با استفاده از قطعات ریشه، لپه و محور زیر لپه

محمد افشار شانديز ، حسن رهنما، حسين آذرنیوند.....۱۲۹

جداسازی باکتری های مولد بیوادمولسیفایر از رسوبات آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان

هدی سباتی، حسین معتمدی.....۱۴۱

بررسی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های سویا (تلار، DPX و کاسپین) تحت سمیت کادمیوم

شهلا هاشمی، فرشته محمد حسنی۱۶۰

اثر تیمار پاکلوبوترازول بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی موثر در تحمل تنش سرما در جوانه

انگور رقم بیدانه سفید

پروانه روستایی^۱، موسی رسولی^{۲*}، آرش بابایی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

چکیده

هدف این پژوهش بررسی اثر پاکلوبوترازول بر شاخص‌های فیزیولوژیکی جوانه‌های بهاری انگور بود. محلول‌پاشی پاکلوبوترازول روی رقم بیدانه سفید با غلظت‌های ۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار (بلوک) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در اواخر دوره رکود جوانه‌ها در ملایر انجام شد. تغییرات شاخص‌های محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدهید، قندمحلول، پروتئین کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز جوانه‌ها در بهار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اثر معنی‌دار و مطلوب پاکلوبوترازول را روی شاخص‌های پرولین، قندمحلول، پروتئین کل و آنزیم‌ها نشان داد. تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر را در کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید جوانه‌های برگ (۱۳ درصد کاهش نسبت به شاهد) و افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز (بترتیب با مقادیر ۵۶۳، ۴۷۸ و ۴۰۷ درصد افزایش نسبت به شاهد)، نشان داد. با توجه به تاثیرهای شاخص‌های مزبور در تعیین میزان تحمل به تنش‌های محیطی، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بعنوان مناسب‌ترین غلظت در ارتقا سازش‌پذیری جوانه‌ها برای تحمل سرمای دیررس بهار مشخص گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین کل، پرولین، قندمحلول، مالون‌دی‌آلدهید

مقدمه

پاکلوبوترازول جزء تریازول‌ها است و اغلب به عنوان یک کندکننده رشد کاربرد دارد. مارشال و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که ترکیبات تریازولی باعث افزایش هورمون‌های آبسزیک اسید و پلی‌آمین‌ها می‌گردند که با اثر روی کاهش شاخص فیزیولوژیکی مقدار اتیلن در القای تحمل به سرما نقش دارند (Marshall et al., 2000). فلتچر و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که پاکلوبوترازول باعث تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله توکوفرول، آسکوربات و سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی همچون

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ملایر.

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر

* (نویسنده مسئول (m.rasouli@malayeru.ac.ir)

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ملایر.

سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردکتاز می‌شود. این آنزیم‌ها نقش حفاظت غشاها را در مقابل خطرات اکسیداتیو ناشی از تمامی تنش‌ها را برعهده دارند (Fletcher *et al.*, 2000). گابور و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی تاثیر پاکلوبوترازول در توت فرنگی 'کاماروسا' نشان دادند که پاکلوبوترازول موجب القای افزایش هدایت روزنه‌ای و اندازه و نیز تعداد روزنه‌ها را در برگ هلو می‌شود و به این ترتیب تنفس را در گیاهان مذکور بهبود می‌بخشید (Gabor *et al.*, 2001). افزایش تنفس موجب بالا رفتن مقدار قند محلول در گیاه می‌گردد و این فرآیند موجب حفظ تعادل اسمزی و ثبات غشاء در برابر تنش‌ها می‌شود (Joshi, 2007). به این ترتیب که ساکارز می‌تواند به عنوان جانشینی برای آب عمل کرده و باعث گردد تا فسفولیپیدهای غشاء در فاز کریستال-مایع حفظ شده و از تغییرات ساختمانی آن جلوگیری گردد. استفاده از پاکلوبوترازول به همراه هرس دیر هنگام در پژوهش انجام شده توسط محمودزاده و همکاران (۲۰۰۸) افزایش دوره رکود جوانه‌های انگور و فرار از سرمای دیررس بهاره را موجب شد (Mahmoudzadeh *et al.*, 2008). شاکری و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که پاکلوبوترازول موجب افزایش وزن تر و خشک، مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای برگ و در نتیجه افزایش میزان سیتوکنین در برگ انگور می‌شود (Shakeri *et al.*, 2011).

در واقع اثر اولیه این ترکیبات، جلوگیری از فعالیت کائورن اکسیداز است، این آنزیم تبدیل انت کائورن به کائورونیک اسید را در مسیر سنتز جیبرلیک اسید کاتالیز می‌کند؛ در نتیجه میزان جیبرلین کاهش می‌یابد. ارشادی و دارابی (۲۰۱۱) در پژوهشی که با کاربرد غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول روی بادام رقم □ شاهرود انجام دادند نشان دادند که پاکلوبوترازول با کاهش جیبرلیک اسید باعث لیگنینی شدن، افزایش قطر ساقه و کاهش محتوی آب نسبی بافت ساقه می‌شود و در نتیجه باعث افزایش تحمل بافت‌ها و کاهش نقطه انجماد آنها می‌گردد (Ershadi & Darabi, 2011).

در استان همدان و به خصوص شهرستان ملایر همواره سرمازدگی بهار اتفاق می‌افتد. سرمازدگی بهاره اگر هم‌زمان با مراحل اولیه رشد جوانه‌ها و یا گلدهی (مراحل اولیه تشکیل میوه) رخ دهد، باعث کاهش باردهی تاک‌ها می‌شود زیرا در این زمان‌ها گیاه به تنش‌های دمایی حساس است. کندکننده‌های رشد موجب به تاخیر افتادن مراحل خروج از رکود جوانه‌ها و فرار از سرما می‌گردند. با توجه به تمام اثرات مثبت پاکلوبوترازول، اثرات جانبی آن روی صفات فیزیولوژیکی و سلامت گیاه مورد تردید است و حتی در برخی موارد استفاده از آن ممنوع شده است با این وجود هنوز هم از پاکلوبوترازول به صورت محلول پاشی روی خاک یا گیاه استفاده می‌گردد. در این موارد معمولاً برای جلوگیری از ماندگاری آثار سوء این ماده در میوه، محلولپاشی را در غلظت‌های بسیار پایین و با فاصله زیاد از مراحل اولیه رشد میوه انجام می‌دهند. هدف این پژوهش بررسی اثر تیمار پاکلوبوترازول بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه در زمان بیشترین حساسیت گیاه به سرمای دیررس بهاره (رویش اولیه جوانه‌ها) در انگور رقم بیدانه سفید از یک سو و از سوی دیگر پیگیری تداوم تاثیرات این ماده بر متابولیت‌های اولیه تا زمان گلدهی (اولین مراحل تشکیل میوه) بود.

مواد و روش ها

این آزمایش در یکی از تاکستان‌های شهرستان ملایر استان همدان، در حوالی پردیس دانشگاه ملایر واقع در ۵ کیلومتری جاده اراک انجام شد. تاکستان مورد آزمایش ۱۶ ساله بود که به روش سنتی کشت شده و آبیاری به صورت غرقابی صورت می‌گرفت. جهت اعمال تیمارها روی تاک‌های مورد نظر، پاکلوبوترازول خالص (SERVA30078 ساخت شرکت هیدلبرگ^۲ نیویورک، آمریکا) در پنج غلظت ۰ (شاهد)، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. آزمایش براساس طرح بلوک کامل تصادفی و در سه تکرار (بلوک) انجام شد. هر بلوک شامل پنج درختچه بود. محلول پاشی با دقت و کامل انجام شد به طوریکه تمام شاخه‌های درختچه‌ها خیس شدند (حالت چکیدن محلول از شاخه‌ها). محلول پاشی پاکلوبوترازول در اواخر مرحله رکود در زمستان سال ۱۳۹۱ بر رقم بیدانه سفید انجام گردید. نمونه‌برداری از ساقه‌های یکساله دارای جوانه برگ زمانی که جوانه‌های شاهد در مرحله ۳ تا ۴ برگی بودند، در بهار سال ۱۳۹۲ انجام شد. به این ترتیب که تعدادی از قلمه‌های حاوی ۵-۶ جوانه در حال رویش از هر تیمار برداشته شد. جهت انجام سنجش‌های فیزیولوژیکی از خود جوانه استفاده شد. زمان محلول پاشی و نمونه‌برداری در این پژوهش با توجه به دانش بومی و مشاهده وضعیت و مراحل رشد تاکستان تعیین می‌شود که در هر سال و منطقه ممکن است تغییر کند و قابل تعمیم به سایر مطالعات مشابه نیست. دمای زمان نمونه‌برداری نیز در جدول ۱ ثبت گردید.

جدول ۱: دماهای ثبت شده توسط ایستگاه هواشناسی ملایر در روز نمونه‌برداری.

مقادیر دمایی	دما (°C)
بیشترین دما	۲۳
کمترین دما	-۱
میانگین دما	۱۱

سنجش‌های فیزیولوژیکی

مواد شیمیایی مورد نیاز برای سنجش‌های فیزیولوژیکی از شرکت مرک آلمان خریداری شد و برای سنجش‌های مختلف دستگاه‌های اسپکتروفوتومتر (UV-1200 دیجیتالی مدل JENUS ساخت چین) و سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Z326K شرکت ویتا طب کوشا نماینده کمپانی Hettich آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

برای اندازه‌گیری مقدار پرولین از روش استاندارد بتس و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد (Bates *et al.*, 1973). پراکسیداسیون لیپیدها با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید به روش هیت و پیکر (۱۹۶۹) انجام شد (Heath & Paeker, 1969). سنجش قندهای محلول از روش فنل - اسیدسولفوریک با روش کوچرت (۱۹۷۸) و اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از

² Heidel Berg

روش لیتچن تالر (۱۹۸۷) انجام پذیرفت (Kochert, 1978; Lichtenthaler, 1987). سنجش غلظت پروتئین محلول نیز با استفاده از روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد (Bradford, 1976). برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از روش کار و میشر (۱۹۷۶) برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش ناکانو و آساد (۱۹۸۱) استفاده شد (Kar & Mishra, 1976; Nakano & Asada, 1981).

تجزیه داده‌های بدست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) براساس طرح بلوک کامل تصادفی انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel 2010 رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس یک طرفه داده‌ها در اکثر پارامترها اثر معنی دار پاکلوبوترازول را روی شاخص‌های فیزیولوژیک مورد بررسی را نشان دادند (جدول ۲).

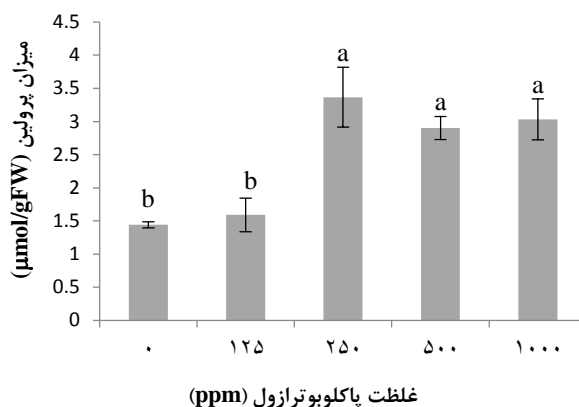
جدول ۲: تجزیه واریانس یک طرفه اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر شاخص‌های فیزیولوژیکی جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید.

منابع تغییر	df	پرولین	قند محلول	مالون دی آلدئید	کاروتنوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	پروتئین کل	پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	میانگین مربعات
تکرار	۲	۰/۱۴ns	۰/۰۶ns	۰/۰۴ns	۲/۱۶**	۰/۰۸**	۰/۰۰۲ns	۰/۰۱ns	۱/۱۶*	۰/۰۱ns	۰/۳۷ns	
تیمار	۴	۲/۳۵**	۵/۰۳**	۱/۰۵**	۱/۹۸**	۰/۰۸**	۰/۰۲۴**	۱/۱۷**	۸/۲۳**	۶/۸۲**	۳۱۳/۵۸**	
Error	۸	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۱۴	۰/۲۶	۰/۰۳	۲/۱۲	
CV%		۱۰/۲۶	۶/۹	۶/۱۶	۶/۷۱	۶/۳۷	۷/۹۸	۷/۱۸	۱۰/۱۸	۱۳/۷۳	۱۳	

ns و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ براساس آزمون دانکن.

میزان پرولین

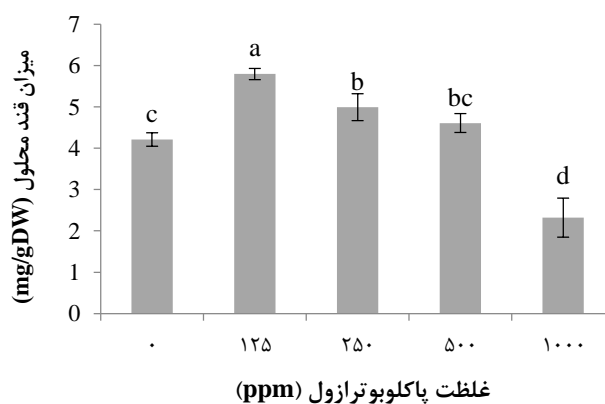
مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارهای بیشتر از ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد مقدار پرولین را در گیاه افزایش معنی‌داری دادند (شکل ۱). هماهنگ با این نتایج پژوهش‌های جلیل و همکاران (۲۰۰۷) و نیوس و همکاران (۲۰۰۱) دادند که تریازول‌ها خصوصاً پاکلوبوترازول مقدار پرولین را در گیاه افزایش می‌دهند که علت آن اثر تریازول‌ها در افزایش هورمون اسید آبسزیک است زیرا اسید آبسزیک موجب افزایش مقدار آمینواسیدها از جمله پرولین می‌شود (Jaleel et al., 2007; Nieves et al., 2001).



شکل ۱: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای پروکسیداز جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارند (Duncan).

مقدار قند محلول

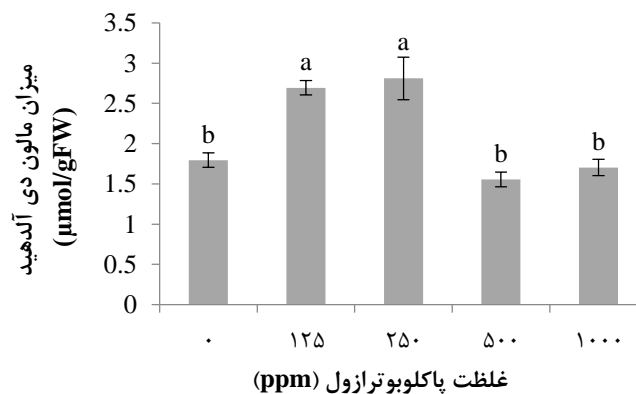
نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد تمامی تیمارهای پاکلوبوترازول به جز غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش قند محلول در بافت گیاه نسبت به شاهد شده بودند (شکل ۲). هماهنگ با این نتایج، گوپی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که پاکلوبوترازول با ممانعت از تولید جیبرلین و تحریک تولید سیتوکینین از فعالیت آنزیم تولید کننده نشاسته جلوگیری می‌کند و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تجزیه کننده نشاسته را در برگ افزایش می‌دهد (Gopi *et al.*, 2007). به علاوه در این پژوهش بیشترین افزایش قند محلول در تیمار پاکلوبوترازول در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۲). تحقیق‌های روهنر و بوچنائر (۱۹۸۱) نشان دادند تریادایمنول در غلظت‌های پایین به عنوان یک ترکیب تریازولی، فعالیت آمیلاز تجزیه کننده نشاسته را در اکثر گیاهان افزایش می‌دهد و موجب افزایش میزان قند محلول در بافت می‌شود (Rohner & Buchenauer, 1981).



شکل ۲: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای قند محلول جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارند (Duncan).

میزان مالون دی آلدئید

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌های آزمون دانکن تیمار پاکلوبوترازول در غلظت‌های پایین (۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) با افزایش معنی‌دار میزان مالون دی آلدئید نسبت به شاهد، تاثیر منفی روی بافت گیاه داشت (شکل ۳). این نتایج ناهماهنگ با تحقیق گوپی و همکاران (۲۰۰۷) است که نشان دادند پاکلوبوترازول پراکسیداسیون غشاء را کاهش می‌دهد (Gopi *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد که در غلظت‌های پایین تاثیر تنش حاصل از خیس شدن ساقه‌ها در زمان محلول-پاشی (زمستان) موجب خسارت بیشتر غشا شده است که با وجود تاثیرات مثبت پاکلوبوترازول در حفاظت از غشا (که در مطالعات گذشته مشخص شده بودند)، در پژوهش حاضر مقدار مالون دی آلدئید نسبت به شاهد افزایش یافت. در غلظت‌های بالا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) مقدار مالون دی آلدئید نسبت به شاهد کاهش نشان داد که این کاهش معنی‌دار نبود (جدول ۳). در این پژوهش مشاهده شد میزان پرولین جونه‌ها در این تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول افزایش یافته است. در ارتباط با این موضوع سیواکومار و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که پرولین می‌تواند در آب پوشی لایه احاطه کننده فسفولیپیدها نقش داشته و با گروه‌های فسفات واقع در سر فسفولیپیدها برهمکنش انجام دهد (Sivakumar *et al.*, 2000). به عبارتی در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد افزایش پرولین با این مکانیسم موجب محافظت از غشاهای تیلکوئیدی کلروپلاست‌ها و کاهش میزان مالون دی آلدئید در غلظت‌های مزبور شده است (Ashraf & Foolad, 2007).

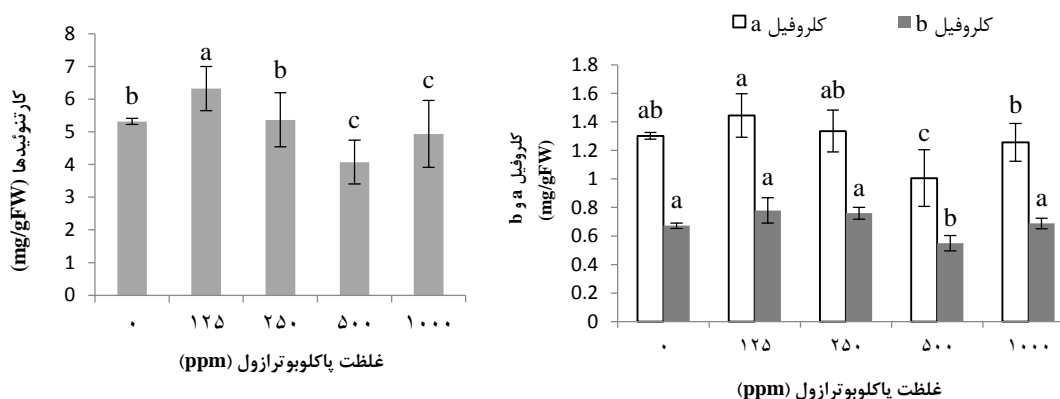


شکل ۳: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای مالون دی آلدئید جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (Duncan).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

تیمارهای پاکلوبوترازول در غلظت‌های پایین موجب افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی جوانه‌ها شد و در غلظت‌های بالا کاهش مقدار رنگیزه‌ها را نشان داد بطوری‌که مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار پاکلوبوترازول با غلظت ۱۲۵ میلی گرم در لیتر موجب افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد شدند (شکل ۴). گزارش‌های زو (۲۰۰۵) و تکالین و همس

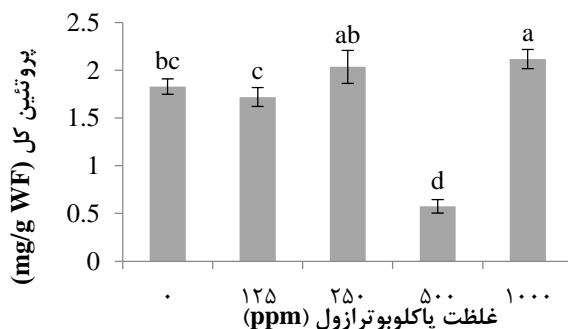
(۲۰۰۴) نشان داد، پاکلوبوترازول تیغه‌های استرومایی و تعداد تیلاکوئیدها را در هر گرانوم زیاد می‌کند و به طور معنی‌داری میزان کلروفیل b و a را در بافت‌های برگ افزایش می‌دهد (Tekalign & Hammes, 2004; Zhou, 2005). در پژوهش حاضر در غلظت ۱۲۵ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول بیشترین قند محلول مشاهده شد که یکی از دلایل آن می‌تواند افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در این غلظت و افزایش فتوسنتز در جوانه‌های حاصل از این تیمار باشد. تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر موجب کاهش مقدار رنگیزه‌ها شد. با توجه به اینکه مقدار قند محلول به عنوان محصول اولیه فتوسنتز در این تیمار مشابه نمونه شاهد بود، کمتر بودن میزان رنگیزه‌ها می‌تواند تحت تاثیر جوانتر بودن برگ‌های نسبت به شاهد باشد. پاکلوبوترازول به عنوان یک کندکننده رشد موجب تاخیر در رشد جوانه‌ها می‌شود.



شکل ۴: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (Duncan).

پروتئین کل

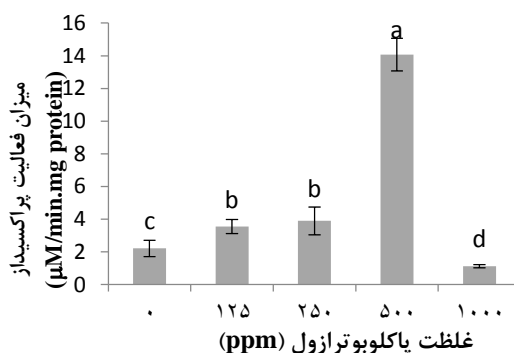
مقدار پروتئین کل جوانه‌ها در تیمارهای ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نسبت به شاهد افزایش یافت و غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین مقدار پروتئین کل را داشت (شکل ۵). هماهنگ با این نتایج پژوهش‌های نیوس و همکاران (۲۰۰۱) و شیمونو (۲۰۰۴) گزارش کردند که پاکلوبوترازول در گیاهان بطور غیر مستقیم موجب حفظ پروتئین‌ها از تخریب می‌شود (Nieves et al., 2001; Shimono, 2004). آن‌ها مکانیسم اثر را این گونه بیان کردند که با کاهش جیبرلیک اسید، هورمون آبسزیک اسید افزایش می‌یابد. مانع تنش آب می‌شود و مقدار اسید آمینه پرولین را افزایش می‌دهد. در نتیجه عوامل آسیب رسان مانند رادیکال‌های آزاد حذف می‌شوند و مقدار بالای پرولین با تحت تاثیر قرار دادن آنزیم‌ها به حفظ ساختار پروتئین‌ها و فعالیت آن‌ها کمک می‌کند.



شکل ۵: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر پروتئین کل جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (Duncan).

آنزیم پراکسیداز

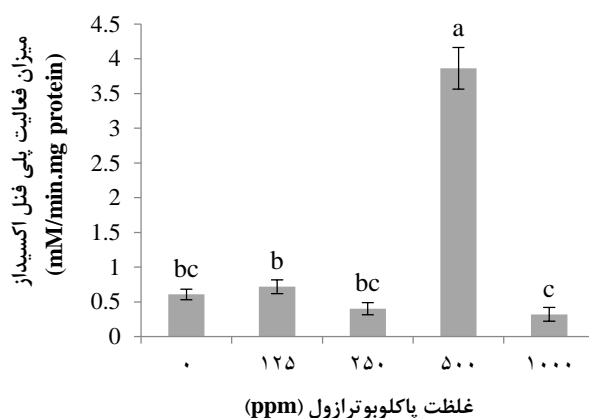
تیمار پاکلوبوترازول در تمام غلظت‌ها به جز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز جوانه‌ها نسبت به نمونه شاهد شد و تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر را در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت (شکل ۶). هماهنگ با این نتایج، مانیش (۲۰۱۰) نشان داد که پاکلوبوترازول با کاهش جیبرلیک اسید مقدار فعالیت آنزیم پراکسیدازها را در نمونه‌های گیاهی افزایش می‌دهد و جالب آنکه مطلوب‌ترین تیمار پاکلوبوترازول از نظر شاخص مالون‌دی‌آلدئید غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد (Manish, 2010). در این پژوهش بررسی شاخص ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که مقدار هر سه آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول بیشترین مقدار را داشتند. هر سه آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد نقش دارند و آنزیم‌های پراکسیداز پس از کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف H_2O_2 نقش ایفا می‌کنند (Cook *et al.*, 2004). شاخص مالون‌دی‌آلدئید بیانگر میزان آسیب وارده به غشاء در اثر رادیکال‌های آزاد است (Davey, 2005). بنابراین پایین بودن مقدار مالون‌دی‌آلدئید در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول می‌تواند در اثر فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان علاوه بر افزایش پرولین و قند محلول در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر باشد که در نهایت منجر به حفظ ساختار آنزیم‌ها شده گردیده است.



شکل ۶: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر فعالیت آنزیم پراکسیداز جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (Duncan).

آنزیم پلی فنل اکسیداز

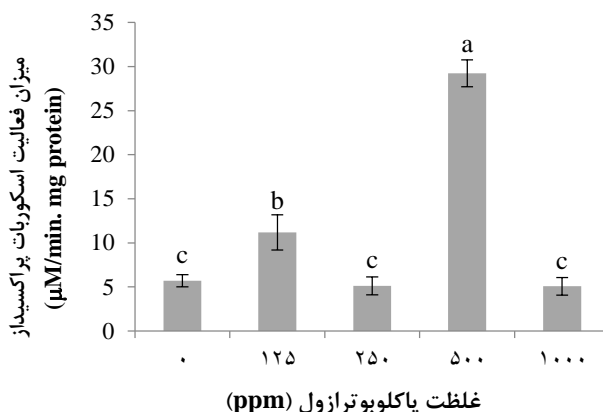
مقایسه میانگین داده های بدست آمده نشان داد که در اوایل فصل رشد جوانه ها تیمار پاکلوبوترازول با غلظت های ۱۲۵ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر موجب افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به شاهد شدند و تیمار پاکلوبوترازول با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز را داشت (شکل ۷). هماهنگ با این نتایج، بالاساندرام و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که پاکلوبوترازول با تاثیر روی کاهش جیبرلیک اسید موجب افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز می شود که منجر به اتصال اجزا فنلی به دیواره سلولی می گردند (Balasundram *et al.*, 2008). از آنجایی که تمامی سنجش های این پژوهش روی قسمت جوانه انجام شده است؛ افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز موجب ورود ترکیبات فنلی به دیواره های سلولی و استحکام بافت های گیاهی در حال رشد و افزایش آمادگی در مواجهه با تنش ها می شود.



شکل ۷: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارند (Duncan).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

با توجه به شکل (۸) میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز جوانه ها در غلظت های ۱۲۵ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نسبت به شاهد افزایش چشمگیری را نشان دادند. هماهنگ با این نتایج، گوپی و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده اند که تریازول ها فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را افزایش می دهند (Gopi *et al.*, 2007). فلتچر و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که پاکلوبوترازول باعث تقویت سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی از جمله آسکوربات پراکسیداز می شود که نقش حفاظت غشاها را در مقابل خطرات اکسیداتیو ایفا می نمایند (Fletcher *et al.*, 2000). جعفری و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که پاکلوبوترازول در هلو فعالیت آسکوربات پراکسیداز سیتوسولی را افزایش می دهد (Jafari *et al.*, 2007). سنکر و عبدالجلیل (۲۰۰۷) نشان دادند که تیمار پاکلوبوترازول موجب افزایش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در بادام زمینی خصوصاً در شرایط تنش خشکی می شود (Sankar & Abdul Jaleel, 2007).



شکل ۸: مقایسه میانگین مربعات اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز جوانه بهاری انگور رقم بیدانه سفید. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (Duncan).

نتیجه‌گیری کلی

تمامی مسیرهای سوخت و ساز درون گیاه تحت تاثیر یکدیگر قرار دارند. شاخص‌های اندازه‌گیری شده در این پژوهش نیز مستقل از هم نیستند. وجود رابطه‌های پیچیده بین آنها موجب شده است تا پاکلوبوترازول نیز اثرهای متفاوتی را روی این شاخص‌ها داشته باشد. در این پژوهش مشاهده شد که پاکلوبوترازول در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر با وجود افزایش مقدار آنزیم‌های پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز و قند محلول که پارامترهای موثری در حفاظت از غشا در برابر عوامل تنش‌زا هستند، موجب افزایش میزان پراکسیداسیون غشا شود. تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول نیز با وجود مقدار بالای پرولین و قند محلول و آنزیم پراکسیداز مقدار بالای مالون دی‌آلدئید را نشان داد. تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز میزان پرولین و پروتئین کل را افزایش داد اما مقدار مالون دی‌آلدئید در این نمونه‌ها مشابه شاهد بود. این سه تیمار ۱۲۵، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به جز مواردی که گفته شد، تاثیر معنی‌داری روی سایر شاخص‌ها نداشتند. تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول موجب افزایش معنی‌دار مقدار پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و اسکوربات پراکسیداز و افزایش نسبی مقدار قند محلول شد. با توجه به تاثیر تمام این شاخص‌ها در حفظ غشا از پراکسیداسیون، کاهش مقدار مالون دی‌آلدئید در سطح ۱۰ درصد مشاهده شد. بطور کلی در این پژوهش محلول‌پاشی پاکلوبوترازول با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اثر مطلوبی روی شاخص‌های موثر در آمادگی انگور رقم بیدانه سفید برای تحمل تنش‌های محیطی از جمله تغییرات دمایی در مراحل آغازین رشد جوانه‌ها داشت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از سرکار خانم سمیرا خرسندی مسئول محترم آزمایشگاه‌های گروه زیست شناسی و آقای مهندس میرشاهولد مسئول محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ملایر به خاطر مساعدت در انجام امور آزمایشگاهی و فراهم آوردن مواد مورد نیاز جهت آزمایش‌ها تشکر می‌گردد.

منابع

- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant a biotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206- 216.
- Balasundram, S.K., Husni, M.H.A. and Ahmad, O.H. (2008). Application of geostatistical tools to quantify spatial variability of selected soil chemical properties from a cultivated tropical peat. *Journal of Agronomy*. 7(1): 82-87.
- Bates, L.S., Walderd, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39:205-207.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Cook, D., Fowler, S. Fiehn, O. and Thomashow, M.F. (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of Arabidopsis. *Plant Biology*. 101:15243-8.
- Davey, M.W., Stals, E. Panis, B. Keulemans, J. and Swennen, R.I. (2005). High throughput of malondialdehyde in plant. *Analytical Biochemistry*. 347: 201-207.
- Ershadi, A. and Darabi, A. (2011). The effect of paclobutrazol on some parameters involved in low temperature-induced damages in almond (*Prunus amygdalus*) saplings cultivar Shahrood 12. Second national conference of almond with pivotal of exports. Shahrkord. 471-174. (In Farsi)
- Fletcher, R.A., Sopher, C.R. and Vettekkorumakankav, N.N. (2000). Modulation of gibberellins protects plants from environmental stresses. *Indian Journal of Plant physiology*. 5(2):115-126.
- Gabor, K., Ballmoos, P.V. and Brunold, C. (2001). Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling- induced injury. *Plant Physiology*. 127:1147-1156.
- Gopi, R., Abdul Jaleel, C. Sairam, R. Lakshmanan, G.M.A. Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R. (2007). Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on biomass, electrolyte leakage, lipid peroxidation and antioxidant potential of *Daucus carota* L. *Colloids and Surfaces Bionterfaces*. 60: 180-186.
- Heath, R.L. and Paeker, L. (1969). Photoperoxidation in isolated chloroplast and stiochiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125:189-198.
- Jafari, S.R., Kalantari, Kh.M. and Mosave, A.A. (2007). The role of paclobutrazol on accumulation of antioxidant in tomato plants (*Lycopersicum esculentom* L.) under cold stress. *Iranian Journal of Biology*. 20(3): 206-217. (In Farsi)
- Jaleel, C.A., Gopi, R. Sankar, B. Manivannan, P. Kishorekumar, A. Sridharan, R. and Panneerselvam, R. (2007). Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress, *South African Journal of Botany*. 73: 190-195.

- Joshi, S.C., Chandra, S. and Palni, L.M.S. (2007). Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetic*. 45(4): 594-600.
- Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*. 57(2):315-319.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids, Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148: 350-382.
- Mahmoudzadeh, H., Rasooli, V. and Dolati baneh, H. (2008). Effect of pruning time and paclobutrazole application on bud burst delaying of *Vitis vinifera* CV. Sefid Bidaneh in order to reduce of spring cold damage. *Pajouhesh and Sazandegi*. 80: 138 – 143. (In Farsi)
- Manish S., Kishor, A. Dahuja, A. and Sharma, R.R. (2010). Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*. 125: 785–788.
- Marshall, J., Beardmore, T. Whittle, C.A. Wang, B. Rutledge, R.G. and Eduardo, E. (2000). The effects of paclobutrazol, abscisic acid, and gibberellins on germination and early growth in silver, red, and hybrid maple. *Canadian Journal of Forest Research*. 30:557-565.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22: 867-880.
- Nieves, N., Martinez, M-E. Castillo, R. Blanco, M-A. and Gonzalez-Olmedo, J-L. (2001). Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:15-21.
- Sankar, B., Abdul Jaleel, C. Manivannan, P. Kishorekumar, A. Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007). Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. 60: 229–235.
- Shakeri, F., Baninasab, B. Ghobadi, S. and Mobli, M. (2011). Effects of paclobutrazol on leaf gas exchange parameters, vegetative growth and fruit quality of ‘Camarosa’ strawberry. *Iranian Journal of science and Thecnology of Agriculture and Neatural Resources*. 12(4):369-378. (in Farsi).
- Shimono, H., Hasegawa, T. Fujimura, S. and Iwama, K. (2004). Responses of leaf photosynthesis and plant water status in rice to low water temperature at different growth stage. *Field Crop Research*. 89: 71-83.
- Sivakumar, P., Sharmila, P. and Pardha Saradhi, P. (2000). Proline alleviates salt stress induced enhancement in the activity of ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, USA. 279: 512- 515.
- Tekalign, T. and Hammes, P.S. (2004). Response of potato grown under non-inductive condition to paclobutrazole: shoot growth, chlorophyll content, net photosynthesis, assimilate partitioning, tuber yield, quality, and dormancy. *Plant Growth Regulation*, 43: 227-236.
- Zhou, B., Huang, X. and Yang, R. (2005). Effects of abscisic acid and paclobutrazol on superoxide dismutase activity and proline content in lychee leaves under low temperature. *Acta Horticulturae Science*. 65: 209-214.

The treatment effect of Paclobutrazol on some effective physiological traits of cold stress tolerance in bud grape of cv. Bidane Sefide

P. Roostaei¹, M. Rasouli^{2*}, A. Babaei³

Received:2017.4.23

Accepted: 2019.3.4

Abstract

The aim of this study was investigation the effect of paclobutrazol on physiological parameters of spring buds of grapes. Foliar application of paclobutrazol on cultivar of Bidane Sefide at concentrations of 0, 125, 250, 500 and 1000 mg/L with three replicate contest of the randomized complete block design (CRB) was carried out in late buds dormancy in Malayer. Changes in proline content, malondialdehyde content, soluble sugar, total protein, photosynthesis pigments and enzymes activity of peroxidase, polyphenol oxidase and ascorbate peroxidase of buds were measured in spring. The results showed a significant effect of paclobutrazol on parameters of proline, soluble sugar, total protein and mentioned enzymes. The treatment of 500 mg/L had the greatest effect on decreasing of malondialdehyde content (with 13% decrease compared to the control) and increasing the activity of peroxidase, polyphenol oxidase and ascorbate peroxidase (with 563, 478, 407 decrease compared to the control, respectively). Due to the effects of these parameters on determination of tolerance to environmental stresses, concentration of 500 mg/L was determined as the best concentration to improve the adaptability of buds for late cold spring tolerance.

Kay word: Antioxidant enzymes, Malondialdehyde, Proline, Soluble sugar, Total protein.

1-MSc. Master graduate of Biology Departement, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran.

2-Associate Professor of Horticultural Science and Landscape Engineering Departement, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

* (Corresponding Aouter: m.rasouli@malayeru.ac.ir)

3-Assistant Professor of Biology Department, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

اثر نانو ذرات نقره بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان و الگوی پروتئین محلول کل در گیاهچه‌های گوجه در

شرایط *in vitro*

رویا رضوی زاده^{۱*}

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۵

چکیده

در این مطالعه تاثیر نانو ذرات نقره در اندازه‌های بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر و در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام بر روی تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند آنتوسیانین کل، الگوی پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گیاهچه‌های گوجه (*Solanum Lycopersicon*) در محیط کشت درون شیشه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان آنتوسیانین در پاسخ به حضور نانو ذرات نقره کاهش معنی‌داری را تا غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام به دنبال داشته است. پروتئین محلول کل گیاه با افزایش غلظت نانو ذره در اندام هوایی افزایش و در ریشه با افزایش غلظت در ۲۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد کاهش نشان داد. همچنین شدت بیان شش باند پروتئینی تحت تیمار با نانو ذرات نقره تغییر نمود. با افزایش غلظت نانو ذرات در محیط کشت افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه‌ها و اندام هوایی مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول کل، نانو فناوری، نانو ذرات نقره

مقدمه

نانو فناوری، دانش و فناوری ساخت مواد ریز و درشت با دقت اتمی برای تولید ساختارهای بزرگ‌تر، با نظم و خصوصیات مولکولی جدید برای کنترل ساختار و تولید وسایل در سطح اتمی، مولکولی و درشت مولکولی و استفاده موثر از آنها است. در واقع یکی از زمینه‌های مهم و رو به گسترش فعالیت‌های تحقیقاتی در علوم ماده مدرن، زمینه نانو فناوری و کاربردهای جدید نانو ذرات و نانو مواد است. این ذرات به دلیل اندازه کوچک و ویژگی‌های منحصر به فرد، قابلیت استفاده در علوم مختلف، مخصوصاً علوم زیستی را دارند. یکی از اولین اثرات کاهش اندازه ذرات به زیر ۱۰۰ نانومتر و تبدیل آنها به نانو ذرات، افزایش سطح به حجم است که موجب فرارگیری اتم‌های بیشتری در سطح نسبت به حجم و متعاقباً تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی ذرات می‌گردد. قابل توجه‌ترین ویژگی ذرات در ابعاد نانو توانایی عبور از سد‌هایی است که برای ذرات مشابه با ابعاد بزرگتر غیرممکن است. این ویژگی واکنش‌پذیری نانو ذرات به ویژه نانو ذرات فلزی را به شدت افزایش می‌دهد (Baker et al., 2013). بنابراین رهاسازی هر

۱-دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

* (نویسنده مسئول: razavi.roya@gmail.com)

نوع نانو ذره‌ای در محیط زیست ممکن است دارای تاثیرات مضر بالقوه‌ای باشد که همین امر مطالعه آنها را در سطوح مختلف زیستی دارای اهمیت می‌نماید. از جمله نانو ذراتی که استفاده و بالطبع رهاسازی آن در محیط زیست، به دلیل خواص منحصر به فردی مانند آفت زدایی و ضدعفونی کنندگی (Rabavel *et al.*, 1998; Wijnhoven *et al.*, 2009; Quadros & Marr, 2010; Faunce & Watal, 2010)، روز به روز در حال افزایش می‌باشد، نانو ذرات نقره است. نانو ذرات نقره را تقریباً می‌توان جزء گسترده‌ترین نانو ذراتی دانست که به دلیل ماهیت ضد میکروبی و ضدعفونی‌کنندگی‌شان از مدت‌ها پیش مورد استفاده انسان بوده‌اند و هم اکنون نیز با پیشرفت نانو فناوری استفاده از آنها در صنایع مختلف از ساخت خودرو، لاستیک، رنگ، صنایع هوافضا، ساختمان‌سازی، شیشه‌سازی، الکترونیک، صنایع دریایی گرفته تا ساخت وسایل زندگی و انواع مواد و پودرهای شوینده مورد استفاده در منازل و استفاده در لوازم و تجهیزات پزشکی و غیره شدت یافته است.

مشخص شده است که نقره در حالت یونی و در غلظت‌های کنترل شده خواص ضد میکروبی و ضد قارچی داشته و اثرات منفی بر انسان ندارد (Basra *et al.*, 1997). استفاده از ذرات نانو نقره به عنوان عامل ضد میکروبی به صورت تجاری و عمومی درآمده است (Geho *et al.*, 2006). نانو کریستال‌های نقره کاربرد خارق‌العاده‌ای در حیطة تشخیص حساسیت بیوملکولی، آنتی-میکروبی و درمانی، کاتالیز و میکرو الکترونیک دارند. نقره (Ag) یک عنصر فلزی نسبتاً کمیاب و از زمره فلزات سنگین است که همراه با فلزات بسیار سمی چون کادمیوم، کروم، مس و جیوه طبقه‌بندی می‌گردد (Ratte, 1999) و به صورت طبیعی در پوسته زمین وجود دارد و از طریق منابع مختلف صنعتی و آزمایشگاهی نیز در محیط آزاد می‌گردد (Schuzendubel & Polle, 2002). نقره عاملی در تغییر نفوذپذیری غشا سلولی نسبت به یون‌های پتاسیم است. از سوی دیگر بر روی عملکرد پمپ‌های K^+ -ATP و میتوکندری تاثیر می‌گذارد و تمایل زیادی به اتصال با یون‌های فلزی دارد. این ذرات به پروتئین‌های دارای گروه تیول (-SH) متصل گشته و می‌توانند باعث غیر فعال شدن آنها و نیز تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) شود (Chen *et al.*, 2008; Panyala *et al.*, 2008). میزان سمیت نقره در حالت‌های مختلف یونی و غیر یونی همچنان در پرده‌ای از ابهام وجود دارد و با توجه به غلظت یون نقره، رفتار چرخه سلولی و میزان تولید ROSها متفاوت خواهد بود اما به نظر می‌رسد کاربرد بیش از حد نانوذرات می‌تواند تهدیدی برای محیط زیست و جنبه‌های مختلف حیات محسوب گردد. در مورد عنصر نقره نتایج قطعی و کاملی وجود ندارد، اما بسیاری بر این باورند که نانوذرات علاوه بر اینکه سمی هستند با آزادسازی یون‌های نقره اثرات سمی Ag^+ را نیز از خود بروز می‌دهند (Chen *et al.*, 2008; Panyala *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2012). از سوی دیگر برخی مطالعات نشان‌دهنده تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهان می‌باشند (Salama, 2012; Hatami & Ghorbanpour, 2013). بنابراین مطالعه تاثیر شکل‌های مختلف نقره و نانونقره و بررسی شاخص‌های مختلف فیزیولوژیکی در موجودات زنده اعم از گیاهان می‌تواند گام مهمی در پیشبرد اطلاعات ما از ابعاد نانومتری ذرات و عواقب رهاسازی آنها در محیط زیست و زندگی انسان داشته باشد. به همین منظور در این مطالعه گیاه گوجه (*Solanum lycopersicum*)، به عنوان یک گیاه مدل و مهم از نظر

اقتصادی و باارزش غذایی و دارویی، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانونقره در شرایط این ویترو قرار گرفت و تغییرات در سطح بیان پروتئین‌ها و توان آنتی‌اکسیدانتی آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت محلول کلئیدی نانو ذرات نقره پوشش‌دار شده با PVP (پلی وینیل پیرولیدین) با گستره‌ی اندازه‌ی بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر از شرکت پاسارگارد تهران خریداری شد و به منظور آنالیز اندازه و قطر هیدرودینامیکی توسط دستگاه dynamic light scattering (DLS) مورد بررسی قرار گرفت. بذره‌های خشک گیاه گوجه S. lycopersicum رقم اصفهانی خریداری شده از شرکت پاکان بذر اصفهان، پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه و آب ژاول ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴ الی ۵ مرتبه در زیر هود لامینار و تحت جریان هوای استریل شستشو شد و در محیط کشت MS (Murashig & Skoog, 1962) حاوی ۱ درصد آگار، ۳ درصد ساکاروز با غلظت‌های ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو نقره (محلول‌های نانونقره مستقیم یه محیط کشت اضافه شدند و بعد اتوکلاو شدند) کشت داده شدند. شیشه‌های کشت حاوی بذر در اتاق رشد با شرایط کنترل شده دمایی و در فتوپریود ۸/۱۶ ساعت نور/تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از جوانه زنی و رشد گیاهچه‌ها در محیط‌های حاوی تیمارهای مختلف نانو ذرات نقره به مدت چهار هفته، برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و الگوی پروتئینی در گیاهچه‌های حاصل بررسی گردید.

سنجش میزان آنتوسیانین کل استخراج آنتوسیانین‌ها براساس روش واگنر (Wagner, 1979) انجام شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم برگ گیاه با ترازو توزین و سپس با ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۱ درصد اسیدی (با نسبت حجمی ۱/۹۹) به ترتیب از اتانول/اسید کلریدریک) کاملاً هموژنایز گردید. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و ۳ میلی‌لیتر از محلول رویی برای خواندن شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (UV-Visible مدل JENWAY 6305) استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

استخراج و سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ۰/۱ گرم از اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های گوجه ۴ هفته پس از کشت در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره، با ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیمی با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (pH:7.8) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۱ درصد پودر PVP بر روی یخ در هاون چینی هموژنایز گردید، پس از عمل هموژنایز، عصاره‌های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و محلول رویی حاصل در میکروتیوب‌های جدید و استریل جمع‌آوری گردید. محلول‌های رویی به دست آمده به عنوان عصاره‌های آنزیمی جهت اندازه‌گیری فعالیت ویژه‌ی (بر حسب Unit/mg protein) کاتالاز (CAT) با ضریب خاموشی $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ آسکوربات

پراکسیداز (APX) با ضریب خاموشی $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) استفاده شدند. به منظور حفظ فعالیت آنزیمی، تمامی مراحل استخراج بر روی یخ و اندازه‌گیری فعالیت آن‌ها سریعاً پس از آماده ساختن عصاره‌های آنزیمی صورت پذیرفت. فعالیت کاتالاز در ۱ میلی‌لیتر بافر واکنش به صورت بافر فسفات سدیمی با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH:7) حاوی ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 و ۵۰ میکرومولار عصاره آنزیمی بر اساس روش ابی (Aebi, 1984) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. پس از اضافه کردن H_2O_2 در محلول واکنش سریعاً کاهش جذب ناشی از تجزیه H_2O_2 در اثر فعالیت کاتالاز موجود در عصاره آنزیمی، در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در مدت ۶۰ ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش ناکانو و آسادا (Nakano & Asada, 1981) در ۱ میلی‌لیتر بافر واکنش به صورت بافر فسفات سدیمی با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH:7) حاوی آسکوربیک اسید (۰/۵ میلی‌مولار)، EDTA (۰/۱ میلی‌مولار)، H_2O_2 (۱/۲۵ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرومولار عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. کاهش جذب آسکوربات در اثر فعالیت APX با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری گردید. سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش ژیانوتولیتیس و ریس (Giannotolitis & Ries, 1997) انجام شد. مخلوط واکنش، شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH:7.5)، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH: 10.2)، ال-متیونین ۱۲ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار، نیترو بلو تترازولیوم کلرید ۷۵ میکرومولار و ۳۰۰ میکرومولار عصاره آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض یک سیستم نوری شامل سه لامپ فلورسنت ۳۰ وات و در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار گرفتند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین از یک لوله‌ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بجز عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده گردید. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم می‌گردد و فعالیت ویژه‌ی آن بر حسب Unit/mg protein بیان شد.

استخراج پروتئین و ژل الکتروفورز ۰/۱ گرم از بافت تازه ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای گوجه برای

آزمایش پروتئین استفاده شد. استخراج پروتئین براساس روش امینی و همکاران (Amini *et al.*, 2007) اصلاح شده توسط رستمی و احسانپور (Rostami & Ehsanpour, 2009) با استفاده از بافر استخراج (۵۰ میلی متری تریس-HCl، 1 میلی‌مولار DTT، 2 میلی‌مولار EDTA، 2 میلی‌مولار مرکاپتواتانول، pH: 7.5) انجام شد.

سنجش میزان پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (mg/g FW) بر اساس روش تغییر یافته برادفورد (Bradford, 1976)، با استفاده از پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد، انجام (Olson & Markwell, 2007) و در نهایت آنالیز بیان نسبی پروتئین‌ها در عصاره‌های حاصل از اندام هوایی با غلظت $2/5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ به کمک ژل الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل جداکننده (Separating) ۱۲ درصد و ژل متمرکزکننده (Stacking) 5 درصد مورد بررسی قرار گرفت (Laemmeli, 1970). الکتروفورز به وسیله تانک الکتروفورز ساخت شرکت PEQLAB مدل ۱۶۱۴-۴۵ و با استفاده از مارکر

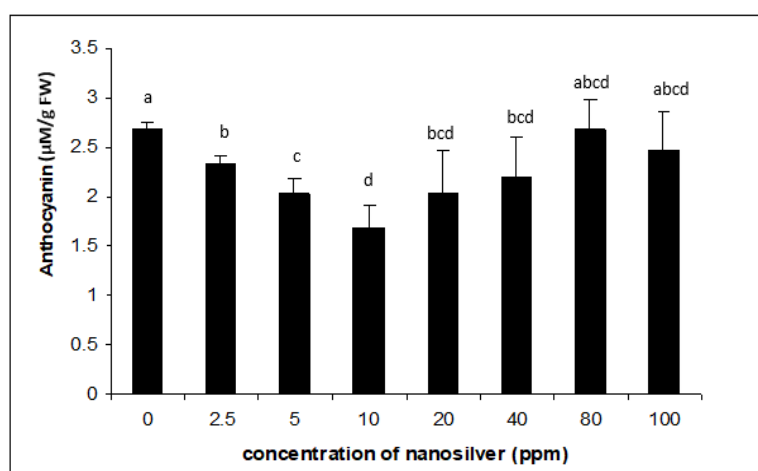
پروتئینی Preotein ladder PLUS PS11 در ۱۳۰ ولت انجام شد. پس از رنگآمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره (Salehi & McCarthy, 2002)، تراکم نسبی باندهای پروتئینی در اندام هوایی توسط برنامه‌ی ImageJ بررسی شد.

آنالیزهای آماری تمام آزمایشات بر اساس یک طرح آماری کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار برای هر آنالیز صورت گرفت. داده‌های حاصل با نرم افزار Sigmastat و تست دانکن آنالیز و نمودارهای مربوط توسط نرم افزار Excel رسم گردید. اختلاف معنی داری تیمارها در سطح $P \leq 0.05$ محاسبه گردید.

نتایج

اندازه گیری سایز نانو ذرات محلول کلوئیدی نانو ذرات نقره پوشش‌دار شده با PVP خریداری شد و به منظور آنالیز سایز و قطر هیدرودینامیکی توسط دستگاه (DLS) dynamic light scattering مورد بررسی قرار گرفت. توزیع اندازه در این محلول کلوئیدی نانو ذرات پوشش‌دار بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر بود.

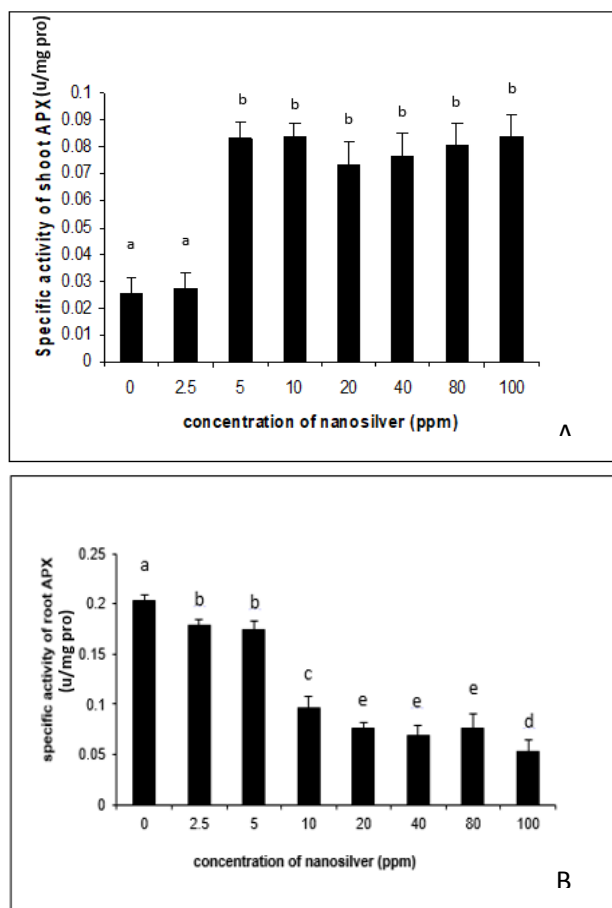
اندازه گیری آنتوسیانین کل نتایج بررسی میزان آنتوسیانین کل نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره از میزان آنتوسیانین کل به طور معنی داری به ویژه در سطح ۱۰ پی‌پی‌ام کاسته شد. با افزایش غلظت نانو ذرات نقره افزایش مجدد این ترکیب مشاهده شد ولی همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است این تغییرات در بیشتر مقایسات معنی دار نبوده است. میزان آنتوسیانین در تیمارهای ۸۰، ۱۰۰ پی‌پی‌ام و شاهد تغییر معنی داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند.



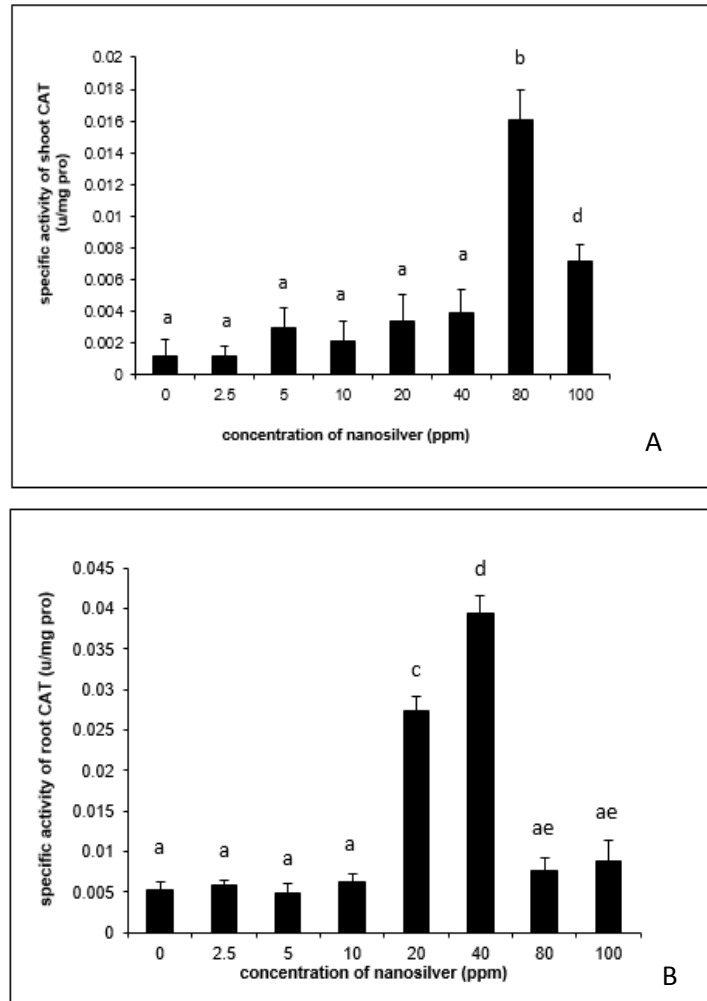
شکل ۱: تأثیر نانو ذرات بر میزان آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این مطالعه فعالیت ویژه آنزیم‌های SOD، CAT و APX به منظور بررسی ظرفیت و تغییرات آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های گوجه در پاسخ به غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره اندازه‌گیری

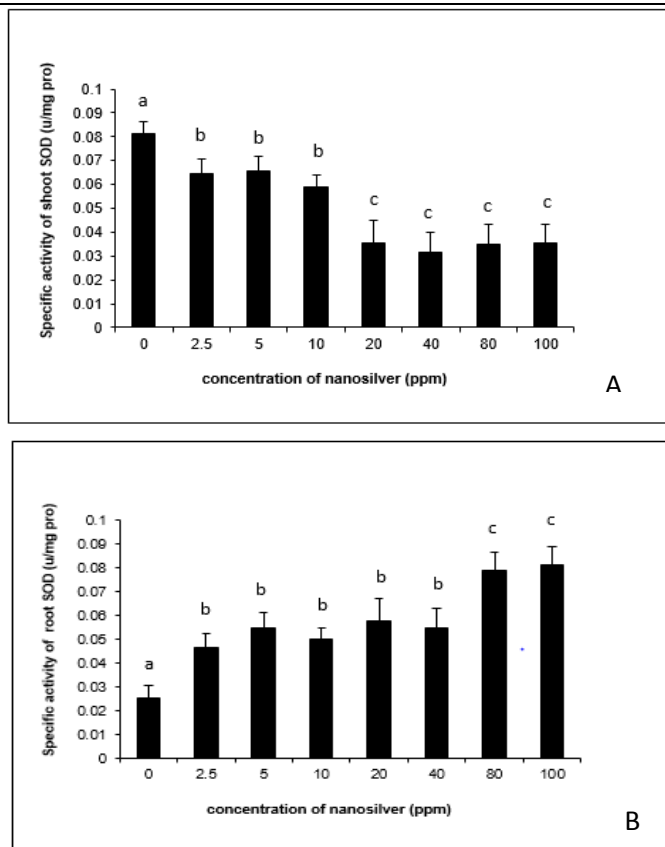
شد. نتایج نشان داد که فعالیت APX در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار به مراتب بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل 2A) در حالی که در ریشه فعالیت این آنزیم تحت تیمار با نانو نقره دچار کاهش معنی داری گردید (شکل 2B). تغییرات القا شده در فعالیت CAT هم در اندام هوایی و هم در ریشه ها در اثر تنش نانو نقره دارای الگوی تقریباً مشابهی بود و با افزایش غلظت نانوذرات افزایش فعالیت CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها مشاهده شد. به طوری که ماکزیمم فعالیت CAT در اندام هوایی در غلظت ۸۰ پی پی ام و در ریشه در غلظت ۴۰ پی پی ام مشاهده گردید (شکل 3A و 3B). فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی با افزایش غلظت نانو نقره تا ۱۰ پی پی ام تغییر معنی داری با شاهد نشان نداد و از غلظت ۲۰ پی پی ام با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت SOD کاهش معنی دار با شاهد پیدا کرد (شکل 4A). در ریشه ها با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD افزایش یافت و در غلظت ۸۰ و ۱۰۰ پی پی ام نانو نقره بیشترین سطح فعالیت این آنزیم در ریشه ها مشاهده شد (شکل 4B).



شکل ۲: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه های گوجه رشد یافته در محیط های کشت MS حاوی غلظت های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).

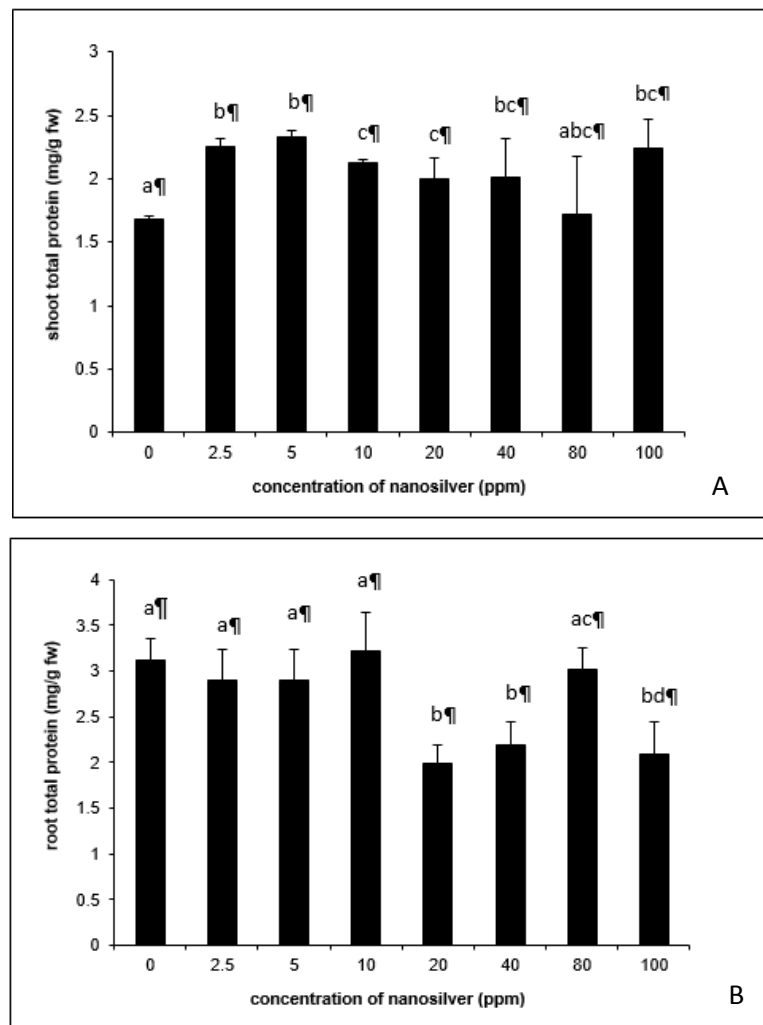


شکل ۳: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های CAT در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

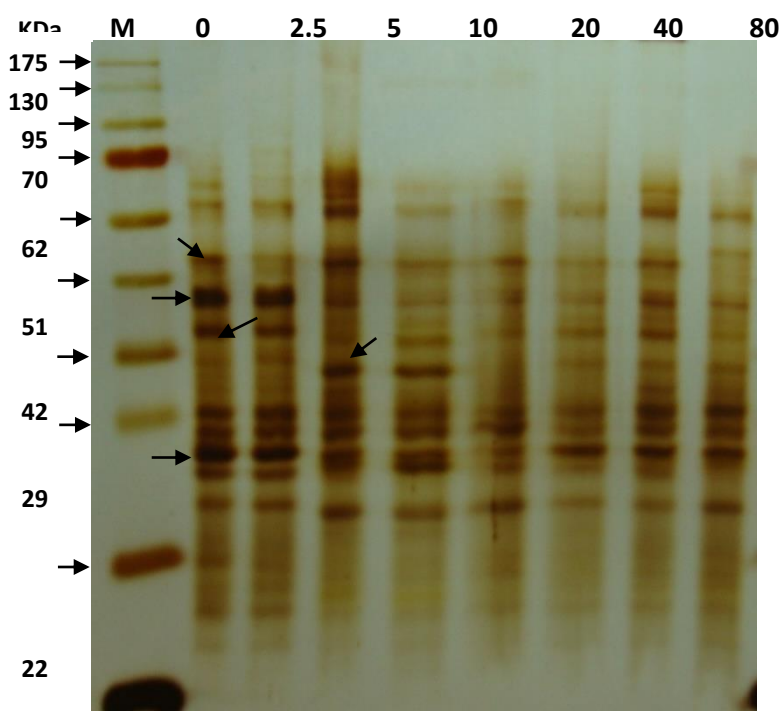


شکل ۴: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های SOD در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

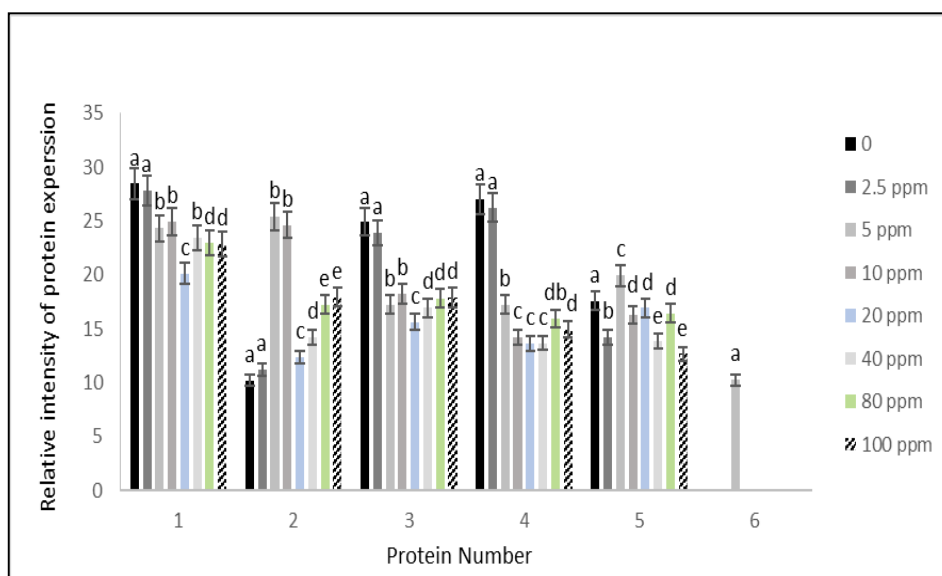
اندازه‌گیری پروتئین محلول کل و الکتروفورز مطالعه پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (FW mg/g) بیانگر افزایش در میزان پروتئین محلول کل اندام هوایی با افزایش غلظت نانو ذرات بود (شکل ۵A)، درحالی‌که در ریشه‌ها میزان پروتئین محلول کل تا غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام نانونقره در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و با افزایش غلظت در ۲۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام پروتئین محلول کل ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۵B). بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها و شدت نسبی باندهای پروتئینی اندام هوایی در روی ژل به صورت کیفی نشان داد که شدت بیان شش باند پروتئینی تحت تیمار با نانو ذرات نقره تغییر نمودند. شدت بیان باندهای پروتئینی با برنامه‌ی ImageJ بررسی شد. نتایج نشان داد که وزن تقریبی ۴۴، ۴۷ و ۲۷ کیلو دالتونی در سطوح بالاتر از ۲/۵ پی‌پی‌ام کاهش داشت، در حالیکه باند ۴۰ کیلو دالتونی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ پی‌پی‌ام نانو نقره و باند ضعیف ۶۸ کیلو دالتونی در غلظت ۵ پی‌پی‌ام نانو نقره القا بیان نشان دادند. همچنین باندی با وزن مولکولی حدوداً ۵۵ کیلو دالتون تغییراتی را در سطوح مختلف نانونقره نشان داد به‌گونه‌ای که بیشترین بیان آن به ترتیب در ۵ پی‌پی‌ام نانو نقره و گیاهان شاهد مشاهده شد و در سایر غلظت‌ها میزان بیان کمتر بود (شکل ۶).



شکل ۵: تأثیر غلظت‌های نانو ذرات نقره بر میزان پروتئین محلول کل در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).



شکل ۶: الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های اندام هوایی گیاهچه‌های گوجه در غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ بر حسب ppm). M: پروتئین مارکر با باندهای پروتئینی با وزن مولکولی مشخص.



شکل ۷: تغییرات شدت نسبی بیان شش باند پروتئینی در اندام هوایی گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ بر حسب ppm). مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانو ذرات نقره، یکی از پرکاربردترین نانو ذرات، بر روی برخی شاخص های فیزیولوژیکی مانند آنتوسیانین کل، الگوی پروتئینی و توان آنتی اکسیدانتی گیاهچه گوجه در شرایط کشت درون شیشه انجام شد. آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب در یک نقطه پایانی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در سیتوپلاسم ساخته شده و به شکل فعال و جداگانه به داخل واکوئل یاخته‌ها با پمپ گلوکاتیون وارد می شوند (Mars *et al.*, 1995). کاهش آنتوسیانین در غلظت‌های ذکر شده می‌تواند به دلیل قرار گرفتن پیش‌ماده آنتوسیانین در مسیر دیگری از سنتز و یا کاهش میزان تنش اکسیداتیو توسط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت باشد. کاهش آنتوسیانین در *Gerbera flowers* با کاربرد ۵ میلی‌گرم در لیتر نانونقره به مدت ۲۴ ساعت گزارش شده است (Danaee *et al.*, 2013). از سوی دیگر همانطور که اشاره شد در برخی از غلظت‌های نانو نقره به خصوص غلظت‌های بالاتر افزایش در میزان آنتوسیانین مشاهده شد که البته در مقایسه با گیاهان شاهد معنی‌دار نبود. مطابق با این نتایج در تحقیق دیگری کاربرد ۰/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر نانونقره (با ابعاد ۱۰ نانومتر) روی گیاه آراییدوپسیس تالیانا در محیط کشت MS پس از یک هفته ۲/۰۵ و پس از دو هفته ۲/۲۹ برابر نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (Qian *et al.*, 2013). به گفته محققین این پژوهش، افزایش ROS در اثر تنش نانونقره باعث افزایش آنتوسیانین شده است. بنابراین در تحقیق حاضر نیز احتمال رخ دادن این پدیده با افزایش غلظت تیمارها ممکن است. آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز هموپروتئین‌هایی هستند که مسئولیت حذف و خنثی‌سازی ROS و برقراری تعادل میان تولید و میزان تخریب آنها را در سلول برعهده دارند. تنش‌های غیر زیستی مختلف در ایجاد تنش اکسیداتیو نقش دارند که منجر به تغییر در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان می‌شود (Hamdia & Shaddad, 2010). نتایج این مطالعه مشخص ساخت که سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان CAT و APX و SOD به صورت مختلف تحت تأثیر نانو ذرات نقره دچار تغییرات گردید. فعالیت APX و CAT گیاهان تنش نانو نقره به مراتب بیشتر از گیاهان شاهد بود. فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی با افزایش غلظت نانوذرات کاهش معنی‌دار با شاهد پیدا کرد. در ریشه‌ها با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD افزایش یافت. تغییر در سطح مولکول‌های آنتی‌اکسیدان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، که به عنوان سیگنال‌هایی برای تحمل یا سازش به شرایط تنشی مطرح هستند، با تحمل به تنش اکسیداتیو نیز مرتبطاند (Lee *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001). تفاوت در میزان آنتی‌اکسیدان می‌تواند به عنوان سیگنالی برای تنظیم مکانیسم‌های جاروب‌کنندگی ROS عمل نمایند (Mittler, 2002). مکانیسم سمیت‌زدایی فلزات توسط بیومولکول‌ها باعث ایجاد پاسخ‌هایی می‌شود از جمله القاء پروتئین‌های شوک گرما، فیتوچلاتین و فریتین‌ها، پروتئین‌های انتقالی یا افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون و پراکسیداز (Prasad, 1977). اتم‌های نقره با اتصال به گروه‌های تیول (-SH) در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در سلول‌ها می‌توانند آنها را

غیر فعال کنند. نقره می تواند در یک عمل کاتالیزوری اکسیداتیو شرکت کند که باعث ایجاد باندهای دی سولفید (R-S-S-R) می شود (Davies & Etris, 1997). نقره ای که کاتالیزور شکل گیری باندهای دی سولفید می باشد احتمالاً می تواند باعث تغییر شکل آنزیم های سلولی شده و متعاقباً باعث تاثیر در عمل آنها شود (Gavanji *et al.*, 2013). از سوی دیگر، اتیلن از طریق تاثیر بر گونه های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن، کاهش دفاع آنتی اکسیدانی را می تواند به دنبال داشته باشد و در نتیجه باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت مرگ سلولی شود (Munne-Bosch *et al.*, 2004). کاهش و افزایش های مشاهده شده در میزان فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی گیاهان در این مطالعه با افزایش تیمار نانو نقره می تواند به دلیل تغییر در اثرات ضد اتیلنی نانو نقره و تغییر در شدت تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه و همراه تنش فلز سنگین) باشد. تحریک تولید ROS در گیاه تحت تیمار نانو نقره گزارش شده است که می تواند باعث تخریب ساختمان کلروپلاست، چربی ها و DNA شود. کاربرد ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نانو نقره (با ابعاد ۱۰ نانومتر) در آراییدوپسیس باعث افزایش تولید آنزیم های آنتی اکسیدان و کاربرد ۳ میلی گرم در لیتر نانو نقره باعث کاهش تولید آنها شد بر این اساس ظرفیت تولید آنتی اکسیدان ها در تنش کم نانو نقره افزایش و با افزایش تنش کاهش پیدا کرد (Qian *et al.*, 2013). همچنین تاثیر نانو نقره با غلظت ۰/۵ تا ۲۵ میلی گرم در لیتر بر روی عدسک (*Lemna minor L.*) به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در غلظت های کمتر و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در غلظت های بیشتر شد (Glavas *et al.*, 2012). فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تحت شرایط تنش بسته به مقاومت گیاه متفاوت می باشد (Bor *et al.*, 2003). کاربرد مقادیر مناسب نانو نقره (با ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر) باعث حفظ فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در شرایط نگهداری در تاریکی در گیاه شمعدانی وارپته های *Foxy* و *Flower fairy* می شود (Hatami & Ghorbanpour, 2013). کاهش مشاهده شده در فعالیت سیستم آنتی اکسیدان تحت تاثیر نانو ذرات می تواند به دلیل تخریب پروتئین های آنزیمی CAT و یا APX به وسیله القاء پروتئازهای درونی در اثر تنش، افزایش سرعت تخریب پروتئین های آنزیمی نسبت به بیوسنتز آن (Feierabend & Engel, 1986)، افزایش میزان رادیکال های آزاد مانند H_2O_2 (Hashemi *et al.*, 2010) و سمیت ناشی از افزایش آنها باشد.

از دیگر عوامل سلولی پاسخ دهنده به تنش های محیطی پروتئین ها و الگوهای بیانی آنها است. پروتئین ها محصولات نهایی مسیرهای اطلاعاتی سلول هستند که در پاسخ به نیازهای سلول در شرایط مختلف ساخته شده و به موقعیت های سلولی مناسب منتقل و در صورت نیاز تخریب می گردند و یا میزان بیانشان تغییر می یابد. گیاهان با قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین گستره ی عظیمی از پاسخ ها را در سطح مولکولی، سلولی و در سراسر گیاه می دهند، این پاسخ ها گهگاه با القاء تغییراتی در میزان بیان برخی ژن ها در گیاه، بر مسیرهای بیوشیمیایی و آنزیمی معمول سلول، روند متابولیسم و در کل چرخه زندگی سلول و گیاه تأثیر می گذارند. بنابراین بررسی تغییرات پروتئین ها و الگوی بیان آنها در مواجهه با فلزات سنگین می تواند در

درک و شنا سایی نقش آنها در ایجاد ساز و کارهای سازشی و مقاومتی گیاه در آن تنش نقش مهمی داشته باشد (Ewais, 1997). تغییرات القاء شده در میزان پروتئین‌های محلول کل حاصل از اندام هوایی و ریشه گیاهان گوجه رشد یافته در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره دارای الگوی متفاوتی بود. تغییرات کمی القاء شده در پروتئین‌های محلول کل ممکن است بازتابی از پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی گیاه گوجه در پاسخ به نانو ذرات نقره در محیط کشت و نیز تنش اکسیداتیو و تجمع گونه‌های فعال باشد که در راستای سازگار سازی گیاه نسبت به تغییر شرایط محیطی‌اش بیان شود. در واریته‌های Flowerfairy و Foxi شمع‌دانی افزایش مقدار پروتئین در تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره (با ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر) که به صورت محلول پاشی روی برگ‌ها برای ۵ روز استفاده شده بود، گزارش شده است (Hatami & Ghorbanpour, 2013). نقش هورمون اتیلن در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی به طور قطع از طریق تأثیر پیام هورمونی اتیلن در هسته و روشن یا خاموش شدن ژن‌های فعال شرکت کننده در آن فرایندها و در نتیجه بروز پاسخ‌های اتیلنی در گیاه است. نقره به عنوان یک باز دارنده فعالیت اتیلن، با مهار درک سیگنال اتیلن توسط گیرنده‌ها بر روند انجام این فرایندها و نحوه بیان ژن‌های درگیر در سطح رونویسی و ترجمه اثر می‌گذارد (Rostami & Ehsanpour, 2010). اتیلن با نقش داشتن در فرایندهای رشد و نمو متعدد، در القاء بیان بسیاری از پروتئین‌ها دخالت دارد (Kader, 1985; Aebels *et al.*, 1988; Cervantes *et al.*, 1994; Dandekar *et al.*, 2004; Kurdoda *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد احتمالاً یون‌های نقره با عملکرد خود در مهار فعالیت و پاسخ اتیلنی بتواند در مهار یا تغییر بیان ژن‌های موثر از اتیلن در سطح ژنوم، رونویسی و ترجمه تأثیر بگذارد. حضور نانو نقره در محیط می‌تواند با تغییر در میزان بیان برخی پروتئین‌ها به صورت کاهش و یا افزایش بیان و یا حتی القاء مهار بیان آنها، تغییراتی را در پروتئین کل سنجش شده صورت دهد. در مطالعه حاضر نانو نقره منجر به ایجاد تغییراتی به صورت افزایش و یا کاهش در شدت بیان نسی برخی باندهای پروتئینی و نیز القاء بیان یک سری از پروتئین‌ها در شرایط تیمار شد که در گیاهان شاهد، بیان آنها مشاهده نگردید. همچنین نتایج نشان داد که حضور نانو نقره در محیط باعث عدم بیان برخی باندهای پروتئینی شد. تغییرات ایجاد شده ممکن است به دلیل آسیب‌های وارده توسط نقره و یا گونه‌های اکسیژن فعال در سطح ژنوم و بیان ژن‌ها (Rotillio *et al.*, 1995; Iokhina *et al.*, 2003) و یا پس از رونویسی و ترجمه به پروتئین‌ها و آنزیم باشد. افزایش بیان مشاهده شده می‌تواند در اثر افزایش سرعت رونویسی و یا ترجمه، کاهش سرعت و میزان تخریب پروتئین‌های مسئول برای پاسخ به تغییرات رخ داده و افزایش طول عمر آنها در سلول در پاسخ به تنش‌ها و تغییر شرایط محیطی باشد. کاهش بیان در پروتئین‌ها احتمالاً می‌تواند ناشی از اثرات بازدارندگی نقره و یا تنش اکسیداتیو پیرو آن بر روی رونویسی و یا فرایند ترجمه باشد. بیان متفاوت پروتئین‌های مختلف به صورت تنظیم مثبت و یا منفی مشخص می‌سازد که یک سیستم پیچیده‌ای برای پاسخ به تنش نقره (در مقیاس نانومتری) در گیاه گوجه وجود دارد. سلول‌های گیاه احتمالاً تحت شرایط تنش فلز سنگین مانند نقره سنتز برخی پروتئین‌های ویژه‌ای را تغییر داده و این تغییرات اعمال شده در سنتز پروتئین‌ها متفاوت است. مطالعه حاضر

نشان داد که سنتز شش باند پروتئینی در اندام هوایی به وسیله نانو نقره تحت تأثیر قرار می‌گیرد. الگوی متفاوت تغییر بیان نسبی این پروتئین‌ها در برابر غلظت‌های به کار رفته نانو ذرات نقره در این مطالعه می‌تواند موید این باشد که احتمالاً این پروتئین‌ها می‌توانند جزء پروتئین‌های حساس و یا مسئول پاسخ به نانو نقره (Nanosilver responsive proteins) و یا پروتئین‌های تنش (Stress proteins) در گیاه گوجه باشند که نقش‌های کلیدی و مهمی را در روند سازش این گیاه در حضور نانو نقره بازی می‌کنند. تغییرات مشاهده شده در شدت باندهای پروتئینی با تکنیک ژل الکتروفورز یک بعدی نشان دهنده دقیق همه تغییرات نیست و لازم است با روش‌هایی مانند ژل الکتروفورز دو بعدی و انجام مطالعات پروتئومیک به نتایج دقیق‌تر و واقعی‌تری از چگونگی پاسخ گیاهان تحت شرایط تنش با نانو نقره دست یافت.

منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Method in Enzymology*, 105: 121-126.
- Amini, F., Ehsanpour, A.A., Hoang, Q.T. and Shin, J.Sh. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(4): 464-471.
- Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K.S., Santosh, P., Kavitha, H.U., Rao, Y. and Satish, S. (2013). Plants: emerging as nano factories towards Facimile route in synthesis of nanoparticles. *Bioimpacts*, 3: 111-117.
- Basra, A. S. and Basra, R. K. (1997). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Pp.1-43. *Hardwood Academic, Amsterdam, Netherlands*.
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S. and Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles or silver ion. *Toxicology Letter*, 208: 286-292.
- Beyer, E.M. (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*, 58: 268-271.
- Beyer, E.M. (1979). Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiology*, 63: 169-173.
- Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, 164: 77-84.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chen, X. and Schluesener, H.J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letter*, 176: 12-1.
- Danaee, E., Naderi, R., Kalatejari, S. and Ladan Moghadam, A.R. (2013). Evaluation the effect of nano silver with salicylic acid and benzyl adenine on longevity of Gerbera flowers. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 3(8): 682-690.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Journal of Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.
- Davies, R.L. and Etris, S.F. (1997). The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today*, 36: 107-114.

- Faunce, T. and Watal. (2010). Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5(4): 617–632.
- Feierabend, J. and Dehne, S. (1996). Fate of the porphyrin cofactors during the light dependent turnover of catalase and of the photosystem II reaction center protein DI in mature rye leaves. *Planta*, 198: 413–422.
- Feierabend, J. and Engel, S. (1986). Photo inactivation of catalase in vitro and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251: 567–576.
- Gavanji, S.h., Abdul Aziz, H., Larki, B. and Mojiri, A. (2013). Bioinformatics prediction of interaction of silver nitrate and nanosilver on catalase and nitrat reductase. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 1(2): 26-35.
- Geho, D.H., Jones, C.D., Petricoin, E.F. and Liotta, L.A. (2006). Nanoparticles: potential biomarker harvesters. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(1): 56-61.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Glavaš Ljubimir K., Radić Brkanac S., Cvjetko P., Vujčić V., Ljubimir S., Pevalek-Kozlina B., (2012). Toxicity of silver nanoparticles in Duckweed (*Lemna minor* L.). *International Conference-Plant Growth, Nutrition and Environment Interactions*, Austrija, Beč.
- Hamdia, M.A and Shaddad, M.A.K. (2010). Salt tolerance of crop plants. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 6(3): 64-90.
- Hashemi, S., Asrar, Z. and Pourseyedi, S. (2010). Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iran Journal Plant Biology*, 2(2): 1-10.
- Hatami, M. and Ghorbanpour, M. (2013). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nano silver application and dark storage, *Turkish Journal of Biology*, 38 (1): 130-139
- Hatami, M. and Ghorbanpour, M. (2013). Effect of nano silver on physiological performance of *Pelargonium* plants exposed to dark storage. *Journal of Horticultural Research*, 21(1): 15-20.
- Jahnke, L.S. and White, A.L. (2003). Long-term hypo saline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1193–1202.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. and Lee, C.B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Phyiology*, 158: 737–745.
- Mars, K.A., Alfenito, M.R., Loyd, A.M. and Valbot, V.A. (1995). Glutathione s-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene bronze-2. *Nature*, 375: 397-400.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7: 405–410.
- Munne-Bosch, S., Penuelas, J., Asensio, D. and Llusia, J. (2004). Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of Holm Oak to heat and drought stress. *Plant Physiology*, 136: 2937-2947.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- Olson, B.J.S.C. and Markwell, J. (2007). *Current protocols in protein science. Detection and Assay Method*. 48: 3.4.1-3.4.29.
- Panyala, N.R., Pena-Mendez, E.M., Havel, J. (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *Journal of Applied Biomedicine*, 6: 117-129.
- Prasad, M. N. V. (1997) *Plant Ecophysiology: Trace Metals*. Pp. 207. In: John Wiley and Sons, New York.
- Qian, H.F., Chen, W., Sheng, G.D., Xu, X.Y., Liu, W.P. and Fu, Z.W. (2008). Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, 88: 301-307.
- Qian, H.F., Hu, H.J., Mao, Y.Y., Ma, J., Zhang, A.P. and Liu, W.P. (2009). Enantioselective phytotoxicity of the herbicide imazethapyr in rice. *Chemosphere*, 76(7): 885-892.
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. and Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25: 1947-1955.
- Quadros, M.E. and Marr, L.C. (2010). Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 60: 770-781.
- Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1): 89-108.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D. and Douce, R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 7805-7812.
- Rostami, F. and Ehsanpour, A. A. (2009). Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* culture. *Malaysian Applied Biology Journal*, 32(2): 49-54.
- Salama, H. M. H. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology*, 3: 190-197.
- Salehi, Z. and McCarthy, J.E.G. (2002). Structure and function of cap-associated proteins in yeast. Ph.D thesis. Department of Biomolecular Sciences, University of Manchester, Institute of Sciences and Technology (UMIST), Manchester, England.
- Schuzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161: 613-619.
- Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
- Wijnhoven, S.W., Peijnenburg, W.J., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I. and Van De Meent, D. (2009). Nano-silver: Available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. [Review]. *Nanotoxicology*, 3: 109-138.

The effect of silver nanoparticles on the antioxidant capacity and total soluble protein pattern in tomato seedlings under *in vitro* culture

R. Razavizadeh*¹

Received: 2018.2.17

Accepted: 2018.8.27

Abstract

In this study, the effects of nanoparticles of silver in concentrations of 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 ppm on physiological parameters such as total anthocyanin, total soluble protein and enzyme activities of Catalase, Ascorbate peroxidase and Superoxide dismutase in tomato seedlings (*Solanum Lycopersicon*) under *in vitro* were evaluated. The results showed that anthocyanin levels in response to the presence of silver nanoparticles decreased significantly to 10 ppm concentration. The total protein soluble protein increased with increasing the concentration of nanoparticles in the shoot and decreased with increasing concentrations at 20 and 40 ppm compared to the control. The intensity of expression of six protein bands treated with silver nanoparticles also changed. Increasing the concentration of nanoparticles in the medium increased the activities of antioxidant enzymes activities in the roots and shoots.

Keywords: Antioxidant enzymes, Nanotechnology, Silver nanoparticles, Total soluble protein.

سطوح فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت‌های عضله و آبشش سه گونه ماهی کاراس طلائی (*Carassius auratus*)، سیاه‌کولی (*Vimba persa*) و زردپر (*Luciobarbus capito*) در سد منجیل

عیسی سلگی^{۱*}، حسن بیگدلی^۲، آرزو سلیمانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۳۱

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی غلظت فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت‌های عضله و آبشش سه گونه ماهی کاراس طلائی (*Carassius auratus*)، سیاه‌کولی (*Vimba persa*) و زردپر (*Luciobarbus capito*) در سد منجیل انجام شد. یافته‌ها نشان داد که بالاترین میانگین غلظت در بافت‌ها و سه گونه ماهیان مربوط به فلز آهن است. در دو گونه کاراس طلائی و سیاه‌کولی، کمترین و بیشترین میانگین غلظت فلزات مورد مطالعه به ترتیب در بافت عضله و آبشش مشاهده شد. همچنین در گونه زردپر بیشترین مقادیر روی و آهن در آبشش و کمترین در عضله، اما برای فلز مس برعکس بود. بافت آبشش به دلیل آنکه جایگاه متابولیسم فلزات است، می‌تواند شاخص خوبی برای آلودگی توسط فلزات سنگین باشد. مقایسه میزان مس و روی در عضله گونه‌های کاراس طلائی، سیاه‌کولی و زردپر با استانداردهای جهانی حاکی از پائین بودن غلظت این دو فلز در مقایسه با حد مجاز استانداردهای جهانی بود. مقایسه میزان آهن در عضله سه گونه از ماهیان سد منجیل استان گیلان با استانداردهای جهانی حاکی از بالا بودن غلظت این فلز در هر سه گونه در مقایسه با استاندارد سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) و پائین بودن آن در هر سه گونه در مقایسه با حد مجاز استاندارد سازمان بهداشت جهانی (WHO) بود.

واژه‌های کلیدی: سد منجیل، فلزات سنگین ضروری، *Vimba persa* *Luciobarbus capito* *auratus* *Carassius*

مقدمه

مصرف آبزیان به دلیل داشتن ترکیبات اسید چرب امگا ۳ و ۶ همچنین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و پروتئین غنی از اسید آمینه‌های ضروری و ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از جایگاه ویژه‌ای در ایران و جهان برخوردار است. سازمان خوار و بار جهانی در سال ۲۰۱۴ مصرف ماهیانه ۵۰۰ گرم ماهی را برای هر انسان ضروری دانسته است و این در حالی است که خطر مصرف ترکیبات سمی نظیر فلزات سنگین از دیرباز یکی از مهمترین دغدغه‌های تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان آبزیان بوده است. ماهی‌ها از موجودات مهم آبی در زنجیره غذایی هستند که در بالای زنجیره غذایی قرار گرفته‌اند، از این‌رو مقادیر بالایی از

۱-دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

* (نویسنده مسئول e.solgi@malayeru.ac.ir; e.solgi@yahoo.com)

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد آلودگی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۳-دانشجوی دکتری آلودگی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

برخی فلزات در بافت‌هایشان تجمع می‌یابد قادرند مقادیر بالایی از برخی فلزات را در بافت‌هایشان تجمع دهند (Mansour & Sidky, 2002). به همین دلیل می‌توانند یکی از مهم‌ترین نمایه‌ها در سیستم آب شیرین جهت برآورد سطح آلودگی باشند (Rashed, 2001; Van Geast, 2010). همچنین، به دلیل ارتباط نزدیک بی‌مهرگان و ماهیان کفزی با رسوبات، فلزات از طریق رسوبات آلوده در بدن ماهی تجمع می‌یابند. این موجودات ارتباط رسوب با سطوح بالاتر غذایی را فراهم می‌کنند. آلودگی فلزات سنگین در رسوب می‌تواند بر کیفیت آب، و نیز در طولانی مدت بر سلامت بشر و اکوسیستم اثر گذارد (Fernandes *et al.*, 2007).

میزان تأثیر فلزات سنگین بر انسان و آبزیان بستگی به غلظت و نوع عنصر دارد. مقادیر اندک برخی فلزات نظیر آهن، روی، کبالت و مس برای فرآیندهای زیستی حیاتی است، اما ضرورت وجود برخی دیگر مانند کادمیوم، جیوه و سرب از نقطه نظر زیستی ناشناخته بوده و حتی مقادیر بسیار کم می‌تواند باعث بروز مسمومیت گردد (عسکری ساری، ۱۳۸۸؛ Canli & Atli, 2002; Bryan, 1976).

مس، روی و آهن مورد مطالعه در این پژوهش جزء فلزات سنگین ضروری بوده و در غلظت‌های پائین برای متابولیسم طبیعی آبزیان ضروری هستند و می‌توانند نقش مثبت یا منفی مهمی را در زندگی انسان ایفا نمایند (Ghaedi *et al.*, 2009). اما افزایش هر یک از این فلزات اثرات سمی را نیز به دنبال داشته و ایجاد آلاینده‌گی می‌کند (Turkmen & Ciminli, 2007; Turkmen *et al.*, 2005). مس از عناصر ضروری برای سوخت‌وساز ماهیان و نیز یک ریزمغذی برای رژیم غذایی انسان به‌شمار می‌آید، اما در غلظت‌های بالا برای ماهیان، ماده‌ای به‌شدت سمی است. مسمومیت ماهیان با این فلز منجر به آسیب سیستم عصبی، تنفسی، کبد و سیستم ایمنی ماهی می‌شود. در اثر این مسمومیت، ابتلا به علائمی نظیر تیرگی رنگ بدن و شنای نامتعادل در ماهیان مشاهده می‌شود و در صورت استمرار تماس ماهیان با غلظت‌های بالای مس، حساسیت آن‌ها به عوامل خارجی از بین رفته و قادر به حفظ موقعیت طبیعی خود نبوده و سرانجام می‌میرند. همچنین این عنصر می‌تواند باعث بروز مسمومیت در انسان شود. شناخته‌شده‌ترین اختلال متابولیکی حاصل از تجمع مس در انسان بیماری ویلسون^۱ است که در آن غلظت سرولوپلاسمین^۲ خون به‌شدت کاهش می‌یابد. به‌علاوه غلظت بالای مس در ماهیان می‌تواند باعث بروز کم‌خونی، بیماری‌های استخوانی و بافت‌های پیوندی و نیز تخریب کبد شود (جلالی‌جعفری و آقازاده مشگی، ۱۳۸۶). ماهیان یکی از منابع سرشار و غنی عنصر روی هستند (WHO, 1995؛ ولایت‌زاده، ۱۳۹۵) که در فرآیندهای زیستی به عنوان محرک یا بازدارنده نقش دارند و به‌صورت هموستاتیک تنظیم می‌شوند. غلظت‌های این عنصر در بافت‌های یکسان از گونه‌های متفاوت ماهیان می‌توانند تغییرات زیادی داشته باشند (جلالی‌جعفری و آقازاده مشگی، ۱۳۸۶؛ عسکری ساری و ولایت‌زاده، ۱۳۹۳). میزان روی برای تجمع طبیعی کلسیم استخوان‌ها،

¹ Wilson

² Ceruloplasmin

انتقال دی‌اکسیدکربن در سلول‌های قرمز خون و برای سنتز و متابولیسم پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک مورد نیاز است (ولایت‌زاده، ۱۳۹۵). آهن یکی از فراوان‌ترین فلزات در پوسته زمین می‌باشد. مهم‌ترین نقش عنصر آهن در بدن ماهیان انتقال اکسیژن در اندام‌های تنفسی است (Jahan et al., 2015). ماهی مهم‌ترین منبع آهن برای کودکان و بزرگسالان است. کمبود آهن سبب کم‌خونی می‌شود و نقش آن در فعالیت‌های بیوشیمیایی بدن نظیر هموگلوبین و سیتوکروم‌ها است (McCoy et al., 1995). اهمیت اندازه‌گیری و سنجش میزان عناصر سنگین در آبزیان به دو مبحث مهم مدیریت و سلامت غذایی انسان باز می‌گردد (ولایت‌زاده، ۱۳۹۵؛ Jordao et al., 2002؛ Romeo et al., 1999). آسیب به سیستم ایمنی، تجمع پلاکت‌ها، کم‌خونی و کاهش فعالیت بیضه و تخمدان از علائم مسمومیت با فلز آهن (اطهر و وهورا، ۱۳۸۶)، دردهای شکم، آسیب به سیستم گوارشی و بافت پوست از علائم مسمومیت با فلز روی است (قنبری و همکاران، ۱۳۹۵).

حسینی و تهامی^۱ (۲۰۱۲)، غلظت دو فلز سرب و کادمیوم را در کبد و عضله ماهی سفید دریای خزر در منطقه محمودآباد و ساری مورد سنجش قرار داده و همزمان مانسرفراد^۲ و همکاران (۲۰۱۲) غلظت فلزات سنگین مس، روی، کادمیوم و جیوه در کبد و عضله ماهی کلمه در طی فصل مهاجرت این ماهیان در سواحل جنوب شرقی دریای خزر را بررسی نمودند. رئیسی^۳ و همکاران (۲۰۱۴) نیز نسبت به بررسی غلظت فلزات سنگین روی، مس، سرب و کادمیوم در نمونه‌های آب، رسوب و اندام‌های مختلف شامل آبشش، عضله، کلیه و کبد ماهیان کلمه، ازون برون، ماهی سفید و کپور معمولی در خلیج گرگان اقدام نمودند.

پژوهش‌هایی که در زمینه آلودگی فلزات سنگین در بوم‌سازگان‌های آبی انجام می‌شوند، از دیدگاه سلامت انسان و بهداشت عمومی بسیار مهم هستند. از طرفی در این پژوهش‌ها حفظ حالت توازن بوم‌سازگان‌های آبی به‌عنوان هدف ثانویه مدنظر است. بنابراین این پژوهش به هدف تعیین میزان غلظت فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت‌های عضله و آبشش سه گونه از ماهیان سد منجیل در استان گیلان صورت گرفت. همچنین برای آگاهی از وضعیت سلامت این ماهیان برای مصرف‌کنندگان، میزان جذب این فلزات در بافت خوراکی عضله با استانداردهای جهانی نظیر وزارت کشاورزی، شیلات و مواد غذایی انگلستان^۴، انجمن بهداشت ملی و تحقیقات پزشکی استرالیا^۵، سازمان بهداشت جهانی^۶، سازمان خواروبار جهانی^۷ و سازمان غذا و دارو آمریکا^۸ مقایسه شد.

¹ Hoseini and Tahami

² Monserfrad

³ Raesi

⁴ Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF)

⁵ National Health and Medical Research Council (NHMRC)

⁶ World Health Organization (WHO)

⁷ Food and Agriculture Organization (FAO)

⁸ Food and Drug Administration (FDA)

منطقه مطالعاتی

سد سفیدرود یا سد منجیل که در ۸۰ کیلومتری جنوب رشت در شهرستان رودبار و در نزدیکی شهر منجیل واقع شده است، این سد که در محل تلاقی دو رود قزل اوزن و شاهرود در نزدیکی شهر منجیل ساخته شده و در سال ۱۳۴۱ به بهره‌برداری رسید و برای تنظیم آب این دو رود برای کشاورزی در دشت گیلان و نیز تولید برق به کار می‌رود. در این پژوهش سه گونه از ماهیان سد منجیل مورد بررسی قرار گرفت، که شامل ۲۸ عدد از گونه زردپر (Guldenstad, 1773) (*Luciobarbus capito*)، ۴۸ عدد از گونه سیاه‌کولی (Linnaeus, 1758) (*Vimba persa*) و ۲۶ عدد از گونه کاراس طلائی (Linnaeus, 1758) (*Carassius auratus*) بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها

تعداد ۱۰۲ عدد ماهی از سه گونه کاراس طلائی، سیاه‌کولی و زردپر از دریاچه سد منجیل در بهار ۱۳۹۶ به‌صورت تصادفی از صید صیادان به‌روش تورپره جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله یخدان حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از تهیه نمونه‌ها، سطح رویی ماهی‌ها به‌طور کامل توسط آب دو بار تقطیر جهت رفع انواع آلودگی‌ها شستشو داده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Staniskiene et al., 2006). برای جداسازی بافت‌ها، ابتدا بافت‌های عضله و آبشش برای هر ماهی به‌طور جداگانه جداسازی و توسط آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت به‌طور کامل خشک گردیدند. بافت عضله ماهی قبل و بعد از خشک شدن توزین گردید و میزان رطوبت بافت اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خشک شده توسط هاون چینی به‌طور کامل پودر گردیدند و سپس در ظروف پلی‌اتیلنی تا شروع مرحله هضم نگهداری شدند (Zhang et al., 2007).

هضم بافت‌ها و سنجش غلظت فلزات سنگین

برای هضم شیمیایی نمونه‌ها، ۲ گرم از بافت عضله و ۱ گرم از بافت آبشش جداگانه وزن شد؛ سپس برای هضم نمونه‌ها از مخلوط اسیدنیتریک (HNO_3) و اسید پرکلریک (HClO_4) استفاده گردید. بدین‌صورت که هر بافت به‌طور جداگانه در بالن قرار داده شد. سپس به نمونه‌های بافت عضله ۱۲ میلی‌لیتر اسیدنیتریک (HNO_3) و ۳ میلی‌لیتر اسید پرکلریک (HClO_4) و به نمونه‌های بافت آبشش ۸ میلی‌لیتر اسیدنیتریک (HNO_3) و ۲ میلی‌لیتر اسید پرکلریک (HClO_4) اضافه شد. نمونه‌ها با کاغذ فیلتر واتمن شماره یک فیلتر شد و سپس محلول صاف شده با آب دیونیزه به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و داخل تیوپ‌های

هضم جداگانه ریخته شد (Lakshmanan *et al.*, 2009). سپس برای اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین ضروری (مس، روی و آهن) از دستگاه جذب اتمی شعله‌ای Analytik jena مدل ContrAA 700 استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از نرمال‌سازی، با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف^۱، مقایسه بین میانگین‌ها در دو بافت عضله و آبشش با استفاده از آزمون t (مستقل) انجام گرفت و از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) برای بررسی تغییرات فلزات سنگین ضروری بین سه گونه و مقایسه بین میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه 22 با سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

میانگین غلظت فلزات و خطای استاندارد مربوط به ماهی‌های جمع‌آوری شده از سد منجیل در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: غلظت فلزات سنگین و خطای استاندارد در بافت‌های عضله و آبشش گونه‌های مختلف ماهی در سد منجیل استان

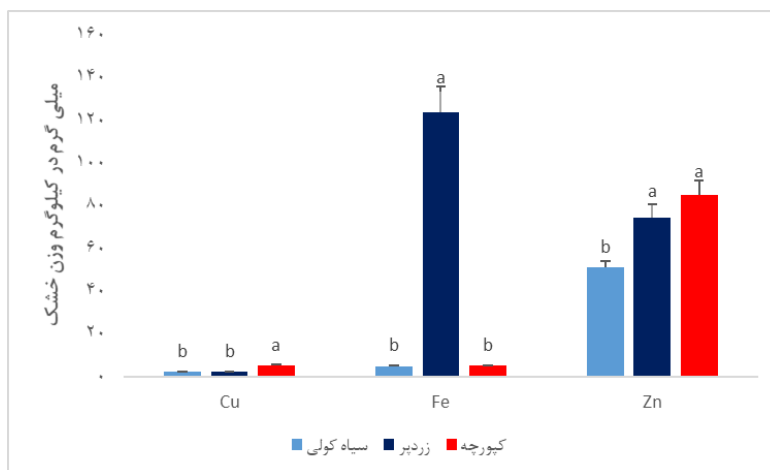
گیلان (غلظت بر حسب میلی‌گرم/کیلوگرم)					
گونه	بافت	مس	روی	آهن	
کاراس	عضله	۱۲/۱۲ ± ۳/۸۹	۵۵/۴۰ ^b ± ۲/۸۹	۱۰۶/۲۶ ^b ± ۱۲/۲۳	
طلائی	آبشش	۱۶/۹۴ ± ۱۱/۷۷	۱۱۴/۷۹ ^a ± ۶/۰۳	۳۷۷/۷۷ ^a ± ۵۷/۳۸	
سیاه‌کولی	عضله	۱۰/۷۸ ± ۲/۲۶	۲۷/۹۲ ^b ± ۰/۶۸	۷۴/۶۳ ^b ± ۶/۴۲	
	آبشش	۱۲/۵۴ ± ۴/۶۵	۷۱/۴۵ ^a ± ۳/۰۴	۳۱۲/۵۷ ^a ± ۴۲/۵۷	
زردپر	عضله	۱۸/۷۴ ^a ± ۴/۳۴	۳۳/۰۶ ^b ± ۱/۳۷	۷۷/۰۵ ^b ± ۸/۰۲	
	آبشش	۶/۲۵ ^b ± ۰/۶۵	۱۰۴/۳۴ ^a ± ۵/۹۲	۱۶۹/۶۹ ^a ± ۱۴/۸۱	

طبق نتایج حاصل از آزمون t مستقل برای دو بافت عضله و آبشش در گونه کپورچه، اختلاف معنی‌دار برای فلز آهن مشاهده گردید که غلظت فلز آهن در آبشش بیشتر از غلظت آن در عضله بوده است. برای فلز روی نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید، به طوری که غلظت روی در بافت آبشش بیشتر از عضله به دست آمد. اما برای فلز مس اختلاف معنی‌دار مشاهده نشده است (جدول ۱). بر اساس یافته‌های برآمده از آزمون t مستقل برای دو بافت عضله و آبشش در گونه زردپر، می‌توان گفت که بین میزان غلظت فلز مس دو بافت اختلاف معنی‌داری وجود دارد و در بافت عضله بیشتر از غلظت آن در بافت آبشش است. برای فلز آهن و روی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید، به طوری که غلظت آن‌ها در بافت آبشش بیشتر از بافت عضله است (جدول

^۱ Kolmogorov-Smirnov

۱). نتایج حاصل از آزمون t مستقل گونه سیاه‌کولی برای دو بافت عضله و آبشش نشان داد که بین میزان غلظت فلز مس دو بافت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در حالی که برای فلزات آهن و روی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد به طوری که غلظت هر دو فلز در بافت آبشش بیشتر از عضله به دست آمد (جدول ۱).

نتایج تجمع فلزات سنگین در سه گونه



شکل ۱: مقایسه غلظت فلزات سنگین ضروری در گونه‌های مختلف ماهیان بومی سد منجیل

*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار یا یکدیگر است.

طبق نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) می‌توان گفت که بین میانگین میزان غلظت فلزات مس، آهن و روی در گونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد. طبق آزمون چنددامنه‌ای دانکن^۱ برای فلز مس می‌توان گفت که میانگین‌های گونه سیاه‌کولی و زردپر با هم برابرند. همچنین طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که گونه کپورچه با دو گونه دیگر در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ اختلاف دارد. طبق نتایج برای فلز آهن می‌توان گفت که میانگین‌های گونه‌های سیاه‌کولی و کاراس طلائی با هم برابرند و گونه زردپر در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با دو گونه اختلاف دارد. برای فلز روی نیز می‌توان گفت که میانگین‌های ۲ گونه، کپورچه و زردپر با هم برابرند. و گونه سیاه‌کولی به‌طور معنی‌دار ۰/۰۵ با دو گونه دیگر اختلاف دارد (شکل ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش اندام عضله ماهی به نسبت نقش مهم در تغذیه انسان و لزوم اطمینان از سلامت آن برای مصرف، آبشش به دلیل نقش آن در تنفس و تعادل اسمزی، به عنوان اندام‌های هدف انتخاب شدند. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که میزان عناصر ضروری به عوامل متعددی بستگی دارد. فلزاتی نظیر آهن، روی و مس در شرایط متفاوت محیطی از راه‌های مختلف جذب بدن ماهی می‌شوند. مهم‌ترین علل وجود اختلاف تجمع فلزات سنگین در اندام‌های مختلف به عوامل محیطی،

^۱ Duncan's multiple range test

شرایط بوم‌شناختی، سن، جنس، اندازه، چرخه زندگی، عادت غذایی، فصل صید، فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب و فعالیت‌های متابولیکی اندام بستگی دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت آهن در سه گونه ماهیان سد منجیل بیشتر از روی و مس است. توزیع غلظت فلزات به ترتیب زیر می‌باشد: مس > روی > آهن. بالا بودن میزان عنصر آهن در بافت آبشش ممکن است به دلیل عملکرد فیزیولوژیک ویژه این اندام در تنفس و تعادل اسمزی باشد (Heath, 1987؛ مکتبی و رومیانی، ۱۳۹۵؛ جاوید گلشن‌آباد و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین نتایج این پژوهش نشان داد میانگین غلظت فلزات سنگین در دو گونه کاراس طلائی و سیاه‌کولی در بافت عضله کمترین مقدار و آبشش بیشترین مقدار است. همچنین میانگین غلظت فلزات سنگین ضروری روی و آهن در گونه زردپر در بافت عضله حداقل و آبشش حداکثر است و برای فلز مس در بافت عضله بیشتر از بافت آبشش است.

بیشترین غلظت در بافت آبشش، مربوط به فلز آهن و بیشترین تجمع عناصر آهن و روی نیز مربوط به بافت آبشش بود که این امر توسط پژوهش‌های دیگر هم تأیید می‌شود (Ossana; et al., 2009; Calza et al., 2004; Bahnasawy et al., 2009; Ozturk et al., 2009؛ جاوید گلشن‌آباد و همکاران، ۱۳۹۴). آبشش‌ها می‌توانند فلزات سنگین را در تماس مستقیم از آب و غیرمستقیم از مواد غذایی جذب نمایند و محل‌هایی برای جذب یون‌های موجود در آب بوده و این می‌تواند بر سطوح فلزات تأثیر بگذارد. سلول‌های اپیتلیال آبشش سبب مبادلات فلزات با محیط خارج گردیده (Ay et al., ۱۹۹۹؛ ریگی و پاکزاد توچایی، ۱۳۹۴)، بدین ترتیب فلزات با موکوس آبشش‌ها تشکیل کمپلکس داده و این خروج فلزات از بافت را تقریباً غیرممکن ساخته و باعث تجمع فلزات در آبشش می‌شود (Bahnasawy et al., 2009؛ ریگی و پاکزاد توچایی، ۱۳۹۴). در مطالعاتی که توسط پاکزاد توچایی^۱ و همکاران (۲۰۱۳)؛ تقوی جلودار^۲ و همکاران (۲۰۱۱)؛ کاماروزمن^۳ و همکاران (۲۰۱۰)؛ فلاحنژاد آستانی و همکاران (۱۳۹۵)؛ جاوید گلشن‌آباد و همکاران، (۱۳۹۴)؛ محمدنبیزاده و پورخیز (۱۳۹۲)؛ پدramزرف و همکاران (۱۳۹۱)؛ عسکری‌ساری و همکاران (۱۳۹۱)؛ بهشتی و همکاران (۱۳۹۱)؛ الصاق (۱۳۸۹)؛ ناصری و رضایی (۱۳۸۷) انجام گرفت، کمترین مقدار غلظت فلزات را در بافت عضله در مقایسه با سایر بافت‌ها از قبیل کبد و کلیه و آبشش نشان دادند.

وجود تفاوت معنی‌دار در بین میزان غلظت عناصر سنگین در گونه‌های مختلف می‌تواند به دلیل کاربرد مدیریتی مختلف، شرایط محیطی، تخلیه‌ی فاضلاب‌ها، وجود کارخانه‌های صنعتی و فعالیت‌های آبی‌پروری در منطقه مطالعاتی باشد. ترکمن^۴ و همکاران (۲۰۰۵)، بیان کردند که غلظت فلزات سنگین در عضله ماهی با توجه به منطقه‌ای که ماهی صید شده است و با توجه به گونه ماهی می‌تواند بسیار متنوع و متغیر باشد. همچنین نشان دادند که بین غلظت فلزات سنگین گونه‌های مختلف ماهیان در مناطق مختلف نمونه‌برداری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

¹ Pakzadtochahi

² Taghavijelodar

³ Kamaruzzaman

⁴ Turkmen

نتایج به‌دست آمده در هر پژوهشی در کنار استانداردها اعتبار پیدا می‌کند. مقایسه میزان فلزات سنگین مس و روی در عضله گونه‌های کاراس طلائی، سیاه‌کولی و زردپر منطقه مورد مطالعه با استانداردهای جهانی حاکی از پائین بودن غلظت این دو فلز در مقایسه با آستانه تمامی استانداردهای جهانی است. مقایسه میزان آهن در عضله ماهی کاراس طلائی، سیاه‌کولی و زردپر سد منجیل استان گیلان با استانداردهای جهانی حاکی از بالا بودن غلظت این فلز در هر سه گونه در مقایسه با آستانه استاندارد سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) و پائین بودن آن در هر سه گونه در مقایسه با حد مجاز استاندارد WHO است. از این رو در این پژوهش، با توجه به بالا بودن میزان آهن در بافت عضلات ماهیان، در مقایسه با استاندارد جهانی FDA و نیز بالا بودن میزان این فلز در بافت عضله گونه کاراس طلائی در مقایسه با استاندارد ملی ایران (که برای فلز آهن: ۱۵؛ مس: ۲۰ و روی: ۵۰ در نظر گرفته شده است)، پیشنهاد می‌شود که استفاده از این سه گونه ماهی در این منطقه، با مراقبت‌های لازم انجام گیرد. همچنین جهت حصول اطمینان از سلامت مصرف سایر آبزیان، باید پایش‌های مداوم تمامی آلاینده‌های محیطی در آب، رسوب و آبزیان سد منجیل، صورت پذیرد و به‌جهت کنترل منابع آلاینده نیز مدیریت مناسب اتخاذ گردد، تا ذخایر آبزیان که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی به‌حساب می‌آیند، دچار صدمات کمتری شوند.

جدول ۲: مقایسه غلظت‌های فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت عضله سه گونه از ماهیان سد منجیل با استانداردهای

بین‌المللی (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر)

منابع	آهن	مس	روی	استانداردها
MAFF, 1995	-	۲۰	۵۰	UK (MAFF)
Darmono & Denton, 1990	-	۱۰	۱۵۰	NHMRC
WHO, 1995; WHO, 1989	۱۰۰	۳۰	۱۰۰	WHO
Sciortino & Ravikumar, 1999	-	۳۰	۵۰	FAO
FDA, 2011	۰/۵	-	۴۰	FDA
پژوهش حاضر	۲۱/۲۵	۲/۴۲	۱۱/۰۸	کاراس طلائی
پژوهش حاضر	۱۴/۹۳	۲/۱۶	۵/۵۸	سیاه‌کولی
پژوهش حاضر	۱۵/۴۱	۳/۷۵	۶/۶۱	زردپر

در جدول ۳ میانگین فلزات سنگین در مطالعات انجام شده در سایر ماهیان با پژوهش حاضر مقایسه شده است. در این پژوهش مقایسه تجمع فلزات مس، آهن و روی در ماهیان مناطق مختلف با گزارشات سایر پژوهشگران مشخص شد که این فلزات در بافت آبشش ماهیان بیشتر تجمع می‌یابند و مانند سایر فلزات مقادیر آنها متفاوت می‌باشد. بافت آبشش در انتقال و دریافت اکسیژن از محیط پیرامون نقش مهمی داشته و نیاز به غلظت بالایی از خون دارد، که به‌دنبال آن نیاز بالایی به فلزات ضروری است. بنابراین افزایش غلظت فلزات ضروری می‌تواند ناشی از نیاز این بافت به این فلزات باشد (پاکزادتوچایی، ۱۳۹۲). بررسیها همچنین نشان می‌دهد که هر تغییری که در میزان تجمع فلز در بافتهای ماهی اتفاق می‌افتد، میتواند از عوامل مختلفی مثل ویژگی خود فلز، بافت و اندام هدف، جنسیت، وزن و سن ماهی، عادات غذایی، مدت زمان در معرض فلز بودن، خصوصیات بومشناختی و شرایط محیطی و همچنین ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی محیط تأثیر ببیند (Chi et al, 2007; Agah et al., 2007);

(Dalman et al., 2006). با توجه به نتایج به دست آمده میتوان گفت که عوامل مختلفی میتوانند در میزان تجمع فلزات در بین بافتهای مختلف دست داشته باشند. همچنین می توان بیان کرد که میزان عناصر ضروری به عوامل متعددی بستگی دارد. فلزاتی نظیر مس، روی و آهن در شرایط متفاوت محیطی از راههای مختلف جذب بدن ماهی می شوند. سطوح مختلف بدن ماهی که در تماس با محیط قرار دارند ممکن است محلی برای انتقال، رسوب و تجمع فلزات سنگین باشند، این سطوح شامل پوست، کبد، کلیه، استخوان، روده و آبشش است. مقایسه میزان غلظت فلز آهن در عضله ماهیان سیاه کولی و زردپر سد منجیل استان گیلان حاکی از پائین بودن غلظت این فلز در هر دو گونه ذکر شده و حاکی از بالاتر بودن آن در بافت عضله گونه کاراس طلائی در مقایسه با آستانه استاندارد ملی ایران است. بنابراین با توجه به بالا بودن میزان آهن در گونه کاراس طلائی می توان نتیجه گرفت که تا حدی استفاده از این گونه در این مناطق خطرناک بوده و بایستی با احتیاط بیشتری مصرف شود و نیز با توجه به نقش و اهمیت عضله ماهی در تغذیه انسانی پیشنهاد می شود که مدیریت بیشتر و بهتری در جهت کنترل منابع آلاینده صورت گیرد تا ذخایر آبریان که به عنوان یکی از منابع مهم پروتئینی است، دچار صدمات کمتری ناشی از عوامل آلاینده شوند. با توجه به یافت شدن آلاینده در بدن این ماهی پیشنهاد می گردد که نمونه برداری زمانی و مکانی بیشتری در سرتاسر دریاچه سد منجیل انجام پذیرد و بر پایه نتایج به دست آمده میزان مجاز مصرف هفتگی ماهی کاراس طلائی تعیین گردد. همچنین، پیشنهاد می گردد در زمینه عناصر ضروری دیگر در منطقه مطالعاتی نیز باید تحقیقات بیشتری انجام گردد.

جدول ۳: مقایسه غلظت های فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت عضله و آبشش سه گونه از ماهیان سد منجیل با سایر مطالعات انجام شده

منابع	بافتهای مورد مطالعه		منطقه مورد مطالعه	گونه ماهی	فلز
	عضله	آبشش			
جاویدگلشنآباد و همکاران، 1394	78/4	94/1	نواحی جنوبی دریای خزر	کلمه ((<i>Rutilus rutilus caspicus</i>)	Cu
فلاحنژادآستانی و همکاران، 1395	04/3	93/1	نواحی جنوبی دریای خزر(بابلسر)	شگماهی ((<i>Alosa braschnikowi</i>)	
قنبری و همکاران، 1396	900/9	620/7	بندر بوشهر	سنگسر معمولی ((<i>Pomadasys kaakan</i>)	
عبیدی و پذیرا، 1397	-	21/7	بندر بوشهر	ماهی قباد ((<i>Scomberomorus guttatus</i>)	
Zeynali et al.,2009	-	95/16	آتلانتیک جنوبی (اسپانیا)	<i>Cipirus carpio</i> (کیپور معمولی)	
Baki et al.,2018	94/16	32/6	Bangladesh	Marine fish	
پژوهش حاضر	54/12	12/12	سد منجیل	کاراس طلائی	
پژوهش حاضر	25/6	78/10	سد منجیل	سیاه کولی	
پژوهش حاضر	-	74/18	سد منجیل	زردپر	
جاویدگلشنآباد و همکاران، 1394	47/1098	07/39	نواحی جنوبی دریای خزر	کلمه ((<i>Rutilus rutilus caspicus</i>)	
فلاحنژادآستانی و همکاران، 1395	15/28	26/14	نواحی جنوبی دریای خزر(بابلسر)	شگماهی ((<i>Alosa braschnikowi</i>)	
قنبری و همکاران، 1396	59/3	07/3	بندر بوشهر	سنگسر معمولی ((<i>Pomadasys kaakan</i>)	
عبیدی و پذیرا، ۱۳۹۷	400/4	620/2	بندر بوشهر	ماهی قباد ((<i>Scomberomorus guttatus</i>)	
Zeynali et al.,2009	-	9/473	آتلانتیک جنوبی (اسپانیا)	<i>Cipirus carpio</i> (کیپور معمولی)	
Baki et al.,2018	77/377	26/10	Bangladesh	Marine fish	
پژوهش حاضر	57/312	6	سد منجیل	کاراس طلائی	
پژوهش حاضر	69/169	63/74	سد منجیل	کاراس طلائی	

پژوهش حاضر	05/77	سد منجیل	سیاه‌کولی
پژوهش حاضر		سد منجیل	زردپر
جاویدگلشن‌آباد و همکاران، 1394	15/189	64/39	کلمه (<i>Rutilus rutilus caspicus</i>)
فلاح‌نژادآستانی و همکاران، 1395	12/20	02/7	شگماهی (<i>Alosa braschnikowi</i>)
قنبری و همکاران، 1396	740/34	710/2	سنگسر معمولی (<i>Pomadasys kaakan</i>)
عبیدی و پذیرا، ۱۳۹۷	-	5	ماهی قباد (<i>Scomberomorus guttatus</i>)
Zeynali et al., 2009	-	-	<i>Cipirus carpio</i> (کیپور معمولی)
Baki et al., 2018	-	05/36	Marine fish
پژوهش حاضر	79/114	9	Bangladesh
پژوهش حاضر	45/71	98/41	سد منجیل
پژوهش حاضر	34/104	5	سد منجیل
پژوهش حاضر		40/55	سد منجیل
		92/27	
		06/33	

منابع

- اطهر، م.، هورا، ش.ب.، (۱۳۸۶) فلزات سنگین و محیط‌زیست. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج. ۱۷۵ صفحه.
- الصاق، ا.، (۱۳۸۹) سنجش میزان تجمع فلزات سنگین در ماهیان سفید (*Rutilus frissi kutum*) و کیپور (*Cyprinus carpio*) دریای خزر. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. ۲۵(۲): ۶۹-۷۷.
- بهشتی، م.، عسکری‌ساری، ا.، ولایت‌زاده، م.، (۱۳۹۱) بررسی غلظت فلزات سنگین در ماهی بیا در رودخانه کارون، استان خوزستان. مجله آب‌وفاضلاب، ۳(۲۳)، ۱۳۳-۱۲۵.
- پاکزاد توچایی، ش.، (۱۳۹۲) بررسی الگوی تجمع فلزات سنگین (Cu، Pb، Ni و Zn) در بافت‌های عضله، کبد، کلیه، آبشش و فلس ماهی کیپور نقره‌ای (*Hipophthalmichthys molitrix*) چاه نیمه‌های سیستان. نشریه علمی پژوهشی اقیانوس‌شناسی، ۴(۱۳): ۲۸-۲۱.
- پدرامزرف، م.، خوشخو، ژ.، خارا، ح.، بابایی، ح.، (۱۳۹۱) اندازه‌گیری غلظت سرب، کادمیوم و مس در بافت خوراکی ماهی به وسیله طیف‌سنجی اتمی شعله. سومین کنگره عناصر کمیاب. دو ماهنامه فیض. ۱۶(۷).
- جاویدگلشن‌آباد، ع.، تقوی‌جلودار، ح.، امجدی، م.، فضلی، ح.، (۱۳۹۴) بررسی غلظت فلزات سنگین (آهن، روی، مس و کادمیوم) در بافت‌های مختلف ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در نواحی جنوبی دریای خزر. نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی، شماره ۱۰۷، ۱۶-۹.
- جلالی جعفری، ب.، آقازاده‌مشکی، م.، (۱۳۸۶) مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین آب و اهمیت آن بهداشت عمومی. انتشارات مان، تهران، چاپ اول، ۱۳۴ ص.
- ریگی، م.، پاکزاد توچایی، س.، (۱۳۹۴) بررسی تجمع فلزات سنگین (سرب، نیکل، مس، آهن و روی) در ماهی سفیدک (*Schizothorax zarudnyi*) چاه نیمه‌های سیستان. فصلنامه علمی پژوهشی محیط‌زیست جانوری. ۷(۱): ۱۷۶-۱۷۱.
- عبیدی، ر.، پذیرا، ع.ر.، (۱۳۹۷) بررسی سطح غلظت فلزات ضروری (مس، آهن و سلنیوم) در بافت‌های عضله، کبد و آبشش ماهی قباد (*Scomberomorus guttatus*) در بندر بوشهر. مجله علمی شیلات ایران. ۲۷(۱): ۱۶۵-۱۷۱.

عسکری ساری، ا. (۱۳۸۸) بررسی عناصر سنگین (سرب، جیوه و کادمیوم) در ماهیان بومی آب شیرین شیریت (*Barbus grypus*) و بیاه (*Liza abu*) صید رودخانه های کارون و کرخه در فصل زمستان. مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، ۱ (۴): ۹۷-۱۰۷.

عسکری ساری، ا.، جواهری بابلی، م.، محجوب، ث.، ولایت زاده، م. (۱۳۹۱) میزان فلزات سنگین (جیوه، کادمیوم و سرب) در عضله ماهی شوریده در بنادر صیادی آبادان و بندرعباس. مجله علمی شیلات ایران، ۱۰۶-۹۹: (۳) ۲۱.

عسکری ساری، ا.، ولایت زاده، م. (۱۳۹۳) فلزات سنگین در آبزیان. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. چاپ اول. اهواز، ایران.

فلاحنژادآستانی، ز.، تقوی، ح.، فضلی، ح. (۱۳۹۵) بررسی فلزات سنگین (روی، مس، کادمیوم و آهن) در بافتهای مختلف شگ ماهی *Alosa braschnikowi* در نواحی جنوبی دریای خزر (بابلسر). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۸ (۴): ۱۵۷-۱۶۴.

قنبری، ف.، پذیرا، ع.ر.، مغانی، س.، عبیدی، ر. (۱۳۹۵) بررسی غلظت فلزات سنگین کادمیوم (Cd) و روی (Zn) در عضله ماهی کفشک (*Brachirus orientalis*) در بنادر بوشهر و عسلویه. مجله زیست شناسی دریا، ۸ (۳۰): ۸۳-۹۵.

قنبری، ف.، پذیرا، ع.ر.، عبیدی، ر.، فروزانی، س. (۱۳۹۶) بررسی تجمع زیستی فلزات سنگین مس، روی، آهن و سلینیوم در بافتهای عضله، کبد و آبشش ماهی سنگسر معمولی (*Pomadasys kaakan*) در بندر بوشهر. مجله علمی شیلات ایران. ۲۶ (۶): ۱۷۱-۱۷۸.

محمدنبی زاده، س.، پورخباز، ع. (۱۳۹۲) بررسی تجمع فلزات سنگین کادمیوم و نیکل در بافتهای ماهی زمینکن (*Platycephalus ndicus*) در تالاب حرا. فصلنامه علوم مهندسی محیط زیست. ۱: ۳۹-۴۴.

مکتبی، پ.، رومیانی، ل. (۱۳۹۵) مقایسه غلظت آهن در اندامهای عضله، کبد و آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در استخر پرورش ماهیان گرم آبی در استان خوزستان. مجله علمی شیلات ایران، ۲۵ (۲): ۱۴۳-۱۳۵.

ناصری، م.، رضایی، م. (۱۳۸۷) اثرات دمای نگهداری به حالت انجماد بر میزان تجمع و پراکنش برخی فلزات در ماهی کفال پشت سبز (*Liza dussumieri*) فصلنامه علوم و صنایع غذایی. ۵ (۲): ۶۷-۵۹.

ولایت زاده، م. (۱۳۹۵) بررسی میزان فلزات سنگین آهن، روی و مس در عضله برخی ماهیان بومی تالاب هورالعظیم، استان خوزستان. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۱۱ (۳): ۱۰۰-۸۸.

Agah, H. Leermakarkes, M. Elskens, M. fatemi, S.M. and Baeyens, W. (2007) total mercury and methyl mercury concentrations in fish from (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species, Journal of Environmental Pollution, 121: 129-136.

Ay, O. Kalay, M. Tamer, L. and Canli, M. (1999) Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the bronchial Na, K-ATPase activity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 62, pp: 160-168.

Bahnasawy, M. Aziz khidr, A. Dheina, N. (2009) Seasonal variations of heavy metals concentrations in mullet, (*Mugil cephalus*) and (*Liza ramada*) (Mugilidae) from Lake Manzala. Journal of Applied Sciences Research, Vol, 5, No,7. pp: 845-852.

Baki, M.A. Hossain, M.M. Akter, J. Quraishi, S.B. Shojib, M.F.H. Ullah, A.K.M.K. Khan, M.F. (2018) Concentration of heavy metals in seafood (fishes, shrimp, lobster and crabs) and human health assessment in Saint Martin Island, Bangladesh. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety. 153-163.

- Bryan G. W. (1976) Some effects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. In: Lockwood A.P.M. (ed.) Effects of pollutants on aquatic organisms. Cambridge University Press. Cambridge, England, 7 p.
- Canli M. and Atli G. (2002) The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Journal of Environmental Pollution*, 121: 129-136.
- Calza, C. Anjos, M.J. Castro, C.R.F. Barroso, R.C. Araujo, F.G. Lopez, R.T. (2004) Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol, 71, pp: 787-788.
- Chi, Q. Zhu, G. and Langdon, A. (2007) Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu lake, China, *Journal of Environmental Science*, 19: 1500-1504.
- Dalman, O. Demirak, A. and Balci, A. (2006) Determination of heavy metals (Cd, Pb) and trace elements (Cu, Zn) in sediments and fish of the southeastern Aegean sea (Turkey) by atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry*, 26: 157-162.
- Darmono, D. and Denton, G.R.W. (1990) Heavy metals concentration in the banana prawn *Penaeus merguensis* and leader prawn *Penaeus monodon* in the Towns vile region of Australia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44:479-486.
- FAO, (2012) "Fishery and aquaculture statistics", Marine fishery, Rome. 100 p.
- Fernandes, C. Fonta'nhas-Fernandes, A. Peixoto, F. Salgado, M.A. (2007) Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 426-431.
- Food and Drug Administration (FDA), (2011) Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Department of health and human service public health food and drug administration center for food safety and applied nutrition of food safety. Fourth Edition, 476 p.
- Ghaedi, M. Shokrollahi, A. Kianfar, A.H. Pourfarokhi, A. Khanjari, N. Mirsadeghi A.S. and Soy lak M. (2009) Pre concentration and separation of trace amount of heavy metal ions on bis (2- hydroxyl acetophenone) ethylendiimine loaded on activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 162:1408-1414.
- Heath, A.G. (1987). *Water pollution and fish physiology*, DRS Press, Boston, USA.
- Hoseini, H. and Tahami, M. S. (2012) Study of Heavy Metals (Pb and Cd) Concentration in Liver and Muscle Tissues of *Rutilus frisii* Kutum, *Kamenskii*, 1901 in Mazandaran Province. *Global Veterinaria*, 9 (3): 329-333.
- Jahan, I. Nur Alam Siddiki, A.K.M. Niamul Naser, M. and Abdus Salam, Md. (2015) Bioaccumulation and Toxicity of Iron Salt on Shingi Fish *Heteropneustes fossils* (Bloch) and its possible impacts on human health. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 18(2): 179- 182.
- Jordao, C.P. Pereira, M.G. Bellato, C.R. Pereira, J.L. and Matos, A.T. (2002) Assessment of water systems for contaminants from domestic and industrial sewages. *Journal of Environmental Monitoring and Assessment*, 79(1): 75-100.
- Kamaruzzaman, B.Y. Ong, M.C. and Rina, S.Z. (2010) Concentration of Zn, Cu and Pb in Some Selected Marine Fishes of the Pahang Coastal Waters, Malaysia. *American Journal App Science*. 7(3): 309-314.
- Lakshmanan, R. Kesavan, K. Vijayanand, P. Rajaram, V. and Rajagopal, S. (2009) Heavy Metals Accumulation in Five Commercially Important Fishes of Parangipettai Southeast Coast of India. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 1: 63-65.

- Linnaeus, C. (1758) *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. Laurentius Salvius: Holmiae.* ii, 824 pp., available online at <http://www.biodiversitylibrary.org/item/10277#page/3/mode/1up>.
- MAFF, (1995) Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of wastes at sea, 1993, Directorate of Fisheries Research, Lowest oft, Aquatic Environment Monitoring Report, No. 44.
- Mansour, S. A. and Sidky. M. M. (2002) Ecotoxicological studies. 3: Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. Pesticide Chemistry Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt. *Food Chemistry*, 78: 15-22.
- McCoy, C.P. Ohara, T.M. Benett, L.W. and Boyle, C.R. (1995) Liver and kidney concentrations of zinc, copper and cadmium in channel fish (*Ictalurus punctatus*): Variations due to size, season and health status. *Veterinary and Human Toxicology*, 37: 11-15.
- Monsefrad, F. Imanpour Namin, J. and Heidary S. (2012) Concentration of heavy and toxic metals Cu, Zn, Cd, Pb and Hg in liver and muscles of *Rutilus frisii kutum* during spawning season with respect to growth parameters. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(4): 825-839.
- Ossana, N.A. Elissa, B.L. and Salibian, A. (2009) Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Environment and Health*, Vol, 3, No,3. pp: 302-309.
- Ozturk, M., Ozozen, G., Minareci, O., Minareci, E., (2009) Determination of heavy metals in fish, water and sediments of Avsar Dam Lake in Turkey. *Iranian Journal of Environment and Health Science*. English, Vol, 6, No,2. pp: 73-80.
- Pakzad Toocheai, S. Righi, M. Rahdari, A. and Karami, R. (2013) A study on concentration of heavy metals (Pb, Ni, Cu, Fe, and Zn) in liver and muscle tissues of loach fish (*Paracobitis rhadinaea*) In Sistan's Chahnimehreservoirs, Iran. *Journal of novel applied sciences*. 8: 644-649.
- Raeisi, S. Sharifi Rad, J. Sharifi Rad. M. and Zakariaei, H. (2014) Analysis of heavy metals content in water, sediments and fish from the Gorgan bay, southeastern Caspian sea, Iran. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(6): 2162-2172.
- Rashed MN. (2001) Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environ Int*; 27(1): 27-33.
- Romeo, M. Siau, Y. Sidoumou, Z. and Gnassia-Barelli, M. (1999) Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Journal of Sciences Total Environment*, 232: 169- 175.
- Sciortino, J.A. and Ravikumar, R. (1999) *Fishery Harbour Manual on the Prevention of Pollution - Bay of Bengal Programme*, Published by FAO, 123 p.
- Staniskiene, B. Matusevicius, P. Budreckiene, R. and Skibniewska, K.A. (2006) Distribution of Heavy Metals in Tissues of Freshwater Fish in Lithuania, *Polish Journal of Environment Study*, 15(4): 585-591.
- TaghaviJelodar, H. SharifzadehBaei, M. Najafpour, S.H. and Fazli, H. (2011) The Comparison of heavy metals concentrations in different organs of (*Liza aurata*) inhabiting in Southern part of Caspian Sea. *World Applied Sciences Journal*. 82: 96-100.

- Turkmen, A. Turkmen, M. TQE, Y. and Akyu, I. (2005) Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, North East Mediterranean Sea, Turkey. *Food Chemistry*, 91: 167-172. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.008.
- Turkmen, M. and Ciminli, C. (2007) Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 103:670-675.
- Van Geast, J. (2010) Bioaccumulation of sediment-associated contaminants in freshwater organism: development and standardization of a laboratory method. Ph.D thesis, University of Guelph, Canada, 232 pp.
- World Health Organization (WHO). 1989. Heavy metals environmental aspects. *Environment Health Criteria*. No. 85. Geneva, Switzerland.
- WHO, (1995) Health risks from marine pollution in the Mediterranean. Part (1) Implications for Policy Markers, 25 p.
- Zhang, Z. He, L. Li, J. Wu, Z. (2007) Analysis of heavy metals of muscle and intestine tissue in fish in Banan section of Chongqing from three Gorges reservoir, China, *Polish Journal of Environmental Study*, 16:949-958.
- Zeynali, F., Tajik, H., Asri, R.S., Meshkini, S., Fallah, A., Rahnama, M., 2009. Determination of Copper, Zinc and Iron levels in Edible Muschel of three Commercial Fish Species from Iranian Coastal water of the Caspian Sea. *Journal of Animal Veterinary Advance*, 8(7), 1285 -1288.

The levels of heavy metals of copper, zinc and iron in muscle and gill tissues of the three species of (*Carassius auratus*), (*Vimba persa*) and (*Luciobarbus capito*) in the manjil dam

E. Solgi^{*1}, H. Bigdeli², A. Solimany³

Received:2018.11.1

Accepted:2019.5.21

Abstract

This research was conducted to investigate the concentration of heavy metals of copper, zinc and iron in muscle and gill tissues of *Carassius auratus*, *Vimba persa* and *Luciobarbus capito* in Manjil dam. The results showed that the highest mean metal concentration in the tissues and the three fish species belonged to iron. In both *Carassius auratus* and *Vimba persa*, the lowest and highest mean concentrations of the studied metals were observed in muscle and gill tissue, respectively. In *Luciobarbus capito*, the highest levels of zinc and iron in the gills and the lowest in the muscle were recorded, and for the copper metal were in reverse. However, Gill tissue can be a good indicator of heavy metal contamination since it is the location of metal metabolism. Comparison of copper and zinc in the muscles of the species of *Carassius auratus*, *Vimba persa* and *Luciobarbus capito*, with global standards indicated the lower concentration of these metals compared to the global standards. Muscle tissue iron content of the three species of Manjil Dam Lake was high compared to the standard threshold of the American Food and Drug Administration (FDA) and low in all three species compared to the World Health Organization (WHO) standard.

Keywords: *Carassius auratus*, Essential Heavy Metals, *Luciobarbus capito*, Manjil Dam, *Vimba persa*.

1. Associate Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran

* (Corresponding Author: e.solgi@yahoo.com; e.solgi@malayeru.ac.ir)

2. MSc student of Environmental Pollution, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran

3. Ph.D student of Environmental Pollution, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran

تأثیر سوپر جاذب نانوکامپوزیت بر میزان مقاومت چمن اسپورت به تنش خشکی

حسین باقری^۱، موسی سلگی^{۲*}، مینا تقی‌زاده^۲، عباس میرزاخانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

چکیده

در این پژوهش تأثیر سوپر جاذب نانوکامپوزیت و تنش خشکی بر خصوصیات رشدی چمن اسپورت بررسی گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و با اعمال دو فاکتور نوع بستر (کود دامی، سوپر جاذب نانوکامپوزیت به همراه کود دامی و ورمی کمپوست به علاوه سوپر جاذب نانوکامپوزیت) و دوره آبیاری (بدون تنش، آبیاری پنج روزه و ۱۰ روزه) در فضای باز اجرا گردید. نتایج نشان داد که تأثیر بستر حاوی نانوکامپوزیت سوپر جاذب بر صفات وزن تر و خشک و عمق نفوذ ریشه معنی دار گردید. تأثیر دوره آبیاری بر صفات وزن تر، وزن خشک، عمق نفوذ ریشه، میزان کلروفیل b ، کلروفیل kl ، هیدرات کربن، نشت یونی معنی دار بود و در دوره آبیاری پنج روزه کیفیت ظاهری چمن حفظ گردید. معنی دار بودن اثر متقابل نوع بستر و فاصله آبیاری در میزان پرولین و کلروفیل a نشانگر افزایش توان عبور چمن از تنش در بستر حاوی نانوکامپوزیت با دوره آبیاری پنج روزه بود.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، تنش فضای سبز، ورمی کمپوست، هیدروژل

مقدمه

بهترین راهکار برای کاهش آلودگی محیط‌های شهری و صنعتی، ایجاد فضای سبز و پارک در این مناطق است. فضای سبز (شامل جنگل‌ها، مراتع، زمین‌های زراعی، باغ‌ها و پارک‌ها) تولید کننده اکسیژن برای تنفس انسان‌ها، حیوانات و سوخت وسایل نقلیه می‌باشند. همچنین فضاهای سبز در کاهش ذرات معلق در هوا نقش بسیار مهمی را بهعهده دارند. فضای سبز باعث کاهش گرد و غبار، تثبیت برخی از مواد سمی و همچنین کاهش تغییرات درجه حرارت هوا و افزایش رطوبت نسبی آن می‌شود (Kafi, 2002).

رزین‌های سوپر جاذب، پلیمرهایی به شدت آب‌دوست هستند که ضمن برخورداری از سرعت و ظرفیت زیاد جذب آب، مشابه آب انبارهای مینیاتوری عمل می‌نمایند و در موقع نیاز ریشه، به راحتی آب و مواد غذایی محلول در آب را در اختیار گیاه

۱- کارشناس ارشد گروه مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۲- دانشیار دانشگاه اراک- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی- گروه مهندسی باغبانی

* (نویسنده مسئول: M-solgi@araku.ac.ir)

۳- استادیار دانشگاه اراک- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی- گروه مهندسی باغبانی

۴- بخش زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران

قرار می‌دهند. مقدار آبی که در خاک ذخیره می‌شود به ظرفیت نگهداری رطوبت خاک نیز بستگی دارد (Roholahi & Kafi, 2009; Solgi et al., 2015). برای کاهش مصرف آب در فضای سبز و به‌خصوص چمن، اولین اقدام، استفاده از گونه‌های کم‌آب می‌باشد. همچنین با به‌کارگیری روش‌های نوین در کاهش مصرف آب در گیاهان موجود و همچنین کمک به عبور گونه‌ها موجود از تنش خشکی ناشی از کم‌آبی، سعی در کاهش مصرف می‌شود. برای این منظور موارد ذیل در دست اقدام است: ۱. کاهش آبیاری تا مرز تنش گیاهان به‌نحوی که گونه‌ها دچار صدمه نشوند و ۲. استفاده از هیدروژل‌ها در بستر کاشت برای نگهداری آب و کاهش تلفات نفوذ عمقی و تبخیر آب.

پس از آبیاری، هیدروژل‌ها آب جذب می‌نمایند و محیط مرطوبی را برای جوانه‌زنی و رشد بذرهای فراهم می‌سازند. همچنین پس از استقرار چمن، میتوان دور آبیاری را طولانی‌تر نمود و در صورت بروز کم‌آبی نیز مدت زمان تحمل گیاهان به کم‌آبی افزایش خواهد یافت. بررسی تحقیقات پیشین نشان داده است که با مصرف ۳۰ گرم در مترمربع سوپرجاذب‌های معمول و تیمار آبیاری دو روزه، چمن خصوصیات مناسب خود را به‌نحو مناسبی حفظ می‌نماید (Sheikhmoradi et al., 2011; Solgi et al., 2015). همچنین پس از بررسی اثر میزان سوپرجاذب بر عملکرد کمی و کیفی چمن مشخص گردید که بهترین تراکم چمن با میزان ۶ گرم بر کیلوگرم خاک سوپرجاذب ایجاد می‌شود و دور آبیاری دو روز نیز تراکم مطلوب‌تری را نسبت به سایر سطوح آبیاری ایجاد می‌نماید. همچنین کیفیت رنگ، تراکم و محتوای کلروفیل کورت‌هایی که دارای سوپرجاذب بودند افزایش داشته است (Aalami et al., 2011).

با توجه به جدی بودن مسئله کم‌آبی در کشور ایران و همچنین نقش کلیدی آب در کشت چمن این پژوهش صورت پذیرفت. این تحقیق به‌منظور ارائه راهکاری برای کاهش مصرف آب در نگهداری چمن بود و بدین منظور به بررسی تاثیر سوپرجاذب نانوکامپوزیت موجود در بستر چمن در گذر از تنش کم‌آبی پرداخته شد. از این رو با بررسی فاکتورهای ظاهری و بیوشیمیایی رشدی چمن به میزان تحمل تنش خشکی و دوره آبیاری مناسب آن دست یافت و بتوان با کاهش مصرف آب در چمن بدون کاهش عملکرد و کیفیت برنامه آبیاری نوینی برای نگهداری چمن اسپورت در مناطق سردسیری ارائه نمود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در پردیس دانشگاه اراک و در طی تابستان ۱۳۹۴ به اجرا در آمد. جهت بررسی تاثیر نانوکامپوزیت سوپرجاذب بر افزایش توان چمن در عبور از دوره‌های تنش خشکی، آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار اجرا گردید. فاکتورها شامل دو فاکتور نوع ترکیب بستر (سه سطح شامل کود دامی، کود دامی به‌علاوه نانوکامپوزیت سوپرجاذب به میزان سی گرم در مترمربع و ورمی‌کمپوست) و دور آبیاری (سه سطح شامل بدون تنش، دوره آبیاری

پنج روزه و ده روزه) بودند. در هر مرحله صفاتی مانند وزن تر، وزن خشک، وزن اندام هوایی، میزان توسعه ریشه، کیفیت پوشش چمن بر اساس ارزیابی "برنامه ملی ارزیابی چمن"^۱ (تراکم، یکنواختی و رنگ)، میزان کلروفیل و میزان پرولین اندازه‌گیری شد. برای اجرای تیمار شاهد ابتدا بستر آماده‌سازی و تسطیح شد و سپس به‌میزان دو سانتی‌متر خاک رس در سطح بستر پخش و بعد از تسطیح یکنواخت، با غلظت صاف گردید، بذر چمن اسپورت با ترکیب ۵۵ درصد لولیوم (*Lolium prene*)، ۱۰ درصد فستوکا (*Festuca spp.*) و ۲۵ درصد پوآ (*Poa pratensis*) (تولید شرکت مومرستیگ^۲ کشور هلند) به‌میزان ۴۰ گرم در مترمربع به‌صورت یکنواخت پاشیده شد و روی بذرها با کود دامی پوسیده و سرند شده به ضخامت ۳-۴ سانتی‌متر پوشانیده شد. در تیمار استفاده از نانوکامپوزیت سوپر جاذب، پس از آماده‌نمودن و مسطح کردن و غلطک‌زنی بستر به‌میزان ۳۰ گرم در مترمربع نانوکامپوزیت سوپر جاذب پخش شد و خاک رس به‌میزان دو سانتی‌متر در سطح بستر پخش و به‌صورت یکنواخت مسطح گردید و بذر چمن اسپورت به‌میزان ۴۰ گرم در مترمربع به‌صورت یکنواخت پاشیده شد و روی بذرها با کود دامی پوسیده و سرند شده به ضخامت ۳-۴ سانتی‌متر پوشانیده شد (شکل ۱).



شکل ۱: آماده‌سازی بستر و کاشت بذر چمن اسپورت

برای اجرای تیمار استفاده از نانوکامپوزیت سوپر جاذب و ورمی‌کمپوست، ابتدا بستر آماده و مسطح گردید و خاک رس پخش و غلطک‌زنی انجام گرفت. پس از توزیع یکنواخت میزان ۳۰ گرم در متر مربع نانوکامپوزیت سوپر جاذب، بذر چمن اسپورت به‌میزان ۴۰ گرم در مترمربع و به‌صورت یکنواخت در سطح بستر پخش گردید و روی بذرها با ورمی‌کمپوست به ضخامت ۲-۳ سانتی‌متر پوشانیده شد. بلافاصله زمین کاشته شده با آب‌پاش‌های دارای منافذ ریز آبیاری شد. پس از یک هفته بذرها سبز شدند و پس از یک ماه، اولین سرزنی انجام گرفت. اولین نمونه‌برداری ۱۵ روز پس از سرزنی صورت گرفت. اولین دوره آبیاری خشکی به‌مدت پنج روز صورت گرفت و طی این مدت چمن مورد آزمایش هیچگونه آبیاری انجام نشد. پس از طی این مدت اندازه‌گیری صفات کیفیت ظاهری بر اساس NTEP انجام شد. برای مشخص شدن محل بلوک‌ها در بستر چمن، پایه‌های قرار داده شد و قالبی فلزی با ابعاد یک متر در یک متر ساخته شد و حین برداشت نمونه‌ها، قالب در پایه‌ها

^۱ NTEP (National turfgrass evaluation program)

^۲ Mommersteeg

مستقر و بدین ترتیب محل بلوک مشخص گردید. همچنین برای اندازه‌گیری صفات ارتفاع اندام هوایی و عمق نفوذ ریشه، قالبی به ابعاد ۱۰ سانتی‌متر تهیه و نمونه‌برداری به کمک آن انجام گرفت (شکل ۲).



شکل ۲: مشخص نمودن محل بلوکهای هر تیمار و نمونه‌گیری

ابتدا با خط‌کش، ارتفاع اندام هوایی و عمق نفوذ ریشه اندازه‌گیری شد و سپس به‌وسیله قیچی، کل اندام هوایی موجود در مربعی به ابعاد ده سانتی‌متر (که به‌وسیله قالب برداشت شده بود) چیده و توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. اندام‌های هوایی مذکور به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از این مدت وزن خشک اندازه‌گیری شده و درصد وزن خشک محاسبه گردید. همچنین به‌منظور مشخص نمودن میزان رطوبت خاک، صد گرم از خاک بستر رشد ریشه وزن و به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و دوباره وزن شد.

برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی نیز نمونه برگ تازه، تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و سریع مراحل مختلف جهت اندازه‌گیری صفات میزان کلروفیل، کارتنوئید، هیدرات کربن، پرولین، نشت یونی و دیگر صفات انجام گرفت و در نهایت با استفاده از داده‌های ثبت شده میزان صفات مذکور محاسبه گردید. چمن سرزنی شد و به مدت ۱۵ روز آبیاری صورت گرفت تا شرایط رشدی متعادل گردد و به‌منظور اعمال دوره آبیاری دوم، آبیاری به مدت ۱۰ روز قطع گردید و پس از طی شدن مدت زمان مذکور، مجدداً صفات ظاهری ارزیابی و سپس به روش قبل نمونه‌گیری صورت گرفت و صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری کلروفیل

به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده گردید. ۰/۰۱ گرم برگ تازه از برگ‌های چمن را با کمک استن ۸۰ درصد در عدم حضور نور ساییده گردید تا کاملاً سفید شوند. عصاره حاصل را درون استوانه مدرج با استن ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس با ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. جذب‌های خوانده شده (A) را در فرمول‌های زیر قرار داده شد و مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم کلروفیل استخراج شده در هر گرم بافت تر برگ محاسبه گردید.

$$\text{Chlorophylla (chl a)} = 12.9A_{663} - 2.9A_{645}$$

$$\text{Chlorophyllb (chl b)} = 12.9A_{645} - 4.68A_{663}$$

$$\text{Total Chlorophyll (Tchl)} = 20.2A645 + 8.02A663$$

در این رابطه، A جذب ثبت شده، A663 میزان جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر، A645 میزان جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر است (Jamali, 2013).

اندازه‌گیری اسید آمینه پرولین

به منظور اندازه‌گیری پرولین از روش بتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) استفاده گردید. از نمونه گیاهی ۰/۵ گرم از بافت تر را توزین کرده و به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک سه درصد افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شده و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. سپس دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل به همراه دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین به علاوه دو میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال در لوله آزمایش ریخته شد و به مدت یک ساعت در بنماری با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در اثر حرارت واکنش بین نین‌هیدرین و اسید آمینه پرولین انجام می‌شود. پس از گذشت زمان مذکور لوله‌ها از بنماری خارج گردیدند و در دمای محیط سرد شدند. سپس به هر لوله آزمایش چهار میلی‌لیتر تولوئن افزوده شد و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند تا کاملاً مخلوط شوند. پس از گذشت ۲-۱ ساعت، دو فاز (فاز آلی صورتی رنگ در بالا و فاز آبی بی رنگ در پایین) در لوله آزمایش تشکیل گردید. از فاز آلی جهت خواندن جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده گردید (Jamali, 2013).

$$X = [(A*B)/C]/(D/5)$$

X: مقدار پرولین بر حسب میکرومول بر گرم، A: مقدار پرولین به دست آمده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر (پیوست ۴)، B: مقدار تولوئن استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر، C: عدد مولکولی پرولین $115/13 \text{ g}/\mu\text{mol}$ و D: مقدار نمونه گیاهی وزن شده بر حسب گرم می‌باشد.

اندازه‌گیری نشت یونی

برای سنجش میزان آسیب به غشا، میزان نشت یونی از روش بنحامد و همکاران (Benhamed *et al.*, 2007) استفاده شد. نیم گرم از بافت سالم و تازه اندام هوایی گیاه را پس از شستشو با آب مقطر درون ظرف شیشه‌ای در پیچ‌دار قرار داده شد و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر یون‌زدایی شده به آن اضافه گردید و به مدت چهار ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها^۱ اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، پس از سرد شدن مجدداً هدایت الکتریکی اندازه‌گیری شده^۲ و میزان نشت یونی بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید (Jamali, 2013):

¹ EC₁

² EC₂

$$100 * (EC_2/EC_1) = \text{درصد نشت یونی}$$

نتایج و بحث

تاثیر نوع بستر و دوره آبیاری بر صفات مختلف چمن اسپورت پس از اعمال تیمارها بررسی شد و نتایج نشان داد که تاثیر نوع بستر بر وزن تر سرشاخه، وزن خشک سرشاخه، درصد وزن خشک، عمق نفوذ ریشه، میزان کلروفیل a و میزان پرولین معنی دار شد. همچنین تاثیر دوره آبیاری بر وزن تر سرشاخه، وزن خشک سرشاخه، درصد وزن خشک، عمق نفوذ ریشه، میزان کلروفیل a، میزان کلروفیل کل، کارتنوئید، پرولین، هیدرات کربن، نشت یونی و کیفیت ظاهری نیز معنی دار گردید و اثر متقابل نوع بستر و دوره آبیاری در صفات درصد وزن خشک، میزان کلروفیل و پرولین معنی دار گردید (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس بررسی اثر نانوکامپوزیت سوپر جاذب و ورمی کمپوست بر میزان مقاومت چمن به تنش خشکی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		وزن تر خشک	وزن خشک	عمق نفوذ ریشه	کلروفیل a	کلروفیل کل	کارتنوئید	پرولین	هیدرات کربن	نشت یونی	کیفیت ظاهری
نوع بستر	۲	۲/۸۳**	۱/۴۵*	۳/۲۲**	۲/۶۶**	ns	۰/۱۸ ns	۶۷/۲**	۱/۲۳ ns	۴۸/۶۴ ns	ns
دوره آبیاری	۲	۴/۸۲**	۳/۰۷**	۱/۸۴**	۳/۶۴**	۰/۴۰*	۴/۱۳**	۳/۸۷**	۴۰۰*	۳۳۴/۸۶**	۱/۰۵۱**
بستر دوره آبیاری	۴	۳/۳۱ ns	۰/۱۸۵	۱/۵۴**	۲/۳۰**	ns	۰/۳۷ ns	۳/۳۴**	۱۵۵ ns	۳۹/۷۷ ns	۰/۰۰ ns
خطا	۱۸	۲/۰۵	۰/۲۷	۱۷/۶	۰/۲۶	۰/۰۷۳	۰/۲۱۵	۴۲/۳۲	۷۲	۲۱/۲۳	۰/۰۰۷
ضریب خطا	۱۸/۵	۱۶/۴۱	۹/۳۲	۲۸/۹۸	۷/۰۰	۱۵/۴۶	۱۶/۹۸	۲۱/۰۶	۲۱/۴۸	۲۰/۴۴	۳/۰۵

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی دار در سطح احتمال پنج درصد، ns: عدم معنی داری

وزن تر سرشاخه

طبق نتایج به دست آمده، بیشترین وزن تر در بستر کود دامی و نانوکامپوزیت حاصل شده است. هر چند وزن تر در بستر کود دامی بیشتر از بستر نانوکامپوزیت و ورمی کمپوست بود ولی تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین وزن تر در شرایط بدون تنش و دوره آبیاری پنج روز بدون آبیاری تفاوت معنی داری نداشتند ولی با افزایش دوره آبیاری، وزن تر تقریباً یک دوم کاهش یافت. بنابراین می توان نتیجه گرفت در صورت بروز تنش آبی می توان آبیاری چمن را تا پنج روز به تعویق انداخت بدون این که تاثیر منفی بر وزن تر داشته باشد.

کاهش مقدار آب نسبی برگ در شرایط تنش خشکی در مطالعات زیادی تایید شده است. در یک بررسی نشان داده شده است که تنش خشکی محتوای آب نسبی دو گونه ی چمن فستوکای آبی و چچم چند ساله را به ترتیب ۲۶ و ۲۵ درصد

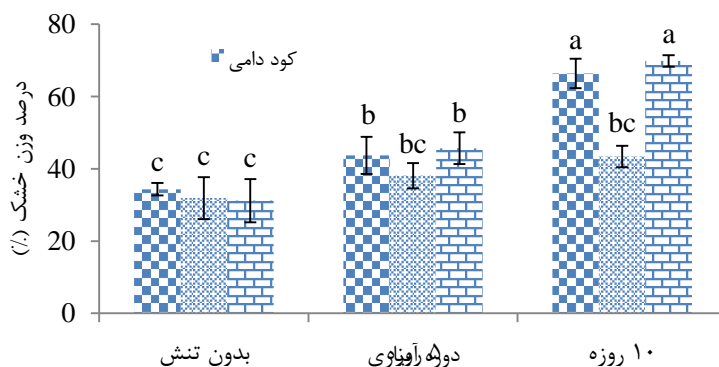
کاهش داده است ((Chai & Jin, 2010). تنش خشکی باعث کاهش رشد در گیاهان می‌شود ولی پلیمرها با کاهش اثر تنش خشکی، مانع این پدیده خواهند شد. تاثیر مثبت ماده اصلاحی ایگیتا^۱ (ماده جاذب رطوبت) بر افزایش نگهداری رطوبت و آب قابل استفاده در خاک و افزایش عملکرد دانه سویا در واحد سطح گزارش شده است که با نتایج این تحقیق منطبق می‌باشد (Karimi, 1993).

وزن خشک سرشاخه

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین وزن خشک در بستر کود دامی به همراه نانوکامپوزیت حاصل شد و وزن خشک در بستر کود دامی و بستر نانوکامپوزیت و ورمی کمپوست تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین وزن خشک در شرایط دوره آبیاری پنج روز به مقدار یک-چهارم بیشتر از شاهد افزایش یافت و تفاوت معنی داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. با افزایش دوره آبیاری، وزن خشک کاهش می‌یابد. میتوان نتیجه گرفت هر چند وزن تر در شرایط بدون تنش و با دوره آبیاری ده روزه تفاوت معنی داری ندارند، ولی با بروز دوره آبیاری پنج روزه، گیاه به منظور مقابله با آن وزن خشک خود را افزایش داده است. نتایج نشان داد که محتوای آب نسبی کنتاکی بلوگراس در شرایط تنش خشکی بین ۲۸ تا ۴۷ درصد کاهش پیدا کرد (Liu et al., 2008). همچنین محققین در تحقیق دیگری نشان دادند که با به کار بردن ۱۵ گرم پلیمر سوپر جاذب در هر کیلوگرم خاک بستر لیزماکیا (*Lizamakhia* sp.)، می‌توان دور آبیاری را تا هفت روز به تعویق انداخت بدون اینکه وزن خشک اندام هوایی تفاوت معنی داری با آبیاری گیاه شاهد (آبیاری به صورت هر دو روز یک بار) داشته باشد، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Mohammadi Torkashvand et al., 2016).

درصد وزن خشک

اثر متقابل نوع بستر و دوره آبیاری بر درصد وزن خشک در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: اثر متقابل نوع بستر و دوره‌های آبیاری بر درصد وزن خشک سرشاخه چمن اسپورت

^۱ Igeta

طبق نتایج به دست آمده، با افزایش میزان دوره آبیاری درصد وزن خشک به دلیل کاهش میزان آب بافت‌های گیاه، افزایش قابل توجهی داشت. ولی در بین انواع بستر به کار برده شده در این پژوهش، بستر کود دامی-نانوکامپوزیت کمترین تغییرات میزان درصد وزن خشک را داشت و این بدین معنی است که بستر مذکور باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش آبی گردیده است. از آنجا که تاکنون صفت درصد وزن خشک در شرایط تنش خشکی گیاه چمن اسپورت و وجود نانوکامپوزیت در بستر دیده نشده از مطالعه مشابه استفاده می‌شود، در گزارشی تاثیر ترینیگزپاک اتیل^۱ را بر "کنتاکی بلوگراس"^۲ تحت تنش خشکی بررسی گردید و در پایان مشخص شد که این تنظیم کننده موجب افزایش محتوای آب نسبی در شرایط خشکی می‌گردد، که منطبق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (Xu & Huang, 2010).

عمق نفوذ ریشه

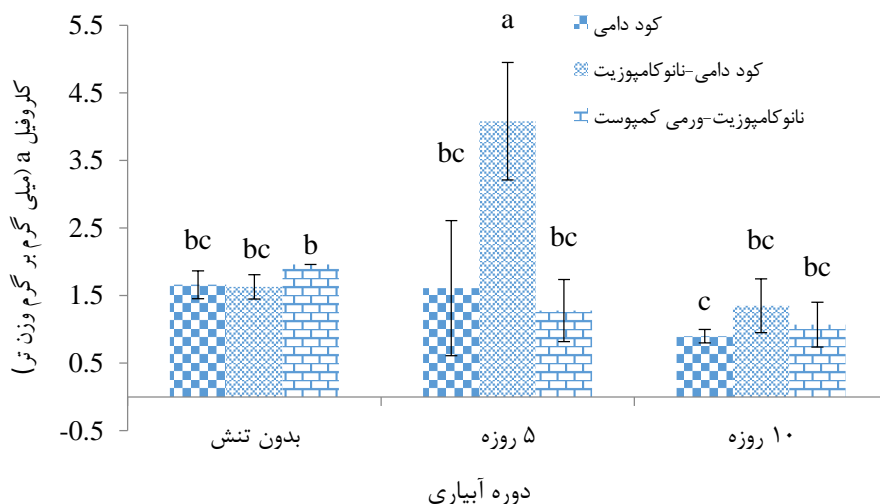
طبق نتایج به دست آمده، بیشترین عمق نفوذ ریشه به مقدار ۸/۶۶ سانتیمتر در بستر کود دامی به همراه نانوکامپوزیت حاصل شد. هر چند نفوذ ریشه در بستر کود دامی اندکی بیشتر از بستر نانوکامپوزیت و ورمی کمپوست بود ولی تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین عمق نفوذ ریشه در شرایط دوره آبیاری پنج روزه و ده روز بدون آبیاری نسبت به شرایط بدون تنش تفاوت معنی‌داری داشتند و این بدین معنی است که طی تنش ریشه‌های گیاه برای دستیابی به آب به اعماق بستر، نفوذ بیشتری داشتند. افزایش ریشه دهی در عمق بیشتر خاک و افزایش وزن خشک ریشه‌ها از مهمترین روش‌های سازگاری برای بهبود کارایی جذب آب تحت تنش خشکی است (Huang & Redman, 1995). مطابق با نتیجه این تحقیق پژوهشگران نشان دادند که فستوکای پابلند (*Festuca arandinaea*) در شرایط تنش خشکی، با افزایش عمق نفوذ ریشه‌های خود به جذب بهتر آب کمک می‌نماید (Huang & Fu, 2001). نتایج روی گیاه چچم نشان داد که وجود آب در دسترس در محیط اطراف ریشه در بسترهای دارای سوپر جاذب، سبب بهبود رشد ریشه شده است که با نتایج تحقیق حاضر، مشابه است (Aalami et al., 2011).

میزان کلروفیل a

اثر متقابل نوع بستر و سطح دوره آبیاری آبی بر میزان کلروفیل a در شکل ۴ نشان داده شده است.

¹ Trinexapac-ethyl

² Kentaky Blue Grass



شکل ۴: اثر متقابل نوع بستر و دوره آبیاری بر کلروفیل a چمن اسپورت

طبق نتایج به دست آمده، با افزایش دوره آبیاری محتوای کلروفیل a به علت کاهش میزان آب بافت‌های گیاه کاهش یافته است. ولی در بین انواع بستر به کار برده شده در این پژوهش، بستر کود دامی-نانو کامپوزیت طی دوره آبیاری پنج روزه بر میزان کلروفیل a تاثیر افزایشی داشته است که بیشترین میزان افزایش در این مدت مربوط به بستر کود دامی-نانو کامپوزیت به مقدار ۴/۰۸ میلی گرم در گرم می باشد. حتی در دوره آبیاری ده روزه نیز میزان کلروفیل a در این نوع بستر نسبت به دو بستر دیگر بیشتر بود. در نتیجه این بستر در طی تنش تاثیر بارزی بر حفظ کلروفیل a داشته است.

مقدار کلروفیل به عنوان یک معیار بسیار مفید همواره برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک گیاه مورد توجه قرار میگیرد. محتوای کلروفیل در گیاهان زنده را یک عامل مهم جهت تعیین ظرفیت فتوسنتزی دانسته‌اند (Jiang & Huang, 2001). فتوسنتز به دو شکل تحت تاثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. در یک بررسی نشان دادند که تیمارهایی که در بستر آنها سوپرچادب به میزان ۳۰ گرم در متر مربع به کار برده شده بود توانستند میزان کلروفیل خود را به نحو مطلوبی حفظ نمایند، این مسئله بیشتر در دور آبیاری دو روز یک بار با کاربرد ۳۰ گرم سوپرچادب مشاهده گردید هر چند در دور آبیاری‌های بیشتر صدمه به کلروفیل گزارش شد (Sheikhmoradi *et al.*, 2011). نتایج این تحقیقات با دستاوردهای تحقیق حاضر منطبق است.

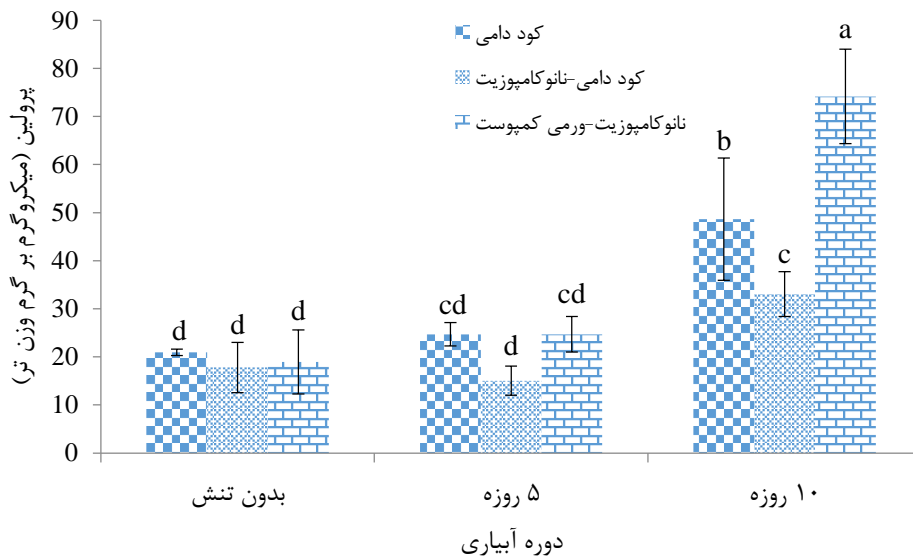
طبق نتایج به دست آمده، بیشترین میزان کلروفیل کل در دوره آبیاری پنج روزه (۱/۹۷ میلی گرم بر گرم) به دست آمد. گیاه در شرایط تنش کوتاه مدت سعی بر حفظ شرایط زیستی داشته و اقدام به افزایش تولید کلروفیل می‌نماید. ولی دوره آبیاری ده روزه باعث کاهش معنی‌دار سطح کلروفیل به مقدار ۱/۵۵ میلی گرم بر گرم گردیده است. تنش خشکی سبب فعالیت بیشتر آنزیم کلروفیلاز و همچنین افزایش سنتز برخی از مواد تنظیم کننده رشد مانند اسید آبسزیک و اتیلن می‌شود که به تخریب و کاهش میزان کلروفیل در برگ‌ها منجر شده، شدت رنگ کاهش یافته و به دنبال آن تثبیت کربن فتوسنتزی نیز کاهش پیدا

می‌کند (Huang *et al.*, 2008). در گزارش با افزایش خشکی کامل خاک در کشت کنتاکی بلوگراس و فستوکای بلند میزان کلروفیل برگ کاهش پیدا کرد که مطابق با شرایط تحقیق حاضر می‌باشد (Bai & Jiang, 2009).

طبق نتایج به دست آمده، بیشترین میزان کارتنوئید در دوره آبیاری پنج روزه به میزان ۳/۵۸ میلی‌گرم بر گرم به دست آمده است و در شرایط بدون تنش میزان کارتنوئید، بیشتر از شرایط ده روزه آبیاری می‌باشد ولی تفاوت معنی‌داری نداشتند. گیاه در شرایط تنش کوتاه مدت اقدام به افزایش تولید کارتنوئید نموده است. محققین گزارش کردند که گونه‌ی گیاهی که بتواند کارتنوئید بیشتری داشته باشد در تنش اکسیداتیو ناشی از تنش آبی دفاع موثرتری خواهد داشت و در مقابل تنش آبی تحمل بیشتری از خود نشان خواهد داد (Foyer *et al.*, 1998). افزایش میزان کارتنوئید بیانگر توان بیشتر گیاه برای عبور از تنش پنج روزه می‌باشد.

پرولین

اثر متقابل نوع بستر و سطح دوره آبیاری بر پرولین در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵: اثر متقابل نوع بستر و سطح دوره آبیاری بر پرولین چمن اسپورت

طبق نتایج به دست آمده، با افزایش دوره آبیاری، پرولین به‌منظور کاهش اثرات تنش در بافت‌های گیاه افزایش یافت ولی در بین انواع بستر به کار برده شده در این پژوهش، چمن کاشته شده در بستر کود دامی-نانوکامپوزیت طی دوره آبیاری پنج روزه، میزان پرولین کاهش یافت که به دلیل کاهش اثرات تنش توسط نانوکامپوزیت می‌باشد. در بستر کود دامی و بستر

نانوکامپوزیت-ورمی کمپوست، میزان پرولین در دوره آبیاری پنج روزه نسبت به شرایط بدون تنش افزایش کمی داشتند و همچنین در دوره آبیاری ده روزه میزان پرولین در بستر نانوکامپوزیت-کود دامی افزایش کمتری نسبت به سایر بسترهای استفاده شده داشت. در نتیجه این بستر در طی تنش تاثیر بارزی بر جلوگیری از ایجاد تنش در گیاه چمن اسپورت داشته است. پرولین یک ترکیب تنظیم کننده اسمزی است که نقش عمده‌ای در مقاومت اسمزی ایفا می‌کند (Demir, 2000). نتایج گزارش‌ها نشان داده‌اند که تجمع پرولین و کربوهیدرات‌های محلول جهت تنظیم اسمزی در زمانی روی می‌دهد که پتانسیل آب بیش از یک مگاپاسکال کاهش یابد (Pessarkli, 1999). همچنین تحقیقات نشان داده است که با مصرف ۴۰ گرم سوپر جاذب در مترمربع بستر، میتوان چمن را با دور شش روزه آبیاری نمود بدون این‌که پرولین تغییرات معنی‌داری داشته باشد (Khalili Darini *et al.*, 2015)، که کاهش تغییرات پرولین در صورت وجود سوپر جاذب در بستر گیاه چمن اسپورت با نتایج تحقیق حاضر منطبق می‌باشد.

هیدرات کربن

طبق نتایج به دست آمده، کمترین میزان هیدرات کربن در دوره آبیاری پنج روزه (۳۱/۸۹ میکروگرم در میلی لیتر) به دست آمد. گیاه در شرایط تنش کوتاه مدت بر اثر تنش، هیدرات کربن کمتری تولید می‌نماید ولی در شرایط تنش طولانی و برای کاهش اثرات تنش و کمک به حفظ تعادل اسمزی بافت، اقدام به ذخیره نمودن هیدرات کربن در بافت‌ها می‌نماید. در مطالعه‌ای روی دو رقم حساس و مقاوم گندم "دوروم" (Dorum) مشاهده شد که افزایش هیدرات کربن محلول در رقم مقاوم به خشکی در مقایسه با پرولین شاخص مناسب‌تری برای نشان دادن پتانسیل مقاومت به خشکی است. زیرا پرولین تحت تنش خشکی کمتر افزایش یافت و میزان افزایش آن در هر دو واریته حساس و مقاوم یکسان بود (Kameli & Losel, 1993)، که مشابه نتایج این تحقیق می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده، هر چند میزان نشت یونی در دوره آبیاری پنج روزه به مقدار بسیاری کمی نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافته است ولی اختلاف معنی‌داری نداشتند. در تنش طولانی مدت و بر اثر بروز آسیب در غشا سلول، نشت یونی تا حدود چهار برابر افزایش یافته است. پژوهشگران نشان دادند که با پیشرفت تنش، نشت یونی افزایش پیدا کرد (Kao, 1981). کمتر بودن مقدار نشت الکترولیتی بر پایداری غشای سلولی و مقاومت بهتر گیاه در برابر تنش وارده دلالت دارد، هر چند که گونه‌ها و ارقام گراس‌های چمنی نسبت به کاهش آب، سطوح تحمل متفاوتی دارند اما هیچ یک نمی‌توانند در شرایط خشکی طولانی مدت، زنده بمانند و با کاهش میزان آبیاری نشت یونی در گراس‌ها افزایش می‌یابد (Huang & Fu, 2001). نتایج تحقیقات ذکر شده، با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد.

کیفیت ظاهری

طبق نتایج به-دست آمده، با افزایش دوره آبیاری ده روزه، کیفیت ظاهری نسبت به شاهد و دوره آبیاری پنج روزه کاهش یافت، ولی تغییرات کیفیت ظاهری در دوره آبیاری پنج روزه نسبت به شرایط بدون تنش تفاوت نداشت که بیانگر حداقل تاثیرات تنش در حضور نانوکامپوزیت سوپر جاذب در بستر گیاه چمن اسپورت می‌باشد.

نشان دادند که چمن پوآ در شرایط تنش خشکی کاهش رنگ پیدا کرد که میزان کاهش رنگ در نمونه‌های حساس به خشکی زودتر اتفاق می‌افتد (Wang *et al.*, 2001). همچنین در آزمایشی روی فستوکا گزارش گردید که کاربرد تنظیم کننده‌های رشد در غلظت مناسب سبب بهبود تراکم و کیفیت چمن‌ها می‌شود (Jack Johnson, 1993). بر اساس تحقیق دیگری کیفیت ظاهری بر اساس NTEP با مصرف میزان ۳۰ گرم سوپر جاذب در مترمربع بستر چمن، در شرایط دور آبیاری یک روزه و دو روزه تفاوت معنی‌داری نداشته است (Khalili Darini *et al.*, 2015). همچنین مطابق با همین نتایج نشان داده شد که کاربرد پاکلوبوترازول در غلظت مناسب، سبب بهبود تراکم چمنهای فصل سرد می‌شود (Razmjoo *et al.*, 1089).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به بررسی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی چمن اسپورت که در بستر آن از کود دامی، نانوکامپوزیت سوپر جاذب-کود دامی و همچنین نانوکامپوزیت-ورمیکمپوست استفاده شده بود و بعد از اعمال دوره‌های بدون تنش، پنج روزه و ده روزه آبیاری، مورد ارزیابی قرار گرفت، درمی‌یابیم که اثر متقابل استفاده از نانوکامپوزیت سوپر جاذب به میزان ۳۰ گرم در مترمربع بستر به همراه کود دامی در چمن اسپورت، باعث افزایش توان چمن در عبور از دوره آبیاری پنج روزه ضمن حفظ صفات مطلوب گردید. به نحوی که صفات مورد ارزیابی قرار گرفته بعد از اعمال دوره آبیاری پنج روزه کمترین تفاوت را با شرایط بدون تنش داشتند. در افزایش صفات وزن تر، وزن خشک و عمق نفوذ ریشه بستر دارای نانوکامپوزیت سوپر جاذب تاثیر بیشتری داشت. صفات وزن تر، وزن خشک، عمق نفوذ ریشه، میزان کلروفیل کل، میزان کارتنوئید، میزان هیدرات کربن، نشت یونی و کیفیت ظاهری چمن بر اثر دوره آبیاری پنج روزه، نتایج مطلوب تری داشتند. همچنین در صفات درصد وزن خشک، میزان کلروفیل و میزان پرولین، اثر متقابل نوع بستر و م دوره آبیاری، بیانگر مطلوب بودن میزان این صفات در بستر نانوکامپوزیت سوپر جاذب و دوره آبیاری پنج روزه می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق به عنوان بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۹۴/۴۸۲۶ مورخ ۱۳۹۴/۴/۲۴ معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک می‌باشد که بدی‌نوسیده از همکاری ایشان تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

- Aalami, M., Tehranifar, A., Davarinejad, Gh. and Selahvarzie, Y. (2011). Effect of Hydrogel, Paclobutrazol and Irrigation Intervals on Qualitative Characteristics of Turf grass (*Lolium perenne* cv. Barbal) in Mashhad Climate. *Journal of Horticulture Science*, 25(3): 288-295. (In Persian).
- Bian, S. and Jiang, Y. (2009). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, 120: 264-270.
- Chai, Q., Jin, F., Merewitz, E. and Huang, B. (2010). Growth and physiological traits associated with drought survival and post-drought recovery in perennial turfgrass species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135: 125-133.
- Demir, Y. (2000). Growth and proline content of germinating wheat genotypes under ultraviolet light. *Turkish Journal of Botany*, 24: 67-70.
- Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. and Becker, T.W. (1998). Drought induced effects on reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology*, 117: 283-292.
- Huang, B. and Fu, J. (2001). Growth and physiological responses of tall fescue to surface soil drying. *International Turfgrass Society Research Journal*, 9: 291-296.
- Huang, B. and McCann, S.E. (2008). Turfgrass Drought Physiology and Irrigation Management. In: M. Pessarikli (Ed), *Handbook of Turfgrass Management and Physiology*, 431-446. Pp. CRC Press.
- Hung, I. and Redman, R.E. (1995). Solute adjustment to salinity and calcium supply in cultivated and wild barley. *Plant Nutrition Journal*, 18: 1371-1389.
- Jack Johnson, B. (1993). Response of tall Fescue to Plant Growth Regulators and Mowing Frequencies. *Journal of Environmental Horticulture*, 11(4): 163-167.
- Jamali, F. (2013). Effect of Zinc Treatment on the Alleviation of salinity stress in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). PhD Thesis, Arak University (In Persian).
- Jiang, Y. and Huang, N. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41: 436-442.
- Kafi, M. (2002). Management of Establishment and Maintaining of Turfgrass. Shaghayegh Roosta Press, 230 pp. (In Persian).
- Kameli, A. and Losel D.M. (1993). Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. *New Phytology*, 125: 609-614.
- Kao, C.H. (1981). Senescence of rice leaves. VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turfgrass and water-stressed excised leaves. *Plant and Cell Physiology*, 22: 683-685.
- Karimi, A. (1993). The investigation of Igita on some physical characteristics of soil. PhD Thesis, Tehran University (In Persian).
- Khalili Darini, A., Naderim, R., Khalighi, A. and Taheri, M. (2015). Effect of Superabsorbent Polymer on Lawn under Drought Stress Condition. *Agriculture Science Development*, 4(2): 22-26.

- Liu, J., Xie, X., Du, J., Sun, J. and Bai, X. (2008). Effects of simultaneous drought and heatstress on Kentucky bluegrass. *Scientia Horticulturae*, 115: 190–195.
- Mohammadi Torkashvand, A., Sedaghat Hoor, S. and Jamalpour, H. (2016). Effects of Some Organic Matter and an Artificial Moisture Absorbent on Soil Available Water, Delay of Permanent Wilting Point and the Growth of *Lysimachia nummularia* cv. Aurea. *Journal of Water and Soil Science*, 20(75): 87-99. (In Persian).
- Pessarkli, M. (1999). *Hand book of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker Inc. pp. 697.
- Razmjoo, K., Imada, T. and Miyairi, J. (1989). Effect of paclobutrazol pp333 growth regulator on growth and quality of cool_season turfgrasses. *Journal Sport Turf Research*, 70: 126-132.
- Roholahi, I. and Kafi, M. (2009). Effects of new managements of landscapes on managing water resources nad environmental stresses. Fourth conference of Regional Agricultural Ideas (In Persian).
- Sheikhmoradi, F., Arji, I., Emaeli, A. and Abdosi, V. (2011). Evaluation the Effects of Cycle Irrigation and Super Absorbent on Qualitative Characteristics of Lawn. *Journal of Horticulture Science*, 25(2): 170-177. (In Persian).
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plant to water deficit and desiccation. *New Phytology*, 125: 27-58.
- Solgi, M., Taghizadeh, M., Bagheri, H. and Mirzakhani, A. (2015). The Evaluation Effects of New Bedding Culture on Growth Factors in Temperate Turfgrass. The first conference on the sustainable development of urban green space. Tabriz, Iran.
- Wang, D., Shannon, M.C. and Grieve, C.M. (2001). Salinity reduces radiation absorbtion and use efficiency in soyabean. *Field Crop Research*, 69: 267-277.
- Xu, C. and Huang, B. (2010). Effect of trinaxapac-ethyl foliar application on grass leaf proteome under drought stress. *Turfgrass Establishment and Management*, 131: 127-135.
- Zhu, J.K. (2001). Over expression of a delta pyrpline-5-carbohydrate synthetase gene and analysis of tolerance of water and salt stress in transgenic rice. *Trends in Plant Science*, 6: 66-72.

The effect of superabsorbent nanocomposite on drought stress resistance in sport turfgrass

H. Bagheri¹, M. Solgi^{2*}, M. Taghizadeh², A. Mirzakhani³

Received:2018.5.4

Accepted:2018.12.25

Abstract

In the present research, the effect of superabsorbent nanocomposite and drought stress was investigated on growth characteristics of sport turfgrass. This experiment was carried out based on a completely randomized design with three replications and two factors by applying a type of bed (manure, manure plus superabsorbent nanocomposite and vermicompost plus superabsorbent nanocomposite) and irrigation period (no stress, 5-day and 10-day) in the farm. Shoot and root height, fresh and dry weight, chlorophyll content, root penetration depth, carbohydrate, chlorophyll, proline, carotenoid and ion leakage contents were measured in this experiment. The results showed that the bed containing nanocomposite superabsorbent was significant on fresh weight, dry weight and root penetration depth. The effects of irrigation period were significant on fresh weight, dry weight, root penetration depth, chlorophyll b, chlorophyll, carbohydrate, electrolyte leakage and quality (NTEP). The quality was maintained in five-day irrigation period. The interaction between bed and the irrigation period was significant for proline and Chlorophyll which indicating the tolerance of five-day irrigation period in the bed containing superabsorbent nanocomposite.

Key Words: Hydrogel, Irrigation, Landscape, Stress, Vermicompost.

1- MSc of Horticultural Science, Department of Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.

2- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.

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

3- Horticulture Crops Research Department, Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran

مقایسه روش‌های مختلف تانن‌زدایی برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) و اثر آنها بر

ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون تنی

بهزاد امیر^۱، سعید سبحانی راد^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۰

چکیده

هدف از انجام این آزمایش، تعیین ترکیبات شیمیایی و بررسی روش‌های تانن‌زدایی در برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) و تخمین فراسنجه‌های تخمیری آنها به روش تولید گاز بود. روش‌های مذکور شامل روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله بودند. نتایج نشان داد که کاهش مقدار تانن در تمامی روش‌های فرآوری نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود. همچنین روش خیساندن سبب افزایش معنی‌دار پروتئین خام، انرژی خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی نسبت به سایر تیمارها شد. فرآوری به روش خیساندن نسبت به سایر تیمارها سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز جمعی و تولید گاز از بخش نامحلول (b) و افزایش غیرمعنی‌دار نرخ تولید گاز (c)، انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی شد ($p > 0.05$). لذا با توجه به نتایج به دست آمده، روش خیساندن و استفاده از آب مقطر نسبت به اتانول، روش مناسبی جهت استخراج تانن از برگ گردو و مصرف آن در خوراک نشخوارکنندگان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برگ گردو، تولید گاز، خصوصیات تخمیری، روش‌های تانن‌زدایی

مقدمه

گردو از درختان بسیار مهم و ارزشمند می‌باشد که در بسیاری از نقاط جهان یافت می‌شود. گردو متعلق به خانواده Juglandaceae می‌باشد. گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) مهم‌ترین گونه شناخته شده آن می‌باشد. پوست، مغز، برگ و پوسته گردو در صنایع داروسازی و لوازم آرایشی استفاده می‌شود (Pereira et al., 2007). برگ درخت گردو نیز به عنوان یک محصول فرعی کشاورزی در کشور محسوب می‌شود که سالانه مقدار قابل توجهی از آن به دلیل نبود صنایع فرآوری، سوزانده یا دور ریخته می‌شود. محصول فرآوری نشده برگ گردو به دلیل داشتن ماده ضد تغذیه‌ای تانن، گس بوده و همچنین دارای خوش‌خوراکی پایین بوده و به تنهایی قابل مصرف نمی‌باشد، در حالی که پس از استحصال و فرآوری و جداسازی تانن، برگ فرآوری شده را می

۱-دانش آموخته گروه علوم کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲-استادیار، گروه علوم کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*نویسنده مسئول: (sobhanirad@gmail.com)

توان به عنوان یک ماده خوراکی در جیره نشخوارکنندگان استفاده نمود (Min & Attwood, 2003). همچنین برگ گردو غنی از اجزای آنتی‌اکسیدانی نظیر فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها می‌باشد (Amaral *et al.*, 2004). تانن استخراج شده را نیز می‌توان در صنایع داروسازی به عنوان آنتی‌بیوتیک و اثر ضد سرطانی (Yildirim & Kutlu, 2015) و در صنایع غذایی (Lamy *et al.*, 2016) و بهداشتی (Asghari & Mazaheritehrani, 2010) مورد استفاده قرار داد.

اصطلاح تانن برای اولین بار در سال ۱۷۹۶ توسط سیگوین در تشریح مواد استخراج شده از بعضی از گیاهان که می‌توانستند در روند تبدیل پوست حیوانات به چرم نقش بسزایی داشته باشند به کار گرفته شد (Handa & Kapoor, 2003). تانن‌ها که به اسم‌های دیگری چون اسید تانیک، گالوتانن و اسید گالوتانیک شناخته شده‌اند، ترکیبات پیچیده طبیعی هستند که از مواد شیمیایی پلی فنلی تشکیل شده‌اند و در پوست، برگ و ریشه اکثر گیاهان از جمله چای، سیب، هلو، گردو و غلات به وفور یافت می‌شوند. این مواد با وزن مولکولی بالا (۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون) و دارای تعداد قابل ملاحظه‌ای گروه هیدروکسیل فنلیک (۱ تا ۲ درصد وزن ملکولی) هستند که امکان تشکیل ارتباطات تقاطعی بین پروتئین و سایر ماکرومولکول‌ها را میسر می‌سازند، بنابراین موجب بازدارندگی عمل آنزیم‌ها به خصوص آنزیم‌های مورد استفاده در هضم نشاسته شده که در نتیجه انرژی مصرفی نیز کاهش می‌یابد. همچنین تانن‌ها موجب اختلال در کار سلولاز شده و در نتیجه می‌توانند بر هضم سلولز تداخل ایجاد کنند. این ترکیبات در دسترسی عناصر معدنی، خصوصاً کلسیم و آهن مواد خوراکی اختلالاتی را پدید می‌آورند. طعم تلخ و گسی آنها نیز موجب کاهش اشتها و کاهش مصرف خوراک در حیواناتی می‌شود که از ترکیبات حاوی آنها تغذیه می‌کنند (Min & Attwood, 2003).

تانن‌ها را بسته به حلالیت آن‌ها به دو گروه قابل هیدرولیز و متراکم تقسیم می‌کنند. چهار دسته از تانن‌های قابل هیدرولیز وجود دارند که عبارتند از: گالوتانن‌ها^۱، الاجیتانن‌ها^۲، تاراگالوتانن‌ها^۳ و کافه تانن‌ها^۴. گزارش شده است برگ گردو در حدود ۱۰ درصد تانن دارد که از نوع الاجیتانن‌ها می‌باشد (Blumenthal *et al.*, 2000). روش‌های مختلفی برای غیر فعال کردن تانن‌های مواد خوراکی و بهبود ارزش غذایی آنها انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به نگهداری بی‌هوازی، خشک کردن، اضافه کردن خاکستر چوب و استفاده از مواد شیمیایی و پلی‌اتیلن گلیکول اشاره کرد (Singh *et al.*, 2005)، اما روش‌های مختلفی به منظور استخراج تانن از مواد خوراکی حاوی آنها وجود دارند که مهم‌ترین آنها شامل روش‌های خیساندن (Pourshafi Zanganeh, 1993)، جوشاندن (Vijayakumari *et al.*, 2007)، پرکولاسیون^۵ (Robber, 1996) و سوکسله^۶

¹ Galotannins

² Ellagitannins

³ Taragalotannins

⁴ Coffetannins

⁵ Percolation

⁶ Soxhlet

(Pansera *et al.*, 2004) می باشد. در روش خیه ساندن و جو شاندن از آب مقطر و در روش پرکولا سیون و سوکسله از اتانول استفاده می شود. لازم به ذکر است با بررسی مقالات پیشین، هیچ گونه گزارشی از روش های فرآوری و استخراج تانن از برگ گردو و ترکیبات شیمیایی عصاره های حاصله مشاهده نشد.

کمبود علوفه با کیفیت در بسیاری از مناطق خشک مخصوصا مناطق دارای خاک های اسیدی، کم بارور و فصل های خشک طولانی، مشکل عمده دامپروران به منظور بهبود تولیدات دامی است (Tiemann *et al.*, 2008). بنابراین با توجه به محصولات فرعی کشاورزی و باغی قابل دسترس در این مناطق و تاثیر میکروب های شکمبه بر هضم آنها، جایگزینی تمام یا قسمتی از علوفه مصرفی نشخوارکنندگان با این محصولات از اهداف مهم محققین تغذیه دام می باشد. از طرف دیگر، به دلیل وجود بسیار زیاد برگ درختان که سالانه مقدار بسیار زیادی از آن در باغ های کشور سوزانده یا دور ریخته می شود، فرآوری برگ درختان گردو و استخراج تانن آن، می تواند هضم ترکیبات فرآوری شده در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان را کاهش دهد (Min & Attwood, 2003). با توجه به اینکه اطلاعات موجود در زمینه ارزش غذایی برگ گردو و محصولات حاصل از روش های استخراج تانن بسیار محدود است، بررسی ارزش غذایی و خصوصیات تخمیری در محصولات تانن زدایی شده می تواند داده های مفیدی را در اختیار متخصصان تغذیه دام قرار دهد (Makkar, 2005). همچنین با استخراج تانن علاوه بر مصرف برگ درخت برای دام می توان تانن آن را در صنایع داروسازی، جوهرسازی، چرم سازی و صنایع چوب مورد استفاده قرار داد. بنابراین هدف از انجام این آزمایش، تعیین ترکیب شیمیایی و بررسی فراسنجه های تولید گاز در عصاره های تانن زدایی شده، و همچنین تعیین مناسب ترین روش استخراج تانن از نظر خصوصیات تخمیری باقیمانده های حاصل بود.

مواد و روش ها

جمع آوری، نمونه گیری و تعیین ترکیبات شیمیایی

نمونه های برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) از چندین منطقه شهر شاندیز به صورت تصادفی انتخاب گردیده، جمع آوری شده و در سایه خشک شدند. سپس نمونه های مورد آزمایش آسیاب شده و میزان ماده خشک، انرژی خام^۱ و پروتئین خام با استفاده از روش های استاندارد نشریه انجمن رسمی شیمی تجزیه^۲ AOAC (۲۰۰۵) اندازه گیری شد. الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با استفاده از روش ون سوست^۳ و همکاران (۱۹۹۱) تعیین شد.

روش های استخراج تانن از برگ گردو

^۱ مقدار انرژی شیمیایی غذا با تبدیل آن به انرژی حرارتی اندازه گیری می شود. این تبدیل با سوزاندن غذا صورت گرفته و به مقدار حرارتی که از اکسیداسیون کامل واحد وزن غذا به دست می آید «انرژی خام» یا «حرارت احتراق» غذا اطلاق می گردد.

^۲ Association of Official Analytical Chemists

^۳ Van Soest

چهار روش فرآوری به منظور استخراج تانن در این آزمایش استفاده شده است که عبارت بودند از:

(۱) روش خیساندن^۱: در این روش ابتدا برگ‌های گردو جمع‌آوری شده را با یک ترازو حساس به مقدار ۱۰ گرم وزن کرده و بعد آن‌ها به صورت نیم کوب شده تبدیل شدند. پس از توزین، آنها را در داخل یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به داخل ارلن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از اتمام ۲۴ ساعت اول، ارلن به مدت ۲ ساعت بر روی دستگاه بن ماری گذاشته شده تا گرم شود و بعد از آن عمل صاف کردن صورت گرفت. با استفاده از کاغذ صافی مواد داخل ارلن صاف شده و مواد روی کاغذ صافی را مجدداً با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شده و دوباره مواد داخل ارلن از کاغذ صافی عبور داده شدند (Pourshafi, Zanganeh, 1993).

(۲) روش جوشاندن^۲: در این روش ابتدا با ترازوی حساس به مقدار ۱۰ گرم برگ گردو وزن شده و سپس به صورت نیم کوب شده تبدیل شدند و در داخل یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری آب مقطر اضافه شدند. پس از بستن درب ظروف با فویل آلومینیومی، نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از خنک شدن با استفاده از کاغذ صافی و به کمک پمپ مکنده، نمونه‌ها صاف شدند (Vijayakumari et al., 2007).

(۳) روش پرکولاسیون^۳: در این روش ابتدا به کمک یک قیف دکانتور، یک دستگاه پرکولار ساخته و در مرحله اول شیر دکانتور را خارج کرده و دو طرف آن را کاملاً مسدود کرده، سپس انتهای دکانتور را با یک لایه پنبه پر کرده و روی آن یک لایه شن شسته شده ریخته شدند. بعد از آن با یک ترازوی حساس مقدار ۱۰ گرم برگ گردو را وزن کرده و به وسیله دستگاه آسیاب آنها به صورت پودر درآمدند. سپس پودر برگ گردو آسیاب شده بر روی لایه شن که قبلاً در درون دستگاه پرکولار ریخته شده قرار داده شدند. روی برگ گردو آسیاب شده به وسیله یک کاغذ صافی پوشانده شدند. بعد از این مراحل با استفاده از اتانول ۹۶ درصد، به آرامی درون دستگاه پرکولار ریخته طوری که تمام پودر برگ گردو آسیاب شده بر زیر اتانول قرار گیرد. سرعت خروج اتانول از زیر دستگاه پرکولار حدود ۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. این کار تا ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرده و اتانول خارج شده جمع‌آوری شد و بعد از آن کاغذ صافی را برداشته و برگ گردو آسیاب شده خارج گردید (Robber, 1996).

(۴) روش سوکسله^۴: در این روش ابتدا ۱۰ گرم برگ گردو، به وسیله ترازوی حساس وزن شده و برگ‌ها به صورت نیم کوب در آمدند و در داخل فیلتری از جنس فایبرگلاس^۵ (ریبون بلک، ساخت آلمان) ریخته و در داخل دستگاه سوکسله قرار داده شدند. سپس ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد در بالون دستگاه ریخته و روی اجاق به نقطه جوش رسانده شدند. بخارات اتانول در بالای

¹ Maceration Method

² Boiling Method

³ Percolation Method

⁴ Soxhlet Method

⁵ Fiberglass

دستگاه در قسمت مبرد که به جریان آب سرد متصل است، به حالت میعان رسیده و قطره قطره بر روی نمونه که درون فیلتر است ریخته شدند. پس از اینکه حجم الکل در مخزن طبقه فوقانی به ۲۵۰ میلی لیتر رسید به علت پیدایش فشار منفی در لوله دستگاه، اتانول دوباره به بالن اولیه برگشته و مجدداً در معرض جوشش قرار گرفت. مراحل جوشاندن در دو مرحله چهار ساعته و به فاصله زمانی ۲۴ ساعت انجام گرفت. اتانول حاوی عصاره از طریق دستگاه تقطیر در فشار کم که در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۶۰ دور در دقیقه مورد جداسازی قرار می‌گیرد و در این حالت عصاره استخراج شده به صورت لایه در ته ظرف رسوب نمود. این رسوب با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر شسته شده و برای حل شدن کامل بهتر است از بن ماری استفاده گردد، سپس نمونه‌ها با فیلتر صاف شدند (Pansera *et al.*, 2004).

اندازه‌گیری تانن موجود در تیمارهای آزمایشی

در این مرحله ابتدا هر یک از نمونه‌های حاصل از استخراج تانن به روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله را با آسیاب حاوی غربال ۲ میلی‌متری آسیاب نموده و مقدار ۲ گرم از هر نمونه برای اندازه‌گیری تانن مورد آزمایش قرار داده شد. جهت اندازه‌گیری درصد تانن در نمونه‌های فوق، روش تیتریمتریک^۱ مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، از خاصیت احیاکنندگی استفاده شد به این صورت که به وسیله پرمنگنات پتاسیم تیتراسیون انجام می‌شود. برای تعیین نقطه انتهایی از معرف ایندیگوکارمین^۲ استفاده شد (Hagerman & Butler, 1978).

اعمال تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) برگ گردو فرآوری نشده (شاهد)، (۲) برگ گردو فرآوری شده با روش خیساندن، (۳) برگ گردو فرآوری شده با روش جوشاندن، (۴) برگ گردو فرآوری شده با روش پرکولاسیون و (۵) برگ گردو فرآوری شده با روش سوکسله بودند. برای هر تیمار آزمایشی ۵ تکرار نیز در نظر گرفته شد.

آزمون تولید گاز

اندازه‌گیری تولید گاز در تیمارهای آزمایشی بر اساس روش پیشنهادی توسط منک^۳ و همکاران (۱۹۷۹) انجام شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند تغذیه شده با جیره بر پایه علوفه که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند قبل از وعده خوراک‌دهی صبح گرفته شد و فوراً به وسیله پارچه متقال چهار لایه صاف گردید. ترکیب نهایی محیط کشت به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر شامل آب مقطر (۲۳۷ میلی لیتر)، نمک‌های پرنیاز (۱۱۸/۵ میلی لیتر)، محلول بافر (۱۱۸/۵ میلی لیتر)، نمک‌های کم نیاز (۰/۰۶ میلی

^۱ Titrimetric

^۲ Indigo Carmine

^۳ Menke

لیتر)، رزوزارین^۱ (۰/۶۱ میلیلیتر)، محلول احیاکننده (۲۵ میلی لیتر شامل: ۲۳/۸ میلی لیتر آب مقطر، ۱ میلی لیتر سود ۱ نرمال و ۱۴۲/۵ میلی گرم سولفید سدیم) بود. برای انجام آزمایش تولید گاز ۳۰۰ میلی گرم از تیمارهای آزمایشی در زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حجم گاز تولیدی در زمان‌های مختلف به صورت تجمعی مورد محاسبه قرار گرفت. هضم‌پذیری ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم با استفاده از معادله منک و استینگاس^۲ (۱۹۸۸)، محاسبه شد:

$$۱) \text{GP (گرم در کیلوگرم ماده آلی)} = 14.88 + 0.8893 \text{ GP} + 0.448 \text{ CP} + 0.0651 \text{ A}$$

$$۲) \text{(مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) انرژی قابل متابولیسم} = 2.2 + 0.1357 \text{ GP} + 0.057 \text{ CP} + 0.0029 \text{ CP}^2$$

در روابط بالا، CP مقدار پروتئین خام (گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، A خاکستر خام (گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و GP نرخ خالص تولید گاز به ازای ۳۰۰ میلی گرم ماده خشک نمونه بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

ضرایب تولید گاز با نرم افزار آماری SAS۹/۱ براساس فرمول زیر محاسبه شد (Blummel & Orskov, 1993) و مقایسه داده‌های ضرایب و حجم تجمعی گاز تولیدی در سطح ۵ درصد انجام شد.

$$p = b(1 - e^{-ct})$$

در این مدل، p حجم تولید گاز در زمان t، b گاز تولیدشده از بخش نامحلول اما تخمیرپذیر، c ثابت نرخ تولید گاز، t مدت زمان انکوباسیون و e اثر خطای آزمایش می‌باشد. فراسنجه‌های تولید گاز تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تاثیر روش‌های استخراج تانن از برگ گردو بر مقدار تانن محصولات فرآوری شده

میزان تانن باقیمانده در عصاره های حاصل از روشهای تانن زدایی در جدول ۱ نشان داده شده است. تغییرات میزان تانن در بین تیمارهای آزمایشی معنی دار بود، به این صورت که میزان تانن کل در تمامی روش های فرآوری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (۰/۰۵ < p)، اما مقدار این ترکیب در بین تیمارهای فرآوری شده با روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله تفاوت معنی داری نداشت (به ترتیب ۰/۲۱، ۰/۳۱، ۰/۳۱ و ۰/۶۳ درصد).

^۱ Resazurin

^۲ Steingass

تاثیر روش های استخراج تانن از برگ گردو بر ترکیب شیمیایی محصولات فرآوری شده

ترکیب شیمیایی برگ گردو فرآوری نشده و در عصاره های تانن زدایی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. در این آزمایش طبق نتایج بدست آمده از آنالیز برگ گردو بیشترین پروتئین خام مربوط به برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن بود ($p < 0.05$)، اما با پروتئین برگ گردو فرآوری نشده تفاوت معنی داری نداشت. همچنین در این تحقیق میزان انرژی خام در برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن نسبت به بقیه تیمارها به جز روش جوشاندن، تفاوت معنی داری داشت ($p < 0.05$)

همان طور که داده های جدول ۱ نشان می دهد میزان دیواره سلولی اعم از میزان دیواره سلولی (Neutral Detergent Fiber) و دیواره سلولی منهای همی سلولز (Acid Detergent Fiber) در نمونه های فرآوری شده با روش خیساندن نسبت به بقیه نمونه ها دارای بیشترین مقادیر دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی سلولز بود ($p < 0.05$).

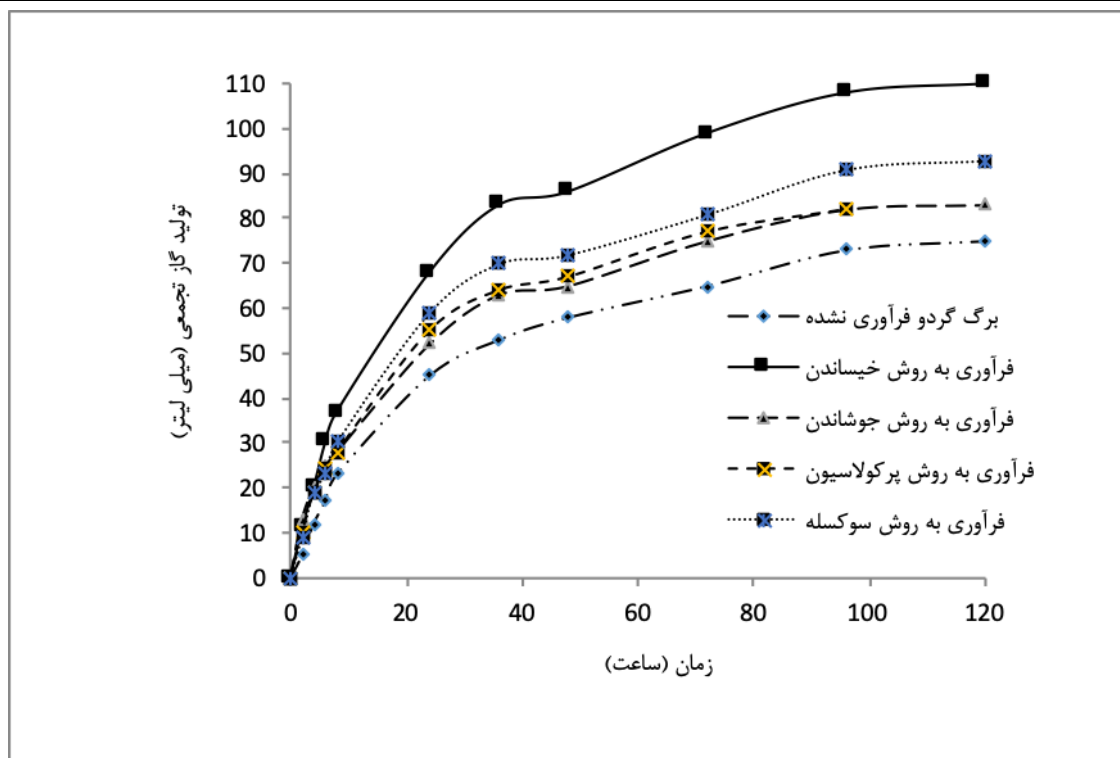
جدول ۱: میانگین ترکیبات شیمیایی در محصولات حاصل از روشهای مختلف استخراج تانن (خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله) در برگ گردو (درصد از ماده خشک)

تیمارهای آزمایشی	پروتئین خام (درصد)	انرژی خام (کیلو کالری/کیلوگرم)	دیواره سلولی (درصد)	دیواره سلولی منهای همی سلولز (درصد)	تانن کل (درصد)
برگ گردو فرآوری نشده	^a ۷/۱۸	^b ۴۴۰.۵	^b ۳۲/۳۰	^b ۲۸/۶۰	^a ۸/۷۱
روش خیساندن	^a ۷/۲۲	^a ۷۴۰.۰	^a ۴۵/۳۰	^a ۳۹/۷۰	^b ۰/۲۱
روش جوشاندن	^{ab} ۵/۲۵	^a ۶۲۰.۳	^b ۳۸/۹۰	^b ۳۳/۱۰	^b ۰/۳۱
روش پرکولاسیون	^b ۳/۵۹	^c ۲۶۵۰	^b ۳۷/۲۰	^b ۳۲/۵۰	^b ۰/۳۱
روش سوکسله	^b ۳/۴۷	^c ۲۷۸۲	^b ۳۵/۴۰	^b ۳۱/۷۰	^b ۰/۶۳
میانگین اشتباه	۱/۰۲	۸۵۴	۴/۲۰	۳/۴۲	۲/۱۲
استاندارد					
سطح معنی داری	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴

□ میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0.05$).

تاثیر روش های فرآوری برگ گردو بر تولید تجمعی گاز در تیمارهای آزمایشی

روند تولید گاز (شکل ۱) در تیمارهای مربوطه نشان می دهد در ساعت های اولیه (تا ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون) اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت ($p > 0.05$)، اما در ساعت ۲۴ بیشترین تولید گاز مربوط به برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن و کمترین مقدار گاز تولیدی مربوط به تیمار شاهد (برگ گردو فرآوری نشده) می باشد ($p < 0.05$).



نمودار ۱: روند تولید گاز کل در تیمارهای فرآوری شده برگ گردو پس از ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری (میلی لیتر در ۳۰۰ میلی گرم ماده خشک)

تاثیر روش‌های فرآوری برگ گردو بر خصوصیات تخمیری تیمارهای آزمایشی

اثر برگ گردو فرآوری شده بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه در جدول ۲ نشان داده شده است. تمامی روش‌های فرآوری و استخراج تانن از نمونه‌های برگ گردو، سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز از بخش نامحلول (b) نسبت به تیمار شاهد شده است، به صورتی که بیشترین افزایش تولید گاز از بخش نامحلول مربوط به فرآوری به روش خیساندن و به ترتیب فرآوری به روش سوکسله، روش پروکولاسیون و روش جوشاندن قرار داشتند. کمترین تولید گاز از بخش نامحلول ($p < 0.05$) نیز در تیمار شاهد (برگ گردو فرآوری نشده) تولید شد ($p < 0.05$). تمامی روش‌های فرآوری و استخراج تانن از نمونه‌های برگ گردو در این آزمایش سبب افزایش نرخ تولید گاز (c) شده است ($p < 0.05$)، اما نرخ تولید گاز در نمونه‌های حاصل از روش‌های مختلف فرآوری تفاوت معنی‌داری نداشت.

انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت، هرچند دو فراسنجه مذکور در تمامی نمونه‌های آزمایشی فرآوری شده بیشتر از تیمار شاهد بودند ($P > 0.05$) و بیشترین مقدار انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی نیز در محصولات حاصل از روش خیساندن مشاهده شد ($P > 0.05$).

جدول ۲: میانگین فراسنجه‌های تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی در تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی	فراسنجه‌های تولید گاز		انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	هضم پذیری ماده آلی (درصد)
	تولید گاز از بخش قابل تخمیر (b)	ثابت نرخ تولید گاز (c)		
برگ گردو فرآوری نشده	^c ۷۲/۸۵	^b ۰/۰۳۸	۸/۸۷	۵۸/۵۴
روش خیساندن	^a ۱۰۶/۵۸	^a ۰/۰۴۳	۱۲/۱۷	۸۰/۰۷
روش جوشاندن	^d ۷۹/۷۲	^a ۰/۰۴۶	۹/۶۷	۶۴/۲۱
روش پرکولاسیون	^c ۸۰/۷۲	^a ۰/۰۴۶	۹/۹۷	۶۶/۳۱
روش سوکسله	^b ۸۹/۲۸	^a ۰/۰۴۶	۱۱/۲۷	۷۴/۶۵
میانگین اشتباه استاندارد	۰/۳۳	۰/۰۰۲	۱/۲۵	۳/۲۵
سطح معنی داری	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۸۱	۰/۱۱۲

□ میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0.05$).

کاهش معنی دار تانن در تمامی روش‌های تانن زدایی در تحقیق حاضر نسبت به تیمار شاهد، کارایی استفاده از روش‌های استخراج و جداسازی تانن توسط روش‌های فوق را نشان می‌دهد. همچنین بیشترین کاهش ($p < 0.05$) مقدار تانن نسبت به گروه شاهد در عصاره حاصل از روش خیساندن مشاهده شد.

در روش خیساندن با توجه به اینکه از حلال آب استفاده شده است و حرارت اعمال نشده است، خروج ترکیبات پروتئینی همراه با تانن از نمونه‌های آزمایشی انجام نشده است. اما دلیل احتمالی کاهش پروتئین در روش‌های پرکولاسیون و سوکسله می‌تواند استفاده از حلال اتانول باشد که سبب شستن پروتئین‌ها می‌شود (Yousef Elahi & Rouzbehan, 2007). در روش جوشاندن نیز اعمال حرارت، احتمالاً سبب خروج مقادیر زیادی ترکیبات پروتئینی همراه با تانن شده است.

کاهش معنی دار انرژی خام در عصاره حاصل از روش خیساندن می‌تواند به علت کاهش معنی دار مقدار تانن در محصول حاصل از روش خیساندن باشد زیرا یک همبستگی منفی بین مقدار تانن و انرژی خام وجود دارد که باعث افزایش مقدار انرژی خام در محصولات حاصل شده است، اما مقادیر انرژی خام در محصولات حاصل از روش پرکولاسیون (تیمار ۴) و روش سوکسله (تیمار ۵) ممکن است به دلیل شسته شدن کربوهیدرات‌ها کاهش یافته باشد (Yousef Elahi & Rouzbehan, 2007).

یکی از دلایل اختلاف در میزان دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی سلولز بین روش خیساندن و بقیه روش‌ها، ممکن است عدم استفاده از حرارت و حلال‌های آلی به منظور استخراج تانن می‌باشد، در نتیجه کربوهیدرات‌های ساختمانی بیشتری را در عصاره حاصله حفظ می‌کند.

با توجه به وجود تانن بالا (۸/۷۱ درصد) در تیمار شاهد، دلایل احتمالی مهار تولید گاز در این تیمار، باند شدن تانن‌ها با غشاء سلولی و یا آنزیم‌های تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها است (McSweeney *et al.*, 2001)، عامل دیگر ترکیب شدن تانن‌ها با مواد مغذی اعم از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی است (Kamalak *et al.*, 2004; Reed, 1995). اما در تیمارهای فرآوری شده، استخراج تانن از نمونه‌های برگ گردو سبب حذف اثرات منفی آن شده است. دیگر محققان نیز در عصاره‌های

تانن‌زدایی برگ بلوط، افزایش ($p < 0.01$) حجم تولید گاز و هضم پذیری ماده آلی را مشاهده نمودند (Maldar *et al.*, 2010). همچنین علت افزایش حجم گاز تولیدی از ساعت ۲۴ ممکن است به دلیل وجود کربوهیدرات‌های ساختمانی بالاتر در تیمارهای فرآوری شده باشد، بنابراین تاثیر میکروارگانیزم‌های شکمبه بر فرآیند تخمیر نمونه‌های آزمایشی با تاخیر زمانی صورت گرفته است.

افزایش تولید گاز از بخش نامحلول (b) و افزایش نرخ تولید گاز (c) در عصاره‌های حاصل از روش‌های تانن‌زدایی با نتایج سایر محققان مطابقت دارد که با خنثی نمودن اثرات منفی تانن (Makkar *et al.*, 1995)، افزایش در تولید گاز از بخش نامحلول و تولید گاز تجمعی را مشاهده کردند (Alipour & Rouzbehan, 2007; Mlambo *et al.*, 2007).

دلیل احتمالی افزایش مقدار انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی در آزمایش حاضر، کاهش معنی‌دار تانن در تیمارهای فرآوری شده و ارتباط معکوس آن با قابلیت هضم (Silanikove *et al.*, 1996) و قابلیت بهره‌وری مواد خوراکی حاوی آنها (Frutos *et al.*, 2004) در نشخوارکنندگان می‌باشد. دیگر محققان نیز با فرآوری شیمیایی پسماند کشمش و حذف اثرات منفی تانن، افزایش در انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی را مشاهده کردند (Alipour *et al.*, 2010). با عمل‌آوری محصولات فرعی پسته به منظور غیرفعال کردن تانن و بهبود ارزش تغذیه‌ای این محصولات، گزارش شده است همبستگی مثبتی بین تولید گاز و انرژی قابل متابولیسم و همچنین بین تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی وجود دارد و از طرف دیگر، همبستگی منفی بین میزان تانن و فراسنجه‌های تولید گاز وجود دارد (Mokhtarpour *et al.*, 2012).

نتیجه‌گیری کلی

به عنوان نتیجه‌گیری نهایی، این تحقیق نشان داد تمامی روش‌های استخراج تانن ذکر شده در این آزمایش، سبب کاهش معنی‌دار تانن از برگ گردو می‌شوند. همچنین با مقایسه ترکیب شیمیایی و خصوصیات تخمیری محصولات حاصل از روش‌های فرآوری، می‌توان نتیجه گرفت روش خیساندن و استفاده از آب مقطر نسبت به اتانول، روش مناسبی جهت استخراج تانن و مصرف آن در خوراک نشخوارکنندگان می‌باشد. بنابراین با توجه به کاهش سالانه منابع آبی کشور و کاهش تولید علوفه توسط کشاورزان می‌توان از برگ گردو فرآوری شده، در شرایطی که دامدار با محدودیت تامین خوراک مواجه است، به عنوان یک خوراک فیبری برای تامین نیاز نگهداری استفاده نمود. با استفاده از روش خیساندن، اثرات منفی تانن موجود در آن خنثی شده و تا حدی ارزش غذایی آن اضافه می‌شود. برای کسب اطلاعات بیشتر لازم است تا پژوهش‌های بیشتری در مورد اثر فرآوری‌های مختلف و تانن موجود در آن بر عملکرد دام زنده مانند گوسفند پروری و یا گاو شیری انجام گیرد تا نتایج با اطمینان بیشتری به کار برده شود.

منابع

- Alipour, D. and Rouzbehan Y. (2007) Effect of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 138-149.
- Alipour, D., Tabatabaei, M. M., Zamani, P., Aliarabi, H. A., Saki, A. A. and Zamani Z. (2010) Determination of chemical composition and Gas production parameters of Raisin by- product. *Journal of Animal Science Research*, 4(20): 109-118 (In Persian).
- Amaral, J. S., Seabra, R. S., Andrade, P. B., Valentão, P., Pereira, J. A., Ferreres, F. (2004) Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglansregia L.*) leaves. *Food Chemistry*, 88:373-379.
- AOAC. (2005) Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arligton, VA.
- Asghari, J. and Mazaheritehrani, M. (2010) Extraction of tannin from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and trimyristin from *Myristica fragrans* Houtt by using microwave irradiation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26 (2): 185-195 (In Persian).
- Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J. (2000) *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Copyright American Botanical Council. Publ. by Integrative Medicine Communications, 1029 Chestnut Street, Newton, MA 02464, 401-403.
- Blummel, M. K. and Orskov, E. (1993) Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40:109-119.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. and Mantecón, A. R. (2004) Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 191-202.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. (1978) Protein precipitation methods for the quantitative determination of tannin. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 26: 809-812.
- Handa, S. S. and Kapoor, V. K. (2003) *Textbook of Pharmacognosy*. 2nd Edn., VallabhPrakshan, Delhi.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Ozay, O. and Akbas, S. (2004) Nutritive value of oak (*Quercus sp.*) leaves. *Small Ruminant Research*. 53: 161-165.
- Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela-Silva, F., Lopes, O. S., Moreira, P., Tavares, S. and Gaspar, R. (2016) Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects. In *Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties* (29-58). NY: Nova Publishers.
- Makkar, H. (2005) In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, 123: 291-302.
- Makkar, H. P. S., Blummel, M. and Becker, K. (1995) Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and truedigestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73: 897-913.
- Maldar, S.M., Roozbehan, Y., Alipour, D. (2010) The effect of adaptation to oak leaves on digestibility (in vitro) and ruminal parameters in alamout goat. *Iranian Journal of Animal Science*, 41: 243-252 (In Persian).
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M. and Krause, D. O. (2001) Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93.

- Menke, K. H. and Steingass, H. (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Animal research and development**, 28: 6-55.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneide, W. (1979) The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, 92: 217 -222.
- Min, B. R. and Attwood, G.T. (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 106: 3-19
- Mlambo, V., Sikosana, J. L. N., Mould, F. L., Smith, T., Owen, E. and Mueller-Harvey, I. (2007) The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, 136: 128-136.
- Mokhtarpour, A., Naserian, A. A., Valizadeh, R., Tahmasbi, A. (2012) Effect of Polyethylene Glycol and Urea Treated Pistachio by-products Silage on Phenolic Compounds, in vitro Gas Production and Holstein Dairy Cow's Performance. **Iranian Journal of Animal Science Research**, 4(1): 55-62 (In Persian).
- Pansera, M. R., Iob, G. A., Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Atti-Serafini, L., Cassel, E. (2004) Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(6): 995-998.
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. (2007) Walnut (*Juglans regia L.*) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, 45(11): 2287-95.
- Pourshafi Zanganeh, H. (1993) Usable oak galls in Kermanshah province. M. Sc. Thesis, Faculty of Natural Resource, University of Tehran, Karaj, 112 Pp (In Persian).
- Reed, J. D. (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in foage legumes. **Journal of Animal Science**, 73: 1516–1528.
- Robber, J. E., Speedie, M.K., and Tyler, V.E. (1996) *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. williams and wilkins 337 Pp, Baltimore.
- SAS Institute Inc. (2004) *SAS/STAT User's Guide*, Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Nir, I., Perevolotsky, A. and Nitsan, Z. (1996) Effect of daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacialentiscus*, and *Ceratoniasiliqua*) by goats. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, 44: 199–205.
- Singh, B., Sahoo, A., Sharma, R., Bhat, T. K. (2005) Effect of poethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 123-124: 351–364.
- Tiemann, T. T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C., Kreuzer, M. and Hess, H. D. (2008) *In vitro* ruminal fermentation of tannin ifrous tropical plants: plant specific tannin effects. **Animal Feed Science and Technology**, 146: 222-241.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74: 3583-3597.
- Vijayakumari, K., Pugalenth, M. and Vadivel, V. (2007) Effect of soaking and hydrothermal processing methods on the levels of antinutrients and in vitro protein digestibility of *Bauhinia purpurea L.* seeds. **Food Chemistry**, 103: 968-975.

Yildirim, I. and Kutlu, T. (2015) Anticancer Agents: Saponin and Tannin. International Journal of Biological Chemistry, 9: 332-340.

Yousef Elahi, M. and Rouzbehan, Y. (2007) **Characterization of *Quercus persica*, *Quercus infectoria*, *Quercus libani* as ruminant feeds**. Animal Feed Science and Technology, 140 (1-2): 78-89.

Comparison of different methods of tannin extraction from the leaves of Iranian walnut (*Juglans regia L.*) and their effects on chemical composition and fermentative parameters *in vitro*

B. Amir¹, S. Sobhanirad^{2*}

Received:2018.1.30

Accepted:2019.7.1

Abstract

The aim of this study was to determine the chemical composition and evaluation of extraction methods of tannin from leaves of Iranian walnut (*Juglans regia L.*) and estimation of fermentative parameters by gas production technique. These methods included maceration, boiling, percolation, and Soxhlet method. The results showed that the amount of tannins in all the processing methods was reduced significantly compared to the control treatment ($p < 0.05$). The soaking method also significantly increased crude protein, crude energy, neutral detergent fiber and acid detergent fiber compared to other treatments ($p < 0.05$). Soaking Process compared to other treatments increased significantly cumulative gas production, the fermentable fraction (b) of gas production and also increased insignificantly the parameters of rate (c) of gas production, metabolizable energy, and digestibility of organic matter. The results of this study indicated that maceration method and use distilled water compared to ethanol, is a suitable method for the extraction of tannin and its use in ruminants' feedstuff.

Keywords: Fermentation Characteristics, Gas production, Tannin removal methods, Walnut.

1-Msc graduate, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2-Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

*(Corresponding Author:sobhanirad@gmail.com)

تجزیه‌ی ارتباط مکان‌های ژنی کنترل‌کننده‌ی صفات مورفولوژیک برنج با استفاده از نشانگرهای ISSR در شرایط غرقاب و تنش خشکی

محمد رضا کریم^۱، حسین صبوری^{۲*}، احمد رضا دادرس^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

چکیده

شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی به ویژه در وضعیت تنش از موضوع‌های مهم حوزه‌ی به نژادی است. پژوهش حاضر در راستای شناسایی نشانگرهای مولکولی که ارتباط معنی‌داری با صفات مرتبط در برنج با استفاده از نشانگر ISSR و ۵۹ ژنوتیپ برنج و ۲۱ صفت زراعی در شرایط غرقاب و تنش خشکی انجام شد. ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس نشانگرهای بین ریزماهورهای در مجموع ۱۴۴ باند با میانگین ۱۴/۴ باند به ازای هر جایگاه نشانگری ایجاد نمود و از ۱۴۴ باند تشکیل شده ۶۹/۱۷ درصد از باندها چندشکل بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) را آغازگر ISSR-7 با ۰/۴۹ و آغازگرهایی ISSR-2، ISSR-8، ISSR-9 و ISSR-10 با ۰/۴۷ کمترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند. تجزیه ارتباط با استفاده از ماتریس ساختار جمعیت و با مدل‌های آماری GLM و MLM با استفاده از نرم افزار TASSEL برای ۲۱ متغیر انجام شد. مدل MLM توانست در شرایط نرمال ۹۶ نشانگر و در شرایط تنش خشکی ۸۰ نشانگر معنی‌دار را مرتبط با ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال پنج درصد شناسایی نماید. مطابق نتایج تجزیه ارتباط در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین (در مدل MLM) مربوط به آلل ISSR7-2 به میزان ۲۹/۲۷ درصد و در شرایط تنش خشکی بالاترین ضریب تبیین (در مدل GLM) مربوط به آلل ISSR1-6 به مقدار ۲۲/۷۷ درصد بود. با توجه به نتایج، پیش‌بینی می‌شود. استفاده از نشانگرهای ISSR ردیابی شده در این پژوهش در صورت تأیید و پس از اختصاصی شدن، با اطمینان زیادی در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر امکان پذیر باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، برنج، تنش خشکی، TASSEL ISSR

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران

۲. دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

* (نویسنده مسئول: hos.sabouri@gmail.com)

۳. استادیار پژوهشی ایستگاه تحقیقات زیتون طارم، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان می‌باشد و غذای اصلی و منبع تامین کربوهیدرات بسیاری از مردم جهان بوده که سطح وسیعی از زمین‌های زیر کشت در آسیا را به خود اختصاص داده است (Yashitola *et al.*, 2004). تولید غذای جهان عمدتاً به وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماریزا محدود شده است که در میان انواع تنش‌ها، تنش خشکی دارای اهمیت بسزایی است (Zhang *et al.*, 2006). علاوه بر آن تغییرات آب و هوا و افزایش جمعیت جهانی نیز ایجاد این مشکل را گسترده‌تر می‌کند. یکی از راه حل‌های این مشکل ایجاد ارقام با تحمل بیشتر نسبت به تنش خشکی است (Takeda & Matsuoka, 2008). در این راستا اصلاح هدفمند گیاهان برای محیط‌های خشک ممکن است به افزایش معناداری در عملکرد گیاهان منجر شود. البته این موضوع مستلزم تحقیقات پایه‌ای درست و به کارگیری روش‌های جدید و مولکولی در کنار روش‌های سنتی است. بررسی صفات مرتبط با تنش خشکی به دلیل پیچیده بودن توارث بسیار مشکل است. یکی از برنامه‌های کاربردی در مطالعه صفات کمی در دهه اخیر، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی است. به طور کلی روش‌های به کاررفته در شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی به دو گروه تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباط تقسیم می‌شوند (Dadras *et al.*, 2014).

در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی، اغلب از جمعیت‌های مصنوعی حاصل از تلاقی دو والد هموزیگوت استفاده می‌شود و نوترکیبی در چرخه‌های میوزی طی تولید جمعیت‌های در حال تفرق مانند F_2 ، هاپلوئیدی‌های مضاعف، تلاقی برگشتی و لاین‌های اینبرد نوترکیب، درجه ارتباط یک QTL معین و نشانگرهای دور از آن کاهش می‌یابد و بنابراین با توجه به وجود فقط یک چرخه میوزی در تولید جمعیت‌های مانند F_2 ، هاپلوئیدی‌های مضاعف، تلاقی برگشتی، احتمال خطای نوع اول در آن در شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات بالا خواهد رفت. هر چند که در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب وجود چرخه میوزی کافی، میزان عدم تعادل بین مکان‌هایی با پیوستگی ضعیف و خطایی نوع اول را کاهش می‌دهد ولی میزان کاهش، به اندازه تلاقی تصادفی نیست. همچنین برای تولید چنین جمعیت‌های نیاز به زمان طولانی در مقایسه F_2 ، هاپلوئیدی مضاعف و تلاقی برگشتی است. از طرف دیگر، تولید جمعیت‌های مصنوعی به علت عدم امکان انجام تلاقی لازم در تعدادی از گونه‌ها مثل انسان و یا گیاهان دگرگشن مثل درختان عملی نبوده و یا بسیار مشکل است (Gupta *et al.*, 2005). تاکنون تحقیقات بیشماری درباره‌ی تجزیه‌ی پیوستگی اجرا شده است، اما زمان‌بر بودن تولید جمعیت‌های مصنوعی و اطلاعات ژنتیکی محدود موجود در جمعیت‌های در حال تفرق تولید شده در مقایسه با اطلاعات جامع‌تر و متنوع‌تر موجود در جمعیت‌های طبیعی سبب شده است تجزیه‌ی ارتباط در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای را در تحقیقات به نژادی به خود اختصاص دهد (Abdurakhmonov & Abdugarimov, 2008). برای غلبه بر این محدودیت‌ها در سال‌های اخیر روش مکان‌یابی ارتباط یا تجزیه ارتباط معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که

در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان پذیر نیستند را نیز میسازد. در این روش نیازی به تهیه جمعیت‌های در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، ولی بهتر است از داده‌های فنوتیپی چندساله استفاده شود (Breseghello & Sorells, 2006). در تجزیه‌ی ارتباط، رابطه‌ی بین ژنوتیپ و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادل بودن پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ژرم‌پلاسم بررسی می‌شود (Mohammadi, 2008). اگرچه خزانه‌ی ژنتیکی محصولات گیاهی که اکنون استفاده می‌شوند به دلیل اهلی شدن بسیار محدود شده است، استفاده از خویشاوندان وحشی با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد، به عنوان مخازن غنی از تنوع ژنتیکی مفید خواهد بود. برای نمونه بازبازی ژن‌های مرتبط با صفات مهم و اقتصادی مانند عملکرد یا مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی هم‌چون خشکی که ممکن است در روند اصلاح نباتات از دست رفته باشند، با استفاده از گونه‌های وحشی امکان‌پذیر است، هم‌چنین در حل مشکل به نژادگران برای شناسایی ژن‌های مناسب و ورود آنها در جمعیت‌های اصلاحی مفید خواهد بود (Mohammadi, 2005; Fufa et al., 2005; Abdurakhmonov & Abdukarimov, 2008; 2006). بنابراین امروزه لزوم استفاده از جمعیت‌های طبیعی در برنامه‌های به‌نژادی بیش از پیش احساس می‌شود. استفاده از نشانگرهای DNA لازمه‌ی اجرای برنامه‌های مکان‌یابی ژنی است. فناوری نشانگرهای ابزاری برای افزایش کارایی برنامه‌های به‌نژادی است. نشانگر ISSR نشانگر غالب و ارزان قیمتی است که از اصول مندلی تبعیت می‌کند. نشانگر ISSR چندشکلی ژنتیکی بالای را نشان می‌دهد و بر بسیاری از محدودیت‌های تکنیکی نشانگرهای دیگر غلبه می‌کند. میزان تکرارپذیری در نشانگر ISSR بین ۹۲ تا ۹۵ درصد گزارش شده است.

مزایای ISSR شامل تکثیر زیاد، چندشکلی زیاد و به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه درباره‌ی ژنوم آزمایشی و نیز سرعت و درجه‌ی اطمینان بالا، امروزه در تحقیقات ژنتیکی از جمله مکان‌یابی صفات کمی استفاده می‌شود (Reddy et al., 2002). تجزیه‌ی ارتباط در گیاهان بسیاری استفاده شده است. هامزا و همکاران (Hamza et al., 2004) در پژوهشی ۱۷ نشانگر ریزماهوره برای بررسی تنوع ژنتیک ۲۶ گونه‌ی جو و تعیین ارتباط این نشانگرها با برخی صفات مورفولوژیک استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند همبستگی مثبت و معنی‌داری بین برخی از نشانگرها و داده‌های مورفولوژیک وجود دارد. در ضمن با توجه به پژوهش Achleitner et al., 2008 بر روی ۱۱۴ گونه یولاف، با استفاده از ۷۷ نشانگر چندشکل حاصل از هشت ترکیب آغازگری، تجزیه ارتباط را برای مکان‌یابی عملکرد و اجزای عملکرد انجام دادند؛ درنهایت ۲۳ نشانگر را با پتانسیل بالا و مرتبط با صفات پیچیده برای برنامه‌های اصلاحی بعدی معرفی کردند.

نظر به اهمیت تحقیقات ژنتیکی در ارتباط با تنش خشکی در برنج پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ برنج با استفاده از نشانگرهای ISSR و تجزیه ارتباط آنها به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تنش خشکی و غرقاب در برنج طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط آنها به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تنش خشکی و غرقاب ۵۹ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) با استفاده ۱۰ نشانگر مولکولی بین ریز ماهواره‌ای ISSR انجام شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط جداگانه، بدون تنش (غرقاب) و تنش خشکی در شهرستان علی آباد کتول با طول جغرافیایی ۵۴/۵۱ شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶/۵۴ شمالی با ارتفاع ۱۳۶ متر از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۲ انجام شد. این منطقه از نظر آب و هوایی جزء اقلیم معتدل و مرطوب محسوب می‌شود و دارای زمستان‌هایی سرد و تابستان گرم می‌باشد. آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه اصلاح نباتات و ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس انجام گرفت.

جدول ۱: ژنوتیپ‌های مورد بررسی در آزمایش

شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها	شماره	ژنوتیپ‌ها
Non	genotypes	Non	genotypes	Non	genotypes	Non	genotypes
1	IR67015-49-2-6	16	IR60080-42	31	IR63372-15	46	IR60080-46A
2	IR 47686-12-5-B-1	17	IR77298-5-6	32	IR63377-08	47	Pegaso
3	Panda	18	IR60080-48	33	IR55423-01	48	IRAT212
4	Way Rarem	19	IRAT170	34	IR63380-08	49	LINE 213
5	IRFAON-308	20	سنگ جو	35	B6144F-MR-6-0-0	50	IR 55411-50
6	IR66421-062-1-1-2	21	USEN	36	CT6510-24-1-2	51	IRAT216
7	IR66417-18-1-1-1	22	IR30	37	AUS196	52	IRGC-15092RT-1031-62
8	IR 53236-342	23	IR62752-07	38	IR57924-24	53	IR70358-84-1-1
9	Caiapo	24	IR62761-20	39	IR66424-1-2-1-5	54	CT6510-24-7-8
10	IR68702-072-1-4-B	25	NONABOKA	40	CT6516-24-3-2	55	DAGADDESHI
11	IR65907-116-1-B	26	CT6510-24-1-2	41	CT13377-4-2-M	56	SAMBA MAHSURI
12	IR55419-04	27	IR7471-199-1-302	42	IR65261-09-1-B	57	UPLRi-7
13	Palawan	28	IR69626B	43	CT13382-8-3-M	58	LINE226
14	IR3441-97	29	عنبر بوی ایلام	44	IRAT177	59	LINE 835
15	IR70360-38-1-B-1	30	IR63371-38	45	WAB638-1		

برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌ای از سطح خاک (۳۰-۰ سانتی متر) تهیه و تجزیه آن در آزمایشگاه آب و خاک شهرستان گنبد انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول (۲) گزارش شده است.

جدول ۲: مشخصات نمونه خاک مزرعه مورد آزمایش

نوع بافت خاک	ماسه (%)	لای (%)	رس (%)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	فسفر قابل جذب (ppm)	ازت کل (%)	کربن آلی (%)	مواد خنثی شده (%)	pH	هدایت الکتریکی (mS/cm)	درصد اشباع (sp)	مشخصات نمونه خاک
Type of soil	Sand (%)	Lai (%)	Clay (%)	Absorbable Potassium (ppm)	Absorbable Phosphorus (ppm)	Total nitrogen (%)	Organic carbon (%)	Neutral material (%)	pH	Electrical conductivity (mS/cm)	Saturation (sp)	Soil sample
C	12	36	52	295	9.8	0.24	2.43	4	7.9	10.5	79.9	

بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب معمولی خیسانده شدند، سپس در پارچه‌های نخی قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند. در این مدت، بذرها چندین بار به آرامی تکان داده شدند تا جوانه‌زنی به طور یکنواخت انجام شود و برای خشک نشدن بذرها، چندین بار آب پاشی روی بذرها انجام شد. خزانه به طریق ژاپنی احداث شد، بدین ترتیب که سطح خزانه بالاتر از جوی‌های آبیاری طرفین قرار گرفت، سپس آبیاری خزانه انجام شد و زمانی که سطح آن کاملاً مرطوب شد آب اضافی خارج گردد و در نهایت بذور جوانه‌دار شده در سطح خزانه پاشیده شدند. هم‌زمان با رشد نشاها درخزانه اقدام به آماده سازی زمین اصلی شد. انتقال نشاها به زمین اصلی زمانی که طول گیاهچه‌ها به حدود ۳۰ سانتی متر رسید صورت گرفت.

اندازه واحدهای آزمایشی دو متر مربع به ابعاد (۱×۲) و با فاصله یک متر از یکدیگر در نظر گرفته شده بعد از انتساب تصادفی تیمارها به واحدهای آزمایشی نشاکاری به صورت یک بوته در هر کپه انجام شد. هر ژنوتیپ در پنج ردیف با فاصله ۲۵ سانتی‌متر بین بوته‌ها و ۲۵ سانتی‌متر بین ردیف‌ها در ردیف‌های به طول دو متر کشت شد. آبیاری مزرعه آزمایشی در هر دو محیط غرقاب و تنش، تا مرحله پنجه‌دهی ارقام به طور یکسان به طور غرقاب انجام شد سپس برای ایجاد تنش، آبیاری از ۴۰ روز پس از نشاء (مرحله حداکثر پنجه‌زنی) تا پایان فصل زراعی به فاصله ۲۵ روز انجام شد.

صفات مورد مطالعه؛ شامل طول خوشه (از گره زیر خوشه تا انتهای خوشه بدون در نظر گرفتن ریشک برحسب سانتیمتر)، تعداد خوشه چه، دانه پوک، طول خروج خوشه از غلاف (خروج خوشه‌ها از بالای غلاف برگ پرچم تا گره زیر خوشه در زمان رسیدگی)، طول برگ پرچم (از زیر برگ پرچم تا نوک آن بر حسب سانتیمتر)، عرض برگ پرچم (عرض برگ پرچم از پهن‌ترین قسمت برگ پرچم بر حسب سانتیمتر)، مساحت برگ پرچم (طول و عرض برگ پرچم در ضریب ۰/۷۵)، دانه کل خوشه، ارتفاع بوته (ارتفاع بلندترین پنجه از ناحیه طوقه در سطح خاک تا نوک خوشه بدون احتساب ریشک بر حسب سانتیمتر)، تعداد خوشه بوته، وزن کاه بوته، وزن خوشه، وزن کل بوته، باروری (از تقسیم تعداد دانه بر تعداد کل دانه‌ها)، تعداد دانه پرخوشه، وزن دانه پرخوشه، عملکرد در هکتار (عملکرد شلتوک در یک هکتار برحسب تن)، وزن کاه در هکتار (وزن کاه در یک هکتار برحسب تن)، شاخص برداشت (از تقسیم وزن دانه بر وزن کل گیاه)، تعداد روز تا گلدهی (تعداد روزهای از کاشت نشاها در زمین اصلی تا مرحله ۵۰ درصد گلدهی بوته‌های هر کرت)، تعداد روز تا رسیدگی (تعداد روزهای از کاشت نشاها در زمین اصلی تا مرحله رسیدگی کامل بوته‌های هر کرت)، دوره پر شدن دانه (از تفریق تعداد روز تا گلدهی به تعداد روز تا رسیدگی). برای رکیه صفات از هر واحد آزمایشی ۱۵ بوته به طور تصادفی با حذف اثر حاشیه انتخاب شدند و اندازه گیری انجام شد. برای تجزیه ارتباط از میانگین تکرارهای هر ژنوتیپ استفاده شد.

استخراج DNA و انجام ISSR

استخراج برگ‌های جوان گیاهچه‌های ۲۱ روزه در مرحله چهارم برگ‌ی با استفاده از روش CTAB انجام شد (1990 Doyle & Doyle). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز آگار ۱ درصد استفاده شد. در این تحقیق برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج از ۱۰ نشانگر بین ریز ماهواره (جدول ۳) استفاده شد.

جدول ۳: نشانگرهای بین ریز ماهواره (ISSR) مورد بررسی در آزمایش

نشانگرها Markers	توالی آغازگر (۳-۵) Primer sequences (3-5)	دمای اتصال Annealing temperature	نشانگرها Markers	توالی آغازگر (۳-۵) Primer sequences (3-5)	دمای اتصال Annealing temperature
ISSR-1	(CAG) ₄	59.1	ISSR-6	(ATG) ₄	41.9
ISSR-2	(GAAT) ₄	43.8	ISSR-7	(CCA) ₄	44.7
ISSR-3	(CCTA) ₄	48	ISSR-8	(CT) ₈ A	50
ISSR-4	(CT) ₈ T	50	ISSR-9	(ACTG) ₄	48
ISSR-5	(CCA) ₄	61.1	ISSR-10	(GT) ₆ CC	44

تکثیر قطعه DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master، ۱۰ میکرولیتر dH₂O، ۱ میکرولیتر DNA و ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر به همراه یک قطره روغن منیرال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکر با برنامه PCR شامل مراحل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ادامه ۳۵ چرخه به صورت واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر و مرحله توسعه رشته جدید به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای توسعه نهایی رشته‌های جدید انجام شد و سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از ژل آگار ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (ژل‌داک) قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور فرابنفش مورد مشاهده قرار گرفت. تکرارپذیری باندها به وسیله تکرار عملیات PCR و الکتروفورز مجدد آنها ارزیابی شد. باندهای تکثیر یافته بصورت یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) نمره‌دهی شد.

تجزیه‌های آماری

بعد از امتیازبندی نوارها، آماره تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از رابطه یک انجام شد.

$$PIC_i = 2 f_i(1 - f_i) \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه PIC_i، PIC نشانگر *i*ام، f_i فراوانی قطعه نشانگر *i*ام هنگام وجود و (1-f_i) فراوانی قطعه نشانگر *i*ام در حالت عدم وجود نوار است (Roldin-Ruiz *et al.*, 2000) این شاخص با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

سایر آماره‌ها مانند تعداد آلل موثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی، شاخص نشانگری و شاخص شانون

(Shannon & Weaver, 1963) با استفاده از نرم افزار Pop Gene (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شدند. برای انجام تجزیه ساختار و تفکیک کل جمعیت‌های متمایز از لحاظ ساختار ژنتیکی از نرم افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2002) استفاده شد. از آنجایی که در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود تعداد بهینه K با شبیه سازی محاسبه گردید. منظور از K تعداد زیر جمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر با استفاده از نرم افزار STRUCTURE می‌باشد. در حقیقت تعیین تعداد زیر جمعیت‌های ساختار ژنتیکی برای انجام تجزیه‌های آماری مهم مثل تجزیه ارتباط برای تعیین نشانگرهای معنی دار واقعی مرتبط با صفات اهمیت زیادی دارد. برای این منظور برای جمعیت مورد استفاده تعداد K از ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای محاسبه تعداد زیر جمعیت (K) از روش ایوانو (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. جدول ۵ آماره‌های محاسبه شده برای تعیین مقدار K برای ژنوتیپ‌های برنج را نشان می‌دهد و شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل مقدار k و ΔK از نتایج مربوط به شبیه‌سازی در نرم افزار STRUCTURE استخراج گردید. مقدار بهینه K نقطه اوج منحنی است، که با توجه به نمودار، بهترین K در این مطالعه ۲ است. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌های که پارامتر ΔK را به حداکثر می‌رساند برابر ۲ می‌باشد. انتساب افراد به زیر جمعیت نیز مطابق روش (Spataro *et al.*, 2011) انجام شد. برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن ۰/۷ یا بیشتر از آن باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ باشد به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود. در بررسی حاضر پس از تعیین تعداد K، ماتریس دودمان افراد یا ماتریس Q براساس آن تشکیل گردید. و برای انجام تجزیه ارتباط وارد نرم افزار TASSEL 4.1.32 (Bradbury *et al.*, 2007) گردید. تجزیه ارتباط با نرم افزار TASSEL با استفاده از ۴ مدل (جدول ۴) انجام گرفت.

جدول ۴: مدل آماری استفاده شده برای انجام تجزیه ارتباط نشانگرهای ISSR و صفات فنوتیپی

مدل Model	مجموعه داده‌های مورد استفاده Used data set
1.GLM ^a	Phenotype + ISSR
2.GLM	Phenotype + ISSR + Q ^b
3.MLM ^c	Phenotype + ISSR + K ^d
4.MLM	Phenotype + ISSR + K + Q

a: GLM: General linear mode

b: Q: Population structure data or Inferred ancestry of individuals

c: MLM: Mixed linear model

d: K: Kinship data derived from general similarity in genetic background arising from shared kinship

a مدل خطی عمومی

b داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد

c مدل خطی مخلوط

D داده‌های خویشاوندی حاصل از تشابه کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی

این نرم افزار امکان انجام تمام آزمون‌های مرتبط با مدل‌های و رویه‌های مانند GLM و MLM را فراهم می‌کند. رویه GLM رویه‌ای است که بدون دخالت ساختار جمعیت، ارتباط بین نشانگر و صفات اندازه‌گیری شده را به ما می‌دهد، نمی‌تواند خیلی مورد اعتماد باشد و کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً بیشتر از رویه MLM برای درک بهتر ارتباط بین نشانگر و صفت استفاده می‌شود چون در پیدا کردن ارتباط، هم ماتریس‌های ساختار جمعیت و هم خویشاوندی بین افراد دخالت می‌دهد و اثرات ناشی از این عوامل را کم می‌کند و ارتباطات معنی‌دار شناسایی شده بین نشانگر و صفت از اطمینان و اعتبار بیشتری برخوردارند (Agrama et al., 2007).

نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس ۱۰ نشانگر بین ریزماهواره در مجموع ۱۴۴ باند با میانگین ۱۴/۴ باند به ازای هر جایگاه نشانگری ایجاد نمود و از ۱۴۴ باند تشکیل شده ۶۹/۱۷ درصد از باندها چندشکل بودند. آغازگر 3- ISSR با ۱۹ باند و توالی آغازگری 4- CCTA (بیشترین تعداد باند و آغازگر 5- ISSR با ۸ باند و توالی آغازگری 4- CCA) کمترین تعداد باند را به خود اختصاص دادند. آغازگر 10- ISSR با توالی آغازگری 6- (GT) CC بیشترین درصد چند شکلی (۸۰ درصد) و آغازگر 9- ISSR با توالی آغازگری 4- ACTG) کمترین درصد چند شکلی (۵۵/۵۵) داشتند. نشانگر 10- ISSR با ۳۴/۸ بیشترین شاخص نشانگری (MI) و نشانگر 4- ISSR با ۲۸/۲۳ کمترین مقدار شاخص نشانگری را داشتند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها و معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (Botstein et al., 1980). بیشترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) را آغازگر 7- ISSR با ۰/۴۹ و آغازگرهایی 2- ISSR، 8- ISSR، 9- ISSR و 10- ISSR با ۰/۴۷ کمترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند. 3- ISSR بالاترین میانگین تعداد آلل موثر (۱/۹۵) بالاترین میانگین شاخص نی (۰/۴۷) و شاخص شانون (۰/۶۷) را به خود اختصاص داده بودند. 9- ISSR کمترین میانگین تعداد آلل موثر (۱/۵۸)، شاخص شانون (۰/۶۳) و شاخص نی (۰/۴۴) را دارا بود. آغازگر 10- ISSR ((GT)6 CC) با دارا بودن بیشترین درصد چندشکلی (۸۰ درصد) و شاخص نشانگری (۳۸/۴) نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برنج بود (جدول ۵). چمنی محمص و همکاران (Chmani Mohassess et al., 2011) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹ لاین والدینی برنج شامل ۴ لاین ایرانی و ۵ لاین استحصالی از IRRRI از ۱۲ نشانگر 24- ISSR و 24- نشانگر SSR استفاده نمودند. مجموع نشانگرهای SSR و ISSR در این تحقیق ۱۵۰ باند تشکیل شد که ۱۲۰ باند چندشکل بودند و مجموع چندشکلی ۶۸ درصد بود. تعداد باند برای هر نشانگر 2- تا ۱۷ متغییر بود و میانگین تعداد باند هر نشانگر معادل ۶/۵ برآورد شد. در مطالعه علمی و کرمی (Aalami & Karami, 2016) که بر روی ۴۰ رقم بومی و اصلاح شده برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای 309- ISSR، IRAP و REMA انجام گرفت با استفاده از این نشانگرها در کل ۳۰۹ نشانگر تشکیل

گردید که ۲۷۲ نشانگر چندشکل بودند تعداد نوارها بین ۹ تا ۲۱ نوار متغییر بودند آنها میانگین تنوع ژنی، شاخص شانون و محتوای اطلاعات چند شکلی را به ترتیب ۰/۳۹، ۰/۵۷ و ۰/۳۵ گزارش نمودند. نتایج تحقیق آنها نیز مانند مطالعه حاضر، تکثیر موفق و نوارهای واضح روی ژل بود که به راحتی بین ژنوتیپها قابل نمره دهی و ارزیابی بودند، ضمن اینکه نشانگرهای ISSR در هر دو تحقیق چند شکلی بالایی را نشان دادند که دلالت بر کارایی این نشانگرها برای ارزیابی های ژنتیکی می باشد و همچنین تعداد نوارها تولید شده متغییر تقریباً مشابه بودند.

جدول ۵: تعداد آلل موثر (NE)، شاخص نی (H)، شاخص شانون (I)، درصد چندشکلی (POL)، محتوای اطلاعات چندشکل

(PIC) و شاخص نشانگری (MI) برای هر نشانگر بین ریزماهواره

نشانگرها Markers	NE	H	I	باندهای یک شکل Mono-Bands	باندهای چندشکل Poly-Bands	کل باندها Total bands	POL	PIC	MI
ISSR-1	1.79	0.42	0.61	4	7	11	63.63	0.48	30.54
ISSR-2	1.84	0.45	0.64	3	11	14	78.57	0.47	36.92
ISSR-3	1.95	0.48	0.67	6	13	19	68.42	0.48	32.84
ISSR-4	1.93	0.47	0.67	7	10	17	58.82	0.48	28.23
ISSR-5	1.83	0.44	0.64	2	6	8	75	0.48	36
ISSR-6	1.84	0.45	0.64	4	13	17	76.47	0.48	36.70
ISSR-7	1.85	0.45	0.64	5	12	17	70.58	0.49	34.58
ISSR-8	1.82	0.44	0.63	6	11	17	64.70	0.47	30.40
ISSR-9	1.58	0.34	0.52	4	5	9	55.55	0.47	26.10
ISSR-10	1.67	0.36	0.54	3	12	15	80	0.47	38.4
میانگین	-	-	-	4.4	10	14.4	69.17	0.47	33.07

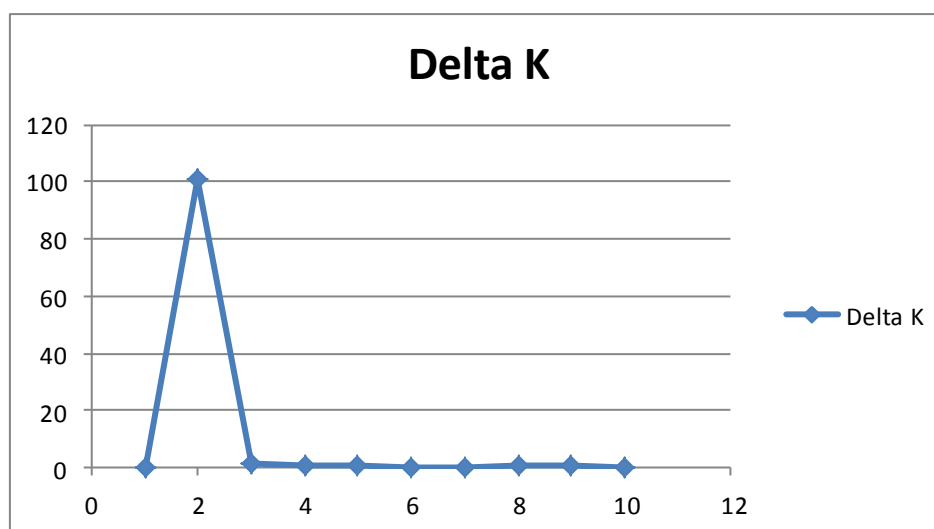
تجزیه ساختار ژنتیکی

تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTURE، امکان شکستن کل جمعیت به زیر جمعیت های با ساختارهای متفاوت متحمل را فراهم می سازد. زیر جمعیت های تشکیل شده از لحاظ ژنتیکی متمایز از هم می باشند و چنانچه ژنوتیپ های به صورت اختلاط یافته باشند، پس از انجام این تجزیه قابل تشخیص خواهند بود (Dadras, 2012; Pritchard *et al.*, 2000). برطبق نتایج نرم افزار STRUCTURE، K و ΔK که به ترتیب تعداد زیر گروه ها و میزان تغییرات آنها با توجه به شبیه سازی های انجام شده در نرم افزار می باشد، استخراج و نمودار دو بعدی آن رسم شد. شکل ۱ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می دهد که با توجه به نمودار بهترین K در این مطالعه که در واقع نقطه اوج منحنی است، ۲ می باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه هایی که پارامتر ΔK را به حداکثر خود می رساند برابر ۲ می باشد. جدول ۷ درصد عضویت ۵۹ ژنوتیپ برنج را نشان می دهد براین اساس ۳۲ ژنوتیپ شامل Panda، IR66421-062-1-1-2، IR66417-18-1-1-1، IR66417-18-1-1-1، IR60080-42، IR70360-38-1-B-1، IR3441-97، Palawan، IR55419-04، IR68702-072-1-4-B، Caiapo، 53236-342، CT6510-، NONABOKA، IR62761-20، IR62752-07، IR30، USEN، سنگ جو، IRAT170، IR60080-48، IR77298-5-6، AUS196، IR55423-01، IR63372-15، IR63377-08، IR63371-38، عنبربوی ایلام، IR69626B، IR7471-199-1-302.24-1-2، LINE 835، IRAT212، CT6516-24-3-2 منتسب به گروه ۱ شدند و تعداد ۱۷ ژنوتیپ شامل IR 47686-، IR67015-49-2-6

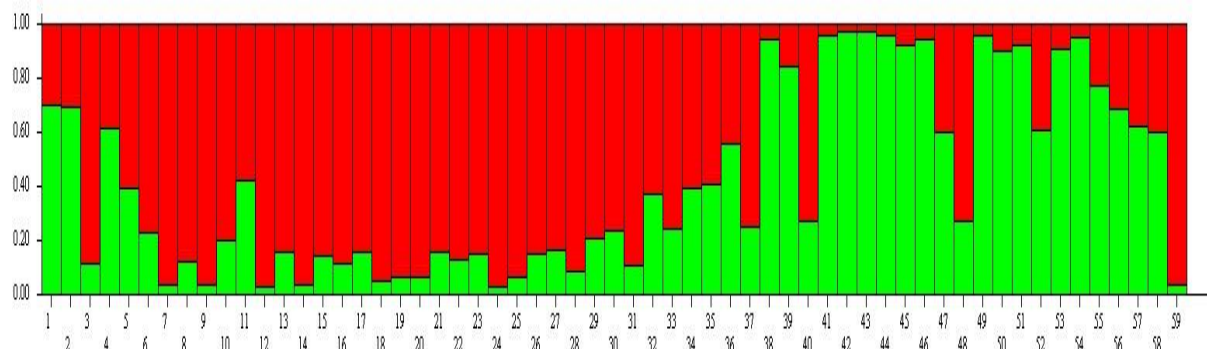
JRAT177 .CT13382-8-3-M .IR65261-09-1-B .CT13377-4-2-M .IR66424-1-2-1-5 .JR57924-24 .12-5-B-1
 JR70358-84-1-1 .IRGC-15092RT-1031-62 .JRAT216 .JR 55411-50 .LINE 213 .JR60080-46A .WAB638-1
 IR65907-116- .JRFAON-308 .Way Rarem ژنوتیپ‌های در آمدند. ۲ گروه به عضویت گروه ۲ در آمدند. ژنوتیپ‌های
 1-B .IR63380-08 .B6144F-MR-6-0-0 .CT6510-24-1-2 .Pegaso .SAMBA MAHSURI .UPLRi-7 .LINE226 هم جزء
 ژنوتیپ‌های مخلوط بودند. بدین معنی که چون درصد عضویت کمتر از ۰/۶۹ داشتند بنابراین نتوانستند به هیچ کدام از گروه‌ها
 منتسب گردند. بار پلات مستخرج از STRUCTURE در شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۶: آماره‌های محاسبه شده برای مقدار بهینه K با استفاده از نرم افزار STRUCTURE

k	LN(avreg)	STDEV	L'(K)	L"(K)	[L"K]	Delta K
1	-3822.61	0.808909				
2	-3664.56	3.180566	158.05	-321.28	321.28	101.0135
3	-3827.79	63.80993	-163.23	108.57	108.57	1.701459
4	-3882.45	113.0858	-54.66	-83.31	83.31	0.736698
5	-4020.42	93.72992	-137.97	70.22	70.22	0.749174
6	-4088.17	157.0991	-67.75	33.72	33.72	0.214642
7	-4122.2	112.9778	-34.03	-16.42	16.42	0.145338
8	-4172.65	125.4902	-50.45	-115.79	115.79	0.922702
9	-4338.89	300.2077	-166.24	254.64	254.64	0.848213
10	-4250.49	221.8546	88.4	-88.4	88.4	0.398459



شکل ۱: نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد بهینه K



شکل ۲: بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از نرم افزار STRUCTURE و نشانگرهای ISSR که در ۲ بخش رنگی تقسیم شده است. نام ژنوتیپ با شماره آنها در جدول ۱ آورده شده است، رنگ قرمز و سبز به ترتیب سهم عضویت در گروه یک و دو را نشان می‌دهد.

جدول ۷: درصد عضویت ژنوتیپ‌ها براساس نتایج مستخرج از نرم افزار STRUCTURE.

شماره	ژنوتیپ	درصد	درصد	شماره	ژنوتیپ	درصد عضویت	درصد
Number	Genotype	عضویت گروه ۱	عضویت گروه ۲	Number	Genotype	گروه ۱ Member percentage of group 1	گروه ۲ Member percentage of group 2
1	IR67015-49-2-6	0.294	0.706	31	IR63372-15	0.891	0.109
2	IR 47686-12-5-B-1	0.307	0.693	32	IR63377-08	0.626	0.374
3	Panda	0.879	0.121	33	IR55423-01	0.753	0.247
4	Way Rarem	0.379	0.621	34	IR63380-08	0.605	0.395
5	IRFAON-308	0.602	0.398	35	B6144F-MR-6-0-0	0.59	0.41
6	IR66421-062-1-1-2	0.767	0.233	36	CT6510-24-1-2	0.436	0.564
7	IR66417-18-1-1-1	0.961	0.039	37	AUS196	0.743	0.257
8	IR 53236-342	0.874	0.126	38	IR57924-24	0.055	0.945
9	Caiapo	0.962	0.038	39	IR66424-1-2-1-5	0.154	0.846
10	IR68702-072-1-4-B	0.799	0.201	40	CT6516-24-3-2	0.727	0.273
11	IR65907-116-1-B	0.574	0.426	41	CT13377-4-2-M	0.038	0.962
12	IR55419-04	0.968	0.032	42	IR65261-09-1-B	0.026	0.974
13	Palawan	0.84	0.16	43	CT13382-8-3-M	0.028	0.972
14	IR3441-97	0.961	0.039	44	IRAT177	0.041	0.959
15	IR70360-38-1-B-1	0.856	0.144	45	WAB638-1	0.073	0.927
16	IR60080-42	0.88	0.12	46	IR60080-46A	0.056	0.944
17	IR77298-5-6	0.837	0.163	47	Pegaso	0.4	0.6
18	IR60080-48	0.949	0.051	48	IRAT212	0.722	0.278
19	IRAT170	0.934	0.066	49	LINE 213	0.04	0.96
20	سنگ جو	0.934	0.066	50	IR 55411-50	0.099	0.901
21	USEN	0.838	0.162	51	IRAT216	0.077	0.923
22	IR30	0.87	0.13	52	IRGC-15092RT-1031-62	0.392	0.608
23	IR62752-07	0.845	0.155	53	IR70358-84-1-1	0.091	0.909
24	IR62761-20	0.97	0.03	54	CT6510-24-7-8	0.049	0.951
25	NONABOKA	0.929	0.071	55	DAGADDESHI	0.227	0.773
26	CT6510-24-1-2	0.846	0.154	56	SAMBA MAHSURI	0.311	0.689
27	IR7471-199-1-302	0.83	0.17	57	UPLRi-7	0.373	0.627
28	IR69626B	0.908	0.092	58	LINE226	0.399	0.601
29	عنبر بوی ایلام	0.792	0.208	59	LINE 835	0.963	0.037
30	IR63371-38	0.758	0.242				

تجزیه ارتباط

تجزیه ارتباط با استفاده از نرم افزار TASSEL اجرا شد که در آن از ماتریس Q مستخرج از نرم افزار STRUCTURE استفاده گردید و اگر اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در نظر گرفته نشود نتایج مثبت کاذب به وجود خواهد آمد (Brescghello & Sorells, 2006).

در این بررسی از ۴ مدل آماری برای تجزیه ارتباط استفاده شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. در شرایط نرمال و تنش خشکی برای ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد به ترتیب ۱۵۹ و ۱۴۸ نشانگر معنی‌دار شدند (جدول‌های ۸، ۹). مدل MLM در کل توانست در شرایط نرمال ۹۶ نشانگر و در شرایط تنش خشکی ۸۰ نشانگر معنی‌دار را مرتبط با ۲۱ صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد شناسایی نماید، بدیهی است در مدل GLM تعداد زیادی از این نشانگرها در شرایط نرمال و تنش خشکی (به ترتیب ۱۳۰ و ۱۳۹) در سطح احتمال ۵ درصد شناسایی شدند (جدول ۸).

در شرایط نرمال بالاترین ضریب تبیین به نشانگر ISSR7-2 با توجه به تغییرات ۲۹/۲۷ درصد از تغییرات عملکرد با مدل MLM در سطح پنج درصد اختصاص داشت، همچنین نشانگر ISSR7-2 ۲۶/۹۴ درصد از تغییرات وزن دانه پر در خوشه با مدل GLM در سطح پنج درصد را به خود اختصاص داد. در شرایط تنش خشکی بالاترین ضریب تبیین به نشانگر ISSR1-6 با توجه به تغییرات ۲۲/۷۷ درصد از تغییرات روز تا خوشدهی با مدل GLM در سطح پنج درصد اختصاص داشت، همچنین نشانگر ISSR2-6 ۱۴/۲۰ درصد از تغییرات عرض برگ پرچم با مدل MLM در سطح پنج درصد را به خود اختصاص داد. در جدول ۹ برای نشانگرهای معنی‌دار سطح احتمال معنی‌داری به همراه ضریب تبیین نشانگر آورده شده است.

در این پژوهش نشانگرهای ISSR2-3 و ISSR2-7 برای صفت طول خوشه در هر چهار مدل به صورت مشترک در سطح احتمال پنج درصد هم در دو شرایط نرمال و خشکی معنی‌دار به دست آمد و برای صفت تعداد دانه پر در خوشه در شرایط نرمال نشانگرهای ISSR1-1 و ISSR9-5 در چهار مدل معنی‌دار برآورد شد، ولی در شرایط خشکی نشانگرهای ISSR1-6 و ISSR10-8 در چهار مدل به صورت مشترک معنی‌دار برآورد گردیدند. یو و باکلا (Yu and Buckler, 2006) به منظور بهبود بخشیدن به نتایج و کاهش اثر برآورد مثبت دروغین از مدل MLM در بررسی صفتهایی مثل زمان گلدهی، وزن خوشه و قطر خوشه در ذرت استفاده نمودند و نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با مدل‌های خطی گزارش کردند. در این مطالعه نیز هم از روش GLM و هم روش MLM برای کاهش نتایج دروغین استفاده گردید. دادرس و همکاران (Dadras et al., 2014). در بررسی خود که بر روی ۵۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر AFLP انجام دادند برای صفت شاخص سطح برگ نشانگر E110-M160-23 را در هر چهار مدل معنی‌دار گزارش نمودند. در پژوهش حاضر برای صفت وزن خوشه در یک بوته در شرایط نرمال نشانگرهای ISSR3-1، ISSR7-12 و ISSR10-5 در تمامی مدل‌ها معنی‌دار به دست آمد و این در صورتی است که در شرایط تنش خشکی نشانگر ISSR6-11 در تمامی مدل‌ها معنی‌دار به دست آمد.

در شرایط تنش خشکی نشانگر ISSR2-8 بیشترین ضریب تبیین در صفات تعداد دانه پوک، باروری، وزن دانه پر و عملکرد و در شرایط نرمال ISSR7-2 بیشترین ضریب تبیین در صفات تعداد خوشه‌چه، تعداد خوشه در بوته، وزن دانه پر خوشه و عملکرد شناسایی شد. باید خاطر نشان نمود شناسایی نشانگرهای مرتبط با چندین صفت مهم می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشد. آگراما و همکاران (Agrama *et al.*, 2007) با استفاده از مکان‌یابی ارتباطی، ارتباط ۱۲۳ نشانگر ریز ماهواره را با صفات مختلف دانه در ۱۰۳ ژنوتیپ برنج مورد بررسی قرار دادند و علاوه بر تایید اعتبار مدل MLM، ارتباط معنی‌دار پنج مکان با صفات عملکرد دانه، عرض دانه نسبت طول به عرض دانه، شش مکان با طول دانه و چهار مکان با وزن دانه را با استفاده از این مدل گزارش نمودند. در مطالعه حاضر صفت عملکرد در هکتار در شرایط نرمال با نشانگر ISSR7-2 در هر چهار مدل معنی‌دار به دست آمد و در شرایط تنش خشکی این صفت با نشانگر ISSR2-8 در هر چهار مدل معنی‌دار به دست آمد.

روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) در تحقیقی برای بررسی تجزیه ارتباط ۵۵ ژنوتیپ جو با ۱۴ صفت زراعی با نشانگرهای SSR، SAMPLE و AFLP انجام دادند. تجزیه ارتباط با استفاده از ۵۱۹ نوار چندشکل مشتق از ۲۰ نشانگر SSR، دو نشانگر SAMPLE و هشت ترکیب آغازگری AFLP انجام شد. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد در کل به ترتیب ۱۳۱، ۴۳ و ۱۶۶ نشانگر SSR، SAMPLE و AFLP حداقل با یکی از ۱۴ صفت ارتباط معنی‌داری دارند. از بین این تعداد با در نظر گرفتن هر دو مدل GLM و MLM در بررسی آن‌ها، تعداد ۵۱ نشانگر به عنوان نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش شناسایی شدند و در نهایت اظهار داشتند این نشانگرهای معنی‌دار پس از تایید و اعتبارسنجی می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی بسیار کاربردی باشند. در بررسی که به منظور شناسایی جایگاه صفات کمی و تجزیه ارتباط در ۱۵۵ ذرت اینبرد با ۱۵۳۶ SNP انجام شد. نشان داد که استفاده از مدل MLM ۱/۱۵، ۱/۱۵ و ۱/۶۶ درصد SNP ها ارتباط معنی‌دار با تمامی محتوای توکرفول در دانه ذرت، ارتفاع گیاه و طول دانه در سطح یک درصد داشتند. همچنین این تحقیق نشان داد که برای تمامی صفات استفاده از مدل مبتنی بر K و مدل مبتنی بر Q به تنهایی عملکرد خوبی ندارند اما استفاده از مدل مبتنی بر K و Q به طور مشترک در مدل MLM نتایج بهتری و موثرتری را در بر دارد (Yang *et al.*, 2010).

این پژوهش با استفاده از مجموعه‌ی متنوعی از ژنوتیپ‌های برنج و ۱۰ نشانگر ISSR به شناسایی نشانگرهایی منجر شد که پیوسته به مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مهم برنج در تنش خشکی بودند. این نشانگرها در صورت تأیید ممکن است در برنامه‌های اصلاحی و بهبود صفات در شرایط تنش خشکی بسیار مفید و کارا باشند.

جدول ۸. نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات مختلف در شرایط نرمال با ۴ مدل آماری

نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در Significant markers in 5% probability level

صفات traits	نشانگرها Marker	مدل ۱ Model 1		نشانگرها Marker	مدل ۲ Model 2		نشانگرها Marker	مدل ۳ Model 3		نشانگرها Marker	مدل ۴ Model 4	
		سطح احتمال Prob	R ²		سطح احتمال Prob	R ²		سطح احتمال Prob	R ²		سطح احتمال Prob	R ²
طول خوشه length Panicle	ISSR2-3	0.01809	0.09415	ISSR2-3	0.01665	0.11376	ISSR2-3	0.02463	0.09187	ISSR2-3	0.02652	0.11056
	ISSR2-7	0.00773	0.11799	ISSR2-7	0.02433	0.10135	ISSR2-7	0.01262	0.11437	ISSR2-7	0.03696	0.09714
	ISSR2-10	0.04702	0.06743	ISSR2-10	0.03902	0.08591				ISSR2-10	0.0489	0.0861
تعداد خوشه چه Spikelet number	ISSR5-5	0.02465	0.08547	ISSR3-10	0.008	0.13893	ISSR5-5	0.03529	0.08016	ISSR3-8	0.03919	0.0957
	ISSR7-2	0.02764	0.08226	ISSR4-7	0.04152	0.0847				ISSR3-10	0.03856	0.09635
				ISSR5-2	0.03516	0.09018				ISSR7-2	0.03086	0.10538
				ISSR7-2	0.00701	0.14321				ISSR7-11	0.03239	0.1034
				ISSR7-11	0.04161	0.08463				ISSR9-5	0.04625	0.08911
				ISSR9-5	0.03807	0.08756						
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain per panicle	ISSR1-4	0.01483	0.09972	ISSR1-4	0.02423	0.10695	ISSR1-4	0.02564	0.09054	ISSR1-4	0.04401	0.09317
	ISSR2-1	0.00842	0.1156	ISSR2-1	0.03444	0.09483	ISSR2-1	0.01263	0.11434	ISSR7-7	0.03171	0.10666
	ISSR6-3	0.03007	0.0799	ISSR7-7	0.01976	0.11397	ISSR6-11	0.03814	0.07767	ISSR9-2	0.03597	0.10143
	ISSR6-11	0.02689	0.08302	ISSR10-5	0.00128	0.20605	ISSR10-5	0.00248	0.17285	ISSR10-5	0.00335	0.2083
	ISSR7-10	0.04465	0.06887									
	ISSR10-5	6.47E-04	0.18609									
طول خروج خوشه از غلاف length of the panicle	ISSR2-9	0.00854	0.11522	ISSR7-2	0.01943	0.11546	ISSR2-9	0.00965	0.12352	ISSR1-6	0.02551	0.10879
	ISSR6-6	0.02904	0.08087	ISSR7-6	0.02033	0.11389	ISSR7-6	0.01267	0.1141	ISSR6-6	0.03463	0.09674
	ISSR7-6	0.00506	0.12985	ISSR10-1	0.03833	0.09186	ISSR10-1	0.03595	0.07948	ISSR6-9	0.03431	0.09711
	ISSR8-3	0.04901	0.06628	ISSR10-9	0.04453	0.08667				ISSR7-6	0.01775	0.12346
	ISSR10-1	0.02247	0.08806	ISSR10-12	0.03362	0.09642				ISSR10-1	0.0427	0.08867
	ISSR10-12	0.04266	0.07013							ISSR10-7	0.04799	0.08423
طول برگ پرچم Flag leaf length	ISSR2-8	0.0355	0.07525	ISSR2-8	0.01976	0.11202	ISSR2-8	0.04116	0.07525	ISSR2-8	0.02695	0.11202
	ISSR7-3	0.01208	0.10549	ISSR7-3	0.01894	0.11346	ISSR7-3	0.01638	0.10549	ISSR7-3	0.02604	0.11346
عرض برگ پرچم Flag leaf width	ISSR1-7	0.00459	0.13253	ISSR1-5	0.04708	0.08328	ISSR1-7	0.00933	0.12483	ISSR1-7	0.01179	0.1491
	ISSR2-1	0.0272	0.08271	ISSR1-7	0.01056	0.13422	ISSR2-6	0.00615	0.13959	ISSR2-6	0.00537	0.18522
	ISSR2-6	5.95E-04	0.18834	ISSR2-6	0.00165	0.19601	ISSR3-7	0.03341	0.08191	ISSR3-7	0.01985	0.12623
	ISSR2-7	0.04992	0.06577	ISSR3-7	0.01387	0.12494	ISSR10-1	0.03903	0.07693	ISSR3-9	0.02605	0.11462
	ISSR3-7	0.02294	0.08748	ISSR3-9	0.02213	0.10903	ISSR10-2	0.03788	0.07788	ISSR10-1	0.03432	0.10309
	ISSR6-4	0.03357	0.07682	ISSR6-11	0.02711	0.1021						
	ISSR6-9	0.03401	0.07646	ISSR10-1	0.02228	0.1088						
	ISSR7-9	0.03183	0.07831	ISSR10-2	0.04163	0.08746						
تعداد دانه کل خوشه Number of grain per plant	ISSR10-1	0.0118	0.10614									
	ISSR10-2	0.00716	0.12013									
	ISSR10-12	0.03838	0.07308									
	ISSR2-1	0.04764	0.06707	ISSR2-1	0.02257	0.10987	ISSR3-6	0.03687	0.07875	ISSR2-9	0.03268	0.10366
تعداد خوشه در بوته Number of panicle	ISSR5-3	0.0485	0.06657				ISSR5-3	0.00307	0.16488	ISSR3-6	0.03903	0.09645
							ISSR5-5	0.01608	0.10609	ISSR6-8	0.0337	0.10241
							ISSR6-13	0.02526	0.09102	ISSR6-13	0.037	0.09861
							ISSR10-7	0.03258	0.08273	ISSR9-5	0.04388	0.09175
ارتفاع بوته Plant height	ISSR4-7	0.00281	0.14611	ISSR4-7	0.02113	0.11237	ISSR4-7	0.00774	0.13134	ISSR4-7	0.02675	0.11383
	ISSR8-3	0.02967	0.08027	ISSR6-10	0.04889	0.08331	ISSR9-2	0.02406	0.09258	ISSR8-3	0.03998	0.09711
	ISSR9-2	0.01159	0.10665	ISSR7-9	0.04571	0.08563						
				ISSR8-3	0.03265	0.09727						
تعداد خوشه در بوته Number of panicle	ISSR4-3	0.01276	0.10394	ISSR7-2	3.48E-04	0.24976	ISSR4-3	0.01919	0.10013	ISSR7-2	0.00182	0.23795
	ISSR7-2	0.00267	0.1475	ISSR9-1	0.02125	0.11236						
وزن کاه بوته Number of panicle	ISSR9-1	0.03235	0.07785									
	ISSR8-6	0.00609	0.12466	ISSR7-3	0.02308	0.1095	ISSR8-6	0.02398	0.09275	ISSR8-6	0.03389	0.10351
	ISSR8-10	0.00909	0.11347	ISSR8-6	0.01296	0.12954	ISSR8-10	0.02722	0.08859	ISSR8-10	0.02506	0.11614
			ISSR8-10	0.00274	0.18254							

ارتفاع بوته Plant height	ISSR3-1	0.01568	0.09817	ISSR3-1	0.01279	0.12902	ISSR3-1	0.02886	0.08665	ISSR3-1	0.02772	0.11202	
وزن خوشه بوته Panicle weight	ISSR6-1	0.03106	0.07899	ISSR6-3	0.03649	0.09291	ISSR6-1	0.03422	0.08114	ISSR7-12	0.03695	0.10007	
	ISSR6-3	0.01017	0.1103	ISSR7-12	0.01553	0.12236	ISSR6-3	0.03056	0.08478	ISSR10-5	0.01558	0.13682	
	ISSR6-5	0.04987	0.0658	ISSR10-5	0.01022	0.1367	ISSR7-12	0.00928	0.12502				
	ISSR7-12	0.00378	0.13795				ISSR10-5	0.00665	0.13677				
	ISSR10-5	0.00313	0.14314										
وزن کل بوته Total plant weight	ISSR3-1	0.02724	0.08267	ISSR5-1	0.01558	0.12291	ISSR3-1	0.03266	0.08267	ISSR5-1	0.02161	0.12291	
	ISSR6-3	0.03535	0.07537	ISSR7-7	0.04495	0.08621	ISSR6-3	0.04101	0.07537	ISSR8-10	0.02077	0.1246	
مساحت برگ پرچم Flag leaf area	ISSR1-7	0.00585	0.12577	ISSR1-7	0.01263	0.1257	ISSR1-7	0.01028	0.12147	ISSR1-7	0.02012	0.12346	
	ISSR2-1	0.0375	0.07373	ISSR2-6	0.0047	0.15838	ISSR2-1	0.02922	0.08627	ISSR2-6	0.01305	0.14206	
تعداد دانه پر در خوشه number of filled Seeds	ISSR2-6	0.00132	0.16693	ISSR6-11	0.02113	0.10851	ISSR2-6	0.01374	0.11148	ISSR6-11	0.04467	0.0907	
	ISSR2-7	0.04847	0.06659	ISSR10-1	0.0311	0.09556	ISSR10-2	0.02559	0.0906	ISSR10-1	0.03312	0.10273	
	ISSR3-13	0.04448	0.06897										
	ISSR6-4	0.04939	0.06607										
	ISSR7-9	0.03737	0.07382										
	ISSR10-1	0.01459	0.10019										
	ISSR10-2	0.01729	0.09541										
	ISSR10-12	0.04505	0.06862										
	درصد باروری Fertility	ISSR1-4	0.04921	0.06616	ISSR1-4	0.02618	0.10356	ISSR5-6	0.03162	0.08371	ISSR1-4	0.03758	0.09974
		ISSR5-6	0.02375	0.0865	ISSR4-1	0.02592	0.10391	ISSR6-11	0.03539	0.08008	ISSR4-10	0.03171	0.10679
ISSR6-11		0.03015	0.07982	ISSR4-10	0.02636	0.10332	ISSR8-10	0.03833	0.07753	ISSR5-6	0.00775	0.1688	
ISSR8-10		0.02968	0.08027	ISSR5-6	0.00384	0.16861	ISSR10-5	0.01542	0.10755	ISSR10-5	0.03928	0.09792	
ISSR10-5		0.00939	0.11256	ISSR10-5	0.01308	0.12729							
وزن دانه های پر خوشه Weight of filled grain per panicle	ISSR1-1	0.0339	0.07655	ISSR1-1	0.01749	0.11312	ISSR1-1	0.03953	0.07655	ISSR1-1	0.03442	0.09991	
	ISSR1-6	0.02574	0.08426	ISSR7-11	0.0166	0.11485	ISSR1-6	0.03109	0.08426	ISSR7-11	0.0332	0.10136	
	ISSR2-7	0.02129	0.08957	ISSR9-3	0.02555	0.10063	ISSR2-7	0.02641	0.08957	ISSR9-3	0.02771	0.10868	
	ISSR9-5	0.02866	0.08124	ISSR9-5	9.43E-04	0.20682	ISSR9-5	0.03413	0.08124	ISSR9-5	0.00397	0.19366	
	ISSR10-7	0.03347	0.07691				ISSR10-7	0.03908	0.07691				
عملکرد در هکتار Yield per hectare	ISSR2-6	0.00564	0.1268	ISSR2-6	0.02129	0.10748	ISSR5-5	0.04394	0.07315	ISSR7-2	4.99E-04	0.29274	
	ISSR5-5	0.02669	0.08324	ISSR7-2	3.23E-05	0.30775	ISSR7-2	0.00122	0.19972	ISSR7-6	0.03905	0.09393	
تعداد روز تا خوشه دهی Days to Flowering	ISSR7-2	2.75E-04	0.2088	ISSR7-6	0.03489	0.09106							
	ISSR1-6	0.0026	0.14822	ISSR1-6	0.00115	0.21115	ISSR1-6	0.00484	0.14821	ISSR1-6	0.00339	0.2079	
	ISSR4-9	0.0314	0.07869	ISSR3-2	0.03746	0.09262	ISSR4-9	0.03697	0.07868	ISSR3-2	0.04435	0.09296	
	ISSR6-4	0.03154	0.07857	ISSR6-4	0.0435	0.08743	ISSR6-4	0.03712	0.07855	ISSR6-11	0.02371	0.11907	
	ISSR6-11	0.03403	0.07644	ISSR6-11	0.01589	0.12236	ISSR6-11	0.03966	0.07644	ISSR10-5	0.04405	0.09323	
تعداد روز تا رسیدگی Days to maturity	ISSR7-6	0.02494	0.08514	ISSR7-6	0.04633	0.08526	ISSR7-6	0.03027	0.08512				
				ISSR10-5	0.03643	0.09358							
	ISSR3-12	0.04477	0.06879	ISSR1-6	0.0354	0.09365	ISSR4-10	0.01087	0.11954	ISSR1-6	0.04319	0.09349	
	ISSR4-10	0.00673	0.12187	ISSR2-5	0.01632	0.12025	ISSR6-11	0.03961	0.07648	ISSR2-5	0.02645	0.11374	
	ISSR6-11	0.0332	0.07713	ISSR6-11	0.0272	0.1027	ISSR10-5	0.04055	0.07573	ISSR6-11	0.03602	0.1009	
مدت زمان رسیدگی Grain filling duration	ISSR10-5	0.03325	0.07709	ISSR7-6	0.02996	0.09938				ISSR10-5	0.04091	0.09569	
				ISSR10-5	0.02856	0.10102							
	ISSR1-6	0.04824	0.06672	ISSR1-2	0.02782	0.09955	ISSR1-7	0.01433	0.11001	ISSR1-2	0.0395	0.09672	
	ISSR1-7	0.00849	0.11538	ISSR1-6	0.01416	0.12222	ISSR4-8	0.02329	0.0937	ISSR2-5	0.03744	0.0989	
	ISSR3-12	0.02602	0.08395	ISSR2-5	0.02698	0.10059	ISSR5-1	0.02008	0.09862	ISSR3-11	0.01574	0.13548	
	ISSR4-8	4.09E-04	0.19831	ISSR2-10	0.03526	0.0916	ISSR5-5	0.0469	0.07112	ISSR6-13	0.03557	0.10099	
	ISSR5-1	0.00419	0.13509	ISSR3-11	0.00409	0.16339	ISSR6-7	0.01662	0.10498	ISSR8-11	0.01871	0.128	
							ISSR10-11	0.00419	0.15344	ISSR10-11	0.01686	0.13251	
	ISSR6-4	0.00988	0.11113	ISSR4-8	0.02274	0.10633							
	ISSR6-7	1.90E-04	0.21841	ISSR6-7	0.01942	0.11162							
	ISSR7-1	0.01591	0.09775	ISSR6-13	0.04396	0.08421							
	ISSR7-4	0.04042	0.07164	ISSR7-1	0.02676	0.10087							
	ISSR7-5	0.03116	0.0789	ISSR8-4	0.0471	0.08191							
	ISSR8-4	0.02333	0.08701	ISSR8-11	0.0159	0.11833							
				ISSR10-11	0.01179	0.12835							
ISSR9-4	0.03078	0.07924											
ISSR10-9	0.03837	0.07309											
ISSR10-11	0.00514	0.12938											
شاخص برداشت Harvest index	ISSR2-3	0.0357	0.0751	ISSR3-8	0.0494	0.0831	ISSR6-8	0.03454	0.08084	ISSR7-2	0.03024	0.10697	
	ISSR5-5	0.04552	0.06833	ISSR7-2	0.03724	0.09289	ISSR8-10	0.01287	0.11369	ISSR8-10	0.02376	0.117	

ISSR6-8	0.02853	0.08137	ISSR7-3	0.01657	0.12101
ISSR8-10	9.55E-04	0.17561	ISSR8-10	0.00125	0.20855
			ISSR10-5	0.04019	0.09025

جدول ۹- نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات مختلف در شرایط تنش خشکی با ۴ مدل آماری

نشانگرهای معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در Model 1، 2، 3 و 4

صفات	نشانگرها	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4				
		سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R2	سطح احتمال	R ²			
طول خوشه length Panicle	ISSR2-3	0.03802	0.07334	ISSR2-3	0.03311	0.08965	ISSR2-3	0.04421	0.073	ISSR2-3	0.04026	0.08965
	ISSR2-7	0.01179	0.10616	ISSR2-7	0.03659	0.08644	ISSR2-7	0.01625	0.10575	ISSR2-7	0.04384	0.08644
تعداد خوشه چه Spikelet number	ISSR4-7	0.03358	0.07681	ISSR1-5	0.02684	0.10323	ISSR4-7	0.03206	0.08326	ISSR3-10	0.03017	0.10782
				ISSR3-10	0.00713	0.14862				ISSR4-7	0.01358	0.14202
				ISSR4-7	0.00663	0.15109				ISSR5-2	0.01933	0.12664
				ISSR5-2	0.01336	0.12718				ISSR7-2	0.026	0.11404
				ISSR7-2	0.00656	0.15146				ISSR7-11	0.02586	0.11427
				ISSR7-11	0.03075	0.09855				ISSR9-5	0.02483	0.11599
تعداد دانه پوک Number of unfilled grain per panicle	ISSR2-8	0.00366	0.13878	ISSR2-8	0.00404	0.16779	ISSR2-8	0.00623	0.13914	ISSR2-8	0.01013	0.15283
	ISSR4-10		0.12477	ISSR4-10	0.03703	0.09217		0.00948	0.12432	ISSR4-10	0.03449	0.10083
	ISSR6-11	0.00606	0.07564	ISSR9-4	0.02731	0.10264	ISSR4-10	0.04113	0.07528	ISSR9-4	0.02753	0.11004
	ISSR9-4	0.03502	0.13243	ISSR10-5	0.01417	0.1252	ISSR6-11	0.00759	0.13214	ISSR10-5	0.01844	0.12683
	ISSR10-5	0.00461	0.15116				ISSR9-4	0.0045	0.15087			
طول خروج خوشه از غلاف length of the panicle exertion	ISSR2-1	0.0403	0.07172	ISSR6-6	0.04742	0.08449	ISSR2-1	0.04115	0.0752	ISSR1-6	0.02686	0.09977
	ISSR2-9	0.01541	0.09866	ISSR7-2	0.0113	0.13423	ISSR2-9	0.01607	0.10605	ISSR6-6	0.02345	0.10484
	ISSR6-6	0.02181	0.08891	ISSR7-6	0.02135	0.11217	ISSR6-6	0.03919	0.07675	ISSR6-9	0.02491	0.10257
	ISSR7-6	0.00577	0.12617	ISSR10-1	0.02809	0.10265	ISSR7-6	0.01328	0.11253	ISSR7-6	0.01563	0.12028
	ISSR10-1	0.02038	0.09081	ISSR10-9	0.03604	0.09399	ISSR10-1	0.03305	0.0822	ISSR10-1	0.04146	0.08394
	ISSR10-12	0.04438	0.06903	ISSR10-12	0.03786	0.09229				ISSR10-12	0.03607	0.08895
طول برگ پرچم Flag leaf length	ISSR2-8	0.03141	0.07867	ISSR2-8	0.0217	0.10982	ISSR2-8	0.03697	0.07868	ISSR2-8	0.02974	0.10982
	ISSR7-3	0.01067	0.10896	ISSR7-3	0.02016	0.11233	ISSR7-3	0.01479	0.10896	ISSR7-3	0.02802	0.11233
				ISSR7-7	0.03752	0.09111				ISSR7-7	0.04675	0.09111
عرض برگ پرچم Flag leaf width	ISSR1-7	0.00424	0.13474	ISSR1-7	0.01032	0.13717	ISSR1-7	0.007	0.13498	ISSR1-7	0.02058	0.12759
	ISSR2-6	0.00611	0.12458	ISSR2-6	0.00916	0.14128	ISSR2-6	0.01115	0.11864	ISSR2-6	0.01487	0.14205
	ISSR6-4	0.03381	0.07662	ISSR3-9	0.02237	0.11042	ISSR3-9	0.04838	0.07016	ISSR3-9	0.02605	0.11729
	ISSR7-9	0.01139	0.10714	ISSR6-11	0.0483	0.08376	ISSR7-9	0.02053	0.09789	ISSR6-11	0.04097	0.09806
تعداد دانه کل خوشه Number of grain per plant	ISSR1-6	0.01678	0.09626	ISSR1-6	0.03002	0.09892	ISSR1-6	0.01702	0.10419	ISSR1-6	0.03379	0.10328
	ISSR2-6	0.04249	0.07024	ISSR4-4	0.028	0.1013	ISSR7-2	0.04274	0.07406	ISSR7-2	0.02519	0.11552
	ISSR6-2	0.04775	0.067	ISSR7-2	0.017	0.11838	ISSR10-8	0.02477	0.09168	ISSR7-11	0.02869	0.11007
	ISSR7-2	0.02581	0.08417	ISSR7-11	0.02001	0.11281				ISSR10-8	0.04934	0.08793
ارتفاع بوته Plant height	ISSR4-7	0.00284	0.00284	ISSR4-7	0.02089	0.11275	ISSR4-7	0.00792	0.13054	ISSR4-7	0.02386	0.11879
	ISSR8-3	0.04811	0.04811	ISSR6-4	0.0341	0.09576	ISSR7-9	0.04102	0.07532	ISSR6-10	0.04442	0.09289
	ISSR9-2	0.01542	0.01542	ISSR6-10	0.02635	0.10469	ISSR9-2	0.03071	0.08461			

تعداد خوشه بوته	ISSR4-3	0.02206	0.0885 8	ISSR7-2	0.02637	0.10435	ISSR4-3	0.01923	0.10009	ISSR7-6	0.02568	0.11512	
Number of panicle	ISSR5-3	0.00461	0.1324 4	ISSR7-6	0.02899	0.10108	ISSR5-3	0.01293	0.11355				
	ISSR7-2	0.02893	0.0809 8										
	ISSR10-2	0.02701	0.0829 1										
	ISSR1-6	0.04523	0.0685 1	ISSR6-11	0.04124	0.08907	ISSR1-6	0.04659	0.07133				
وزن کاه بوته Straw weight	ISSR6-11	0.04959	0.0659 5	ISSR10-3	0.03374	0.09601	ISSR10-3	0.02617	0.08986				
	ISSR10-3	0.01836	0.0937 4	ISSR10-8	0.04633	0.08505							
				ISSR10-10	0.04967	0.08265							
وزن خوشه بوته panicle weight	ISSR4-4	0.02766	0.0822 4	ISSR4-4	0.04336	0.08739	ISSR3-12	0.02382	0.09292	ISSR6-11	0.04348	0.09368	
	ISSR6-11	0.01698	0.0959 4	ISSR6-10	0.04263	0.08798	ISSR6-11	0.00954	0.12402	ISSR7-11	0.04369	0.09348	
	ISSR10-7	0.04935	0.0660 9	ISSR6-11	0.03419	0.09562				ISSR10-8	0.01035	0.15542	
	ISSR10-8	0.00201	0.1553 3	ISSR7-11	0.03699	0.09289							
وزن کل بوته Total plant weight	ISSR6-11	0.04624	0.0679	ISSR4-8	0.03619	0.09381	ISSR6-11	0.04175	0.07481	ISSR10-10	0.04039	0.09605	
	ISSR7-2	0.0401	0.0718 6	ISSR9-1	0.03289	0.09713	ISSR10-8	0.02568	0.09049				
	ISSR8-1	0.0494	0.0660 6	ISSR10-10	0.03125	0.0989							
	ISSR10-3	0.03912	0.0725 5										
	ISSR1-7	0.00462	0.1323 5	ISSR1-7	0.00774	0.14293	ISSR1-7	0.00925	0.1251	ISSR1-7	0.01302	0.14119	
مساحت برگ پرچم Flag leaf area	ISSR2-6	0.00475	0.1315 8	ISSR2-6	0.01807	0.11451	ISSR2-6	0.02041	0.09805	ISSR2-6	0.03875	0.09573	
	ISSR6-4	0.02654	0.0834	ISSR6-11	0.0223	0.10742	ISSR7-9	0.0145	0.10958	ISSR6-11	0.03758	0.09695	
	ISSR6-9	0.03551	0.0752 5	ISSR7-9	0.00647	0.14888				ISSR7-9	0.01072	0.14967	
	ISSR7-9	0.0031	0.1434 4	ISSR10-1	0.04872	0.08111							
	ISSR10-1	0.02196	0.0887										
	ISSR10-2	0.0422	0.0704 4										
درصد باروری Fertility	ISSR2-6	0.03076	0.0792 7	ISSR2-8	0.02391	0.10714	ISSR2-8	0.00753	0.13242	ISSR2-8	0.0332	0.10451	
	ISSR2-8	0.01017	0.1103 3	ISSR4-4	0.02785	0.1019	ISSR4-4	0.02969	0.08576	ISSR4-4	0.04899	0.08863	
	ISSR4-4	0.02779	0.0821 1	ISSR10-8	0.04578	0.08484	ISSR7-3	0.04453	0.07277				
	ISSR6-2	0.04606	0.068				ISSR7-8	0.02785	0.08783				
تعداد دانه پر در خوشه Number of filled grains	ISSR1-6	0.01495	0.0995	ISSR1-6	0.02375	0.10736	ISSR1-6	0.00979	0.12316	ISSR1-6	0.02113	0.12351	
	ISSR2-8	0.04008	0.0718 7	ISSR1-7	0.04314	0.08686	ISSR6-2	0.03576	0.07974	ISSR6-2	0.0396	0.09718	
	ISSR6-2	0.0376	0.0736 6	ISSR4-4	0.04216	0.08765	ISSR7-11	0.03977	0.07635	ISSR7-2	0.02388	0.11827	
	ISSR7-2	0.01942	0.0921 5	ISSR7-2	0.0106	0.13502	ISSR10-8	0.04209	0.07455	ISSR7-11	0.0203	0.12523	
	ISSR10-8	0.0075	0.1188 4	ISSR7-11	0.01355	0.12663				ISSR10-8	0.03258	0.10522	
				ISSR10-8	0.0082	0.14378							
	ISSR1-6	0.04377	0.0694 2	ISSR1-6	0.02988	0.0999	ISSR2-6	0.04982	0.06924	ISSR7-2	0.0031	0.20568	
وزن دانه های پر خوشه Grain Weight per panicle	ISSR2-6	0.0329	0.0773 8	ISSR2-8	0.03883	0.09087	ISSR2-8	0.0154	0.10757				
	ISSR2-8	0.00853	0.1152 6	ISSR7-2		0.20305	ISSR7-2	0.02056	0.09785				
	ISSR7-2	0.01521	0.0990 2		0.00142		ISSR9-1	0.01728	0.10368				
	ISSR9-1	0.01267	0.1041 4										
	ISSR10-8	0.04428	0.0691										
	ISSR1-6	0.0285	0.0814	ISSR1-6	0.01006	0.13827	ISSR2-8	0.00729	0.13342	ISSR2-8	0.0209	0.12042	
عملکرد در هکتار Yield per hectare	ISSR2-8	5.89E- 04	0.1886 2	ISSR1-7	0.04318	0.08775	ISSR9-1	0.04417	0.07294	ISSR6-2	0.03744	0.09663	
	ISSR9-1	0.03768	0.0736	ISSR2-4	0.04578	0.08574				ISSR7-2	0.00926	0.15538	
	ISSR10-8	0.03633	0.0746 1	ISSR2-8	0.0053	0.16027							
				ISSR4-5	0.03138	0.09883							
				ISSR7-2	0.01262	0.13044							

تعداد روز تا خوشه دهی	ISSR1-6	0.00146	0.1640 5	ISSR1-6	6.76E-04	0.22772	ISSR1-6	0.00314	0.16405	ISSR1-6	0.00333	0.20809
Days to Flowering	ISSR4-9	0.04116	0.0711 3	ISSR3-2	0.04005	0.09002	ISSR4-9	0.04692	0.07113	ISSR3-2	0.0457	0.09143
	ISSR6-4	0.02455	0.0855 8	ISSR6-4	0.0203	0.11353	ISSR6-4	0.02985	0.08558	ISSR6-4	0.03728	0.09971
	ISSR6-11	0.02697	0.0829 5	ISSR6-11	0.01639	0.12091	ISSR6-11	0.03237	0.08295	ISSR6-11	0.03305	0.10468
	ISSR7-6	0.03946	0.0723					ISSR7-6	0.04519	0.07231		
			1									
تعداد روز تا رسیدگی	ISSR2-5	0.04693	0.0674 9	ISSR1-6	0.01583	0.11924	ISSR4-10	0.01124	0.11839	ISSR1-6	0.02191	0.11944
Days to maturity	ISSR3-12	0.04326	0.0697 5	ISSR2-5	0.03433	0.09309	ISSR6-11	0.03957	0.07651	ISSR2-5	0.04215	0.09269
	ISSR4-10	0.00653	0.1227 1	ISSR6-4	0.04981	0.08055			ISSR6-11	0.03254	0.1031	
	ISSR6-11	0.03145	0.0786 4	ISSR6-11	0.02489	0.10396			ISSR7-6	0.04819	0.0874	
	ISSR9-4	0.04381	0.0694 0.0690	ISSR7-6	0.03788	0.08977						
	ISSR10-5	0.04431	8	ISSR10-5	0.04655	0.08283						
مدت زمان رسیدگی	ISSR1-2	0.03136	0.0787 2	ISSR1-2	0.00287	0.1687	ISSR1-2	0.01964	0.0993	ISSR1-2	0.00655	0.16758
Grain filling rate	ISSR2-5	0.01767	0.0948 1	ISSR2-5	0.01856	0.10911	ISSR1-7	0.03628	0.07921	ISSR2-5	0.02585	0.10949
	ISSR3-12	0.00239	0.1506 2	ISSR3-12	0.0135	0.11941	ISSR3-12	0.01911	0.10022	ISSR3-12	0.02201	0.11601
	ISSR4-7	0.03686	0.0742 1	ISSR6-13	0.00768	0.13753			ISSR6-13	0.01234	0.14011	
	ISSR4-8	0.01817	0.0940 3									
	ISSR4-10	0.03733	0.0738 5									
	ISSR5-1	0.02951	0.0804 3									
	ISSR6-5	0.01747	0.0951 2									
	ISSR6-7	0.0105	0.1094 2									
	ISSR7-11	0.03668	0.0743 4									
	ISSR8-4	0.01437	0.1006 2									
	ISSR8-7	0.04469	0.0688 4									
	ISSR8-8	0.02999	0.0799 8									
	ISSR9-4	0.01046	0.1095 1									
	ISSR10-2	0.01692	0.0960 2									
	شاخص برداشت	ISSR4-4	0.01952	0.0920 1	ISSR6-10	0.00229	0.18847	ISSR4-4	0.02272	0.09452	ISSR4-7	0.04317
Harvest index	ISSR6-10	0.01275	0.1039 8				ISSR6-10	0.02118	0.09686	ISSR6-10	0.01029	0.15588
	ISSR10-8	0.04491	0.0687 0.0927				ISSR10-11	0.02095	0.09721			
	ISSR10-11	0.01902	4									

منابع

- Abdurakhmonov, I.Y. and Abdugarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources (online). *Int. J. Plant Genomics*, 1-18.
- Achleitner, A., Tinker, N., Zechner, E. and Buerstmayr, H. (2008). Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor. Appl. Gene.* 117: 1041-1053
- Agrama, H.A., Eizenga, G.C. and Yan, W. (2007). Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol. Breeding* 19: 341-356.

- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. (2007). "TASSEL: Software for association mapping of complex traits in divers samples". *Bioinformatics Applications Note* 2633-2635.
- Breseghele, F. and Sorrells, M.E. (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci.* 46: 1323-1330.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314- 331.
- Chmani Mohassess, F., Samie zadeh, H., Filing, D. and Rabiei, B. (2011). Genetic variation in rice, (*Oryza sativa* L.) by using molecular markers. *Third National Conference on Agricultural Biotechnology Iran.* 82-84
- Dadras, A.R. (2012). Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. Iran, Shahid Bahonar University of Kerman. M. Sc. Thesis.
- Dadras, A.R., Sabouri, H., Mohammadi-Nejad, Gh., Sabouri, A. and Shoaie-Daylami, M. (2014). Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Mol. Biol. Rep.* 41(5):3317-3329
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15.
- Evanno, G., Reganut, E. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecology* 14: 2611-2620
- Fufa, H.P., Baenizger, S., Beecher, B.S., Dweikat, I., Graybosch, R.A. and Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica* 145: 133-146.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology.* 57: 461-485.
- Hamza, S., Ben Hmida, W., Rebai, A. and Harrabi, M. (2004). SSR based genetic diversity assessment among Tunisian Winter Barley and relation sheep with morphological traits. *Euphytica*, 135, 107-118.
- Mohammadi, S.A. (2008). Innovative Approaches in Analysis of Plant Quantitative Traits Genetic Structure. In: proceeding of 10th Iranian Agronomy and Plant Breeding Congress. Seed and Plant Improvement Institute. Pp. 183-201.
- Mohammadi, S.A. (2006) Molecular analysis from viewpoint investigates of genetic variation. The 9th Iranian crop sciences congress.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Society of Human Genetics.* 67: 170-181.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, S.H. and Gupta, P.K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* 5: 683-689.
- Reddy, M.P. Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Roy, J.K., Smith, K.P., Muehlbauer, G.J., Chao, S., Close, T.J. and Steffenson, B.J. (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Mol. Breeding* 26: 243-256.

- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. and Negri, V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1281-1291
- Shannon, C.E. and Weaver, W. (1963). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Ill
- Takeda, S. and Matsuoka, M. (2008). Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population change. *Nature* 9: 444-457
- Yashitola, T.M., Sandarm, R., Biradar, S. and Thirumuragau, K. (2004). Sequence specific PCR Marker for distinguishing rice line at the basis of wild abortive cytoplasm for their congenic maintainer line. *Crop Science* 44: 920-924
- Yang, X., Yan, J., Shah, T., Warburton, M.L., Li, Q., Li, L., Gao, Y., Chai, Y., Fu, Z., Zhou, Y., Xu, S., Bai, G., Meng, Y., Zheng, Y. and Li, J. (2010). Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theor. Appl. Genet.* 121(3):417-31.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.J.B., Ye, Z.H. and Mao, J.X. (1997). POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada
- Yu, J. and Buckler, E.S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology* 17 (2): 155-160.
- Zhang, C. J., G. X. Ghen, X. X. Gao, and C. J. Chu. 2006. Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. *South African Journal of Botany.* 72:15-23.

Association analysis of genes controlling morphological traits in rice using ISSR markers in flooding and drought condition

M.R. Karim¹, H. Sabouri^{2*}, A.R. Dadras³

Received:2016.08.15

Accepted:2018.11.11

Abstract

Identification of quantitative traits loci, especially in stress, is one of the important issues in plant breeding. The present study was conducted to identify molecular markers that have a significant relationship with related traits in rice using ISSR markers and 59 rice genotypes and 21 agronomic traits in the flooding and drought stress conditions. The genotypes were based on ISSR markers in a total of 144 bands with an average of 14.4 bands for each marker, and 69.17% of the bands were polymorphic. The largest polymorphic information content (PIC) was found for ISSR-7 primer with 0.49 and the ISSR-2, ISSR-8, ISSR-9 and ISSR-10 primers with the 0.47 had the lowest PIC values. The association analysis was performed using population structure matrix with GLM and MLM statistical models using the TASSEL software for 21 variables. The MLM model was able to detect meaningful markers in flooding condition of 96 markers in drought stress conditions and related to 21 traits examined at a probability level of 5%. According to the results of association analysis in flooding conditions, the highest correlation coefficient (in the MLM model) of the ISSR27-2 allele was 29.27% and in the drought stress, the highest correlation coefficient (in the GLM model) was related to the ISSR1-6 allele of 77.7 22 percent. According to the results, it is anticipated that the use of ISSR markers identified in this study, if approved and after being confined, would be highly confident in the selection breeding programs with the help of the molecular marker.

Keywords: Association analysis, Rice, Drought stress, ISSR, TASSEL.

1. Msc student of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University of Tehran

2. Associate Professor of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources, University Gonbad

*(corresponding author: hos.sabouri@gmail.com)

3. Research Assistant Professor of Olive Research Station of Tarom, Crop and Horticultural Science Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran

بررسی انعطاف پذیری ریختی ماهی خواجه (*Schizotorax pelzami* Kessler 1870) در شرق ایران با

استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی

آمنه سازگار^۱، امید صفری^{۲*}، شهناز دانش^۲، فائزه یزدانی مقدم^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

چکیده

ماهی خواجه از جمله آبزیان موجود در زیستگاه‌های آبی مختلف شمال شرق کشور است. با توجه به توانایی زیست این گونه در زیستگاه‌های مختلف تعداد ۱۲۴ نمونه ماهی از هفت منطقه مختلف واقع در شمال شرق ایران در دو حوضه آبریز تجن و کویر نمونه‌برداری گردید، از سمت جانیی چپ نمونه‌ها عکسبرداری و تعداد ۱۷ لندمارک (مرز نشانه) جهت استخراج داده‌های شکل بدن رقمی گردید. تفاوت معنی‌داری بین شکل بدن هر پنج جمعیت مورد مطالعه وجود داشت. عمده‌ی این تفاوت‌ها مربوط به تغییرات در ناحیه پوزه، عمق سر، موقعیت باله‌ی سینه‌ای و مخرجی و بودند، که بیانگر انعطاف‌پذیری این بخش‌ها در پاسخ به شرایط محیطی زیستگاه جمعیت‌های مورد بررسی می‌تواند باشد. داشتن دهان با موقعیت شکمی، شکل سر و شکل بدن کاملاً دوکی شکل به عنوان ویژگی‌های مشترک در بین اعضای این گونه بودند که می‌تواند بیانگر عامگرا بودن شکل بدن این گونه ساکن در رودخانه به عنوان یک مزیت باشد.

واژه‌های کلیدی: حوضه تجن، حوضه کویر، سازگاری ریختی، رودخانه

مقدمه

تفاوت‌های ریختی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه می‌تواند به واسطه تفاوت‌های ژنتیکی و انعطاف‌پذیری ریختی تحت تاثیر شرایط محیطی باشد. فاکتورهای محیطی به واسطه‌ی انتخاب طبیعی سبب افزایش کارایی یک ریخت در بین افراد یک زیستگاه و در نتیجه جداسازی ریختی جمعیت‌های آن در زیستگاه‌های مختلف می‌گردد (پیرمحمدی و همکاران، ۱۳۹۳؛ یگانه و همکاران، ۱۳۹۲؛ Keely et al., 2007). از عوامل زیستی موثر بر این فرایند تکاملی، می‌توان به رقابت، شکار، میزان دسترسی به منابع غذایی و به عوامل فیزیکی موثر به نوع بستر، عمق آب، پوشش گیاهی حوضه آبریز، اثرات دستکاری انسانی مانند سدسازی اشاره کرد. اثرهای متقابل این عوامل می‌تواند سبب ایجاد سازگاری‌ها و تغییرات در قالب صفاتی همچون شکل بدن، الگوهای تغذیه‌ای، الگوهای شنا و رفتارهای تولیدمثلی شود. افزایش کارایی یک ریخت و انتخاب آن بر حسب ویژگی‌های

^۱ کارشناس ارشد مهندسی منابع طبیعی و محیط‌زیست، گرایش زیستگاه‌ها و تنوع زیستی
دانشیار، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، گروه شیلات و محیط‌زیست
^۲ استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه بیوسیستماتیک جانوری

* (نویسنده مسئول: omidsafari@um.ac.ir)

هر منطقه متفاوت است لذا این امکان وجود دارد که یک ویژگی ریختی در یک زیستگاه برتر باشد، اما در زیستگاه دیگر سبب کاهش قابلیت استفاده از منابع دیگر شود.

جمعیت‌های جدا شده یک گونه به دلیل اثرات فاکتورهای فیزیکی و زیستی (بیرونی) و فاکتورهای ژنتیکی (درونی) در زیستگاه‌های مختلف به واسطه‌ی استفاده از منابع آن زیستگاه سازگاری‌های منطقه‌ای از جمله تنوع ریختی را به نمایش می‌گذارند. در این بین برای آشکارسازی این تفاوت‌های ریختی، استفاده از ریخت‌سنجی هندسی به عنوان یک روش نوین در مطالعه‌ی اشکال زیستی و تغییرات شکل در بین جمعیت‌های مختلف توسعه پیدا کرده است. این روش می‌تواند الگوهای مختلف تغییر شکل ایجاد شده در نتیجه فرایندهایی از قبیل رشد و سازگاری‌های محیطی را نمایان سازند (Eagderi *et al.*, 2013). برخلاف روش‌های سنتی که براساس فواصل اندازه‌گیری شده می‌باشد، در روش ریخت‌سنجی هندسی از مختصات نقاط مرز نشانه برای استخراج داده‌های شکل برای تحلیل‌های چند متغیره استفاده می‌شود. با توجه به پراکندگی زیاد سیاه ماهی توفینی در بوم سازگان‌های آبی مختلف از جمله رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و نهرها، این سوال پیش می‌آید که اعضای این گونه دارای چه ویژگی‌های ریختی مشترکی هستند که آنها را قادر می‌سازد تا بتواند در انواع بوم سازگان‌ها با شرایط هیدرولوژیکی و فیزیکی متفاوت زیست نمایند. از این‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی روند انعطاف‌پذیری ریختی جمعیت‌های مختلف این گونه جهت درک نحوه سازگاری ریختی آن به بوم سازگان‌های آبی مختلف به اجرا درآمد. نتایج این تحقیق می‌تواند به درک بهتر شباهت‌های ریختی گونه‌های مختلف آب‌های شیرین کمک نموده و منجر به شناخت روند تاریخ تکامل اعضای این جنس نیز گردد چرا که انشقاق بر اثر انعطاف‌پذیری ریختی یا تکامل فرد می‌تواند روند تکاملی در حال پیشرفت اعضای آن گونه را نیز ارائه نمایند.

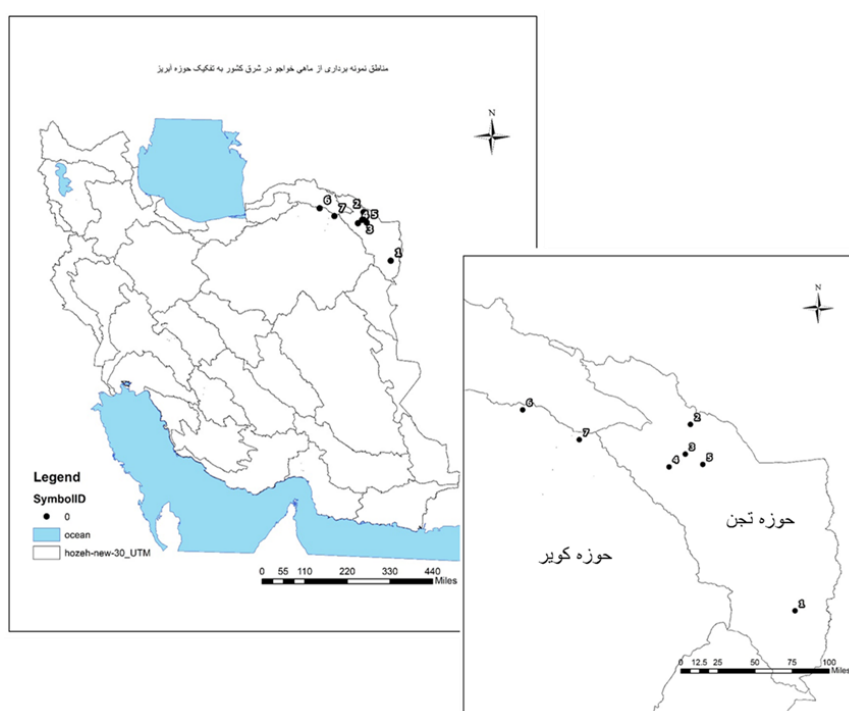
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در مجموع تعداد ۱۲۴ نمونه از هر جمعیت (از گونه ماهی خواجه از هفت بوم سازگان) آبی مختلف شامل رودخانه‌های مناطق دربادام قوچان و چشمه روئین مربوط به حوضه کویر و درونگر درگز، آبدق و کارده مشهد، تربت جام و خان‌آباد چناران در حوضه تجن هستند. در فصول مختلف با استفاده از دستگاه الکتروشوکر^۱ و تور دستی صید گردیدند (شکل ۱). نمونه‌ها پس از بی‌هوشی، در فرمالین ۱۰ درصد بافری تثبیت و سپس برای مطالعات بعدی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از تمامی نمونه‌های صید شده برای این پژوهش استفاده شد و از نظر جنسیت نیز تفکیک نشدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد بررسی در خارج فصل تولیدمثل صید شده بودند.

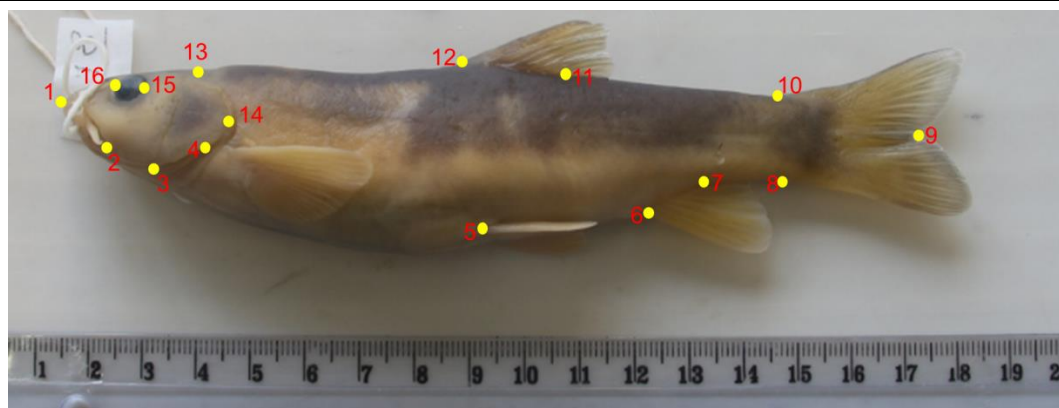
روش کار

برای تهیه داده‌های مورد نیاز از سمت چپ سطح جانبی نمونه‌ها با استفاده از پایه تصویربرداری مجهز به دوربین دیجیتال سونی با قدرت تفکیک شش مگاپیکسل عکسبرداری شد. سپس با استفاده از نرم افزار TpsDig2 روی تصاویر دو بعدی تعداد ۱۷ مرز نشانه تعریف و رقمی شدند (شکل ۲). برای استخراج داده‌های شکل و حذف داده‌های غیرشکل شامل اندازه، موقعیت و جهت، جایگاه مرز نشانه‌ها با استفاده از تحلیل پروکراست^۱ روی هم‌گذاری شدند. داده‌های حاصل از شکل بدن جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از تحلیل‌های چندمتغیره تجزیه به مولفه‌های اصلی^۲ و تجزیه هبستگی کانونی^۳ قرار گرفتند. تمامی تحلیل داده‌های شکل با استفاده از نرم‌افزارهای (MorphoJ14 و Past) انجام شد.



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری شده ماهی خواجه (*Schizothorax pelzami*) در شرق ایران به تفکیک حوضه آبریز (۱) تربت جام، (۲) درونگر درگز، (۳) کارده مشهد، (۴) خان‌آباد چناران، (۵) آبقد مشهد، (۶) چشمه روئین اسفراین و (۷) دربادام قوچان.

1 Generalized procrustes analysis
2 Principal component analysis (PCA)
3 Canonical variate analysis (CVA)

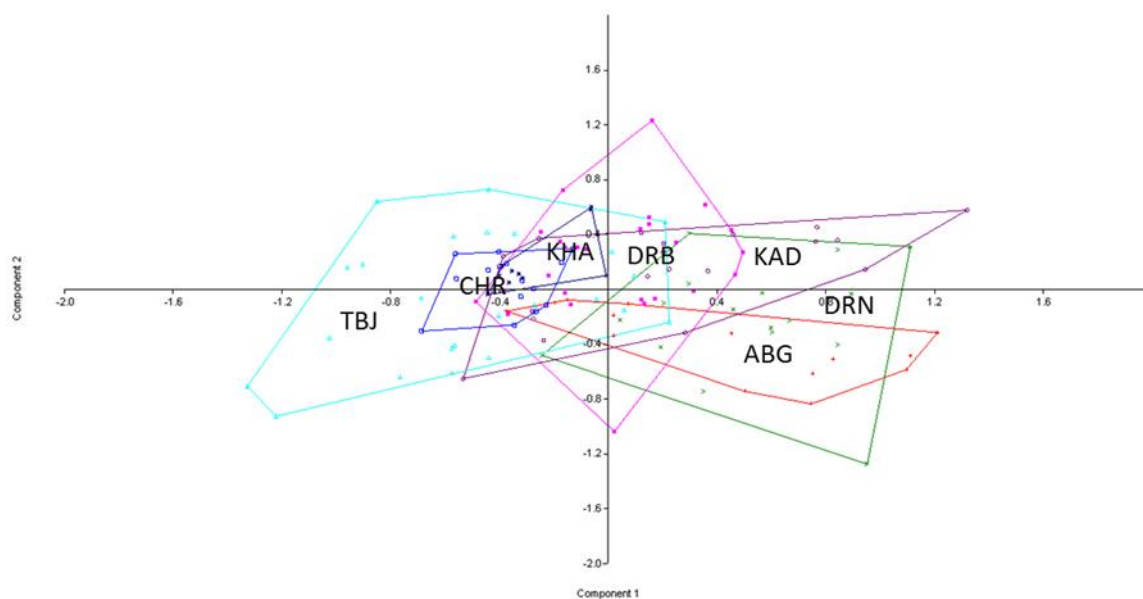


شکل ۲: لندمارک‌های استفاده شده در این مطالعه

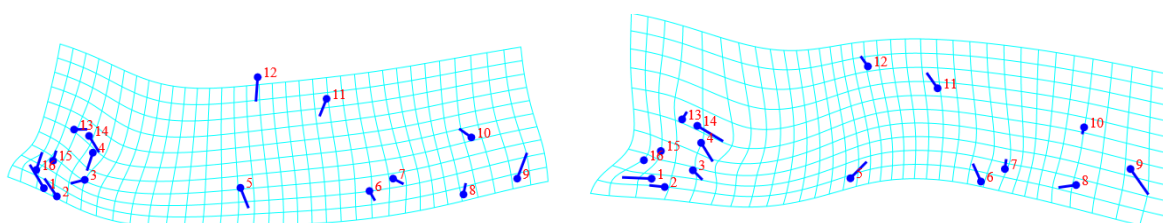
(۱): ابتدایی‌ترین بخش پوزه در فک بالا، (۲): ابتدای قاعده باله پشتی، (۳): بخش زیرین سرپوش آبششی، (۴): ابتدایی‌ترین نقطه قاعده باله سینه‌ای، (۵): ابتدایی‌ترین نقطه قاعده باله شکمی، (۶): ابتدای قاعده باله مخرجی، (۷): انتهای قاعده باله مخرجی، (۸): بخش پائینی بشت‌ترین تورفتگی ساقه دم، (۹): انتهای‌ترین بخش ساقه دم، (۱۰): بخش بالایی بیشترین تورفتگی ساقه دم، (۱۱): انتهای قاعده باله پشتی، (۱۲): ابتدای قاعده باله پشتی، (۱۳): خط عمود با انتهای سرپوش آبششی (بالای بدن)، (۱۴): انتهای‌ترین بخش سرپوش آبششی، (۱۵): ابتدایی‌ترین بخش چشم، (۱۶): انتهای‌ترین بخش چشم (ایگدری و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج و بحث

تحلیل تجزیه به مولفه‌های اصلی هفت جمعیت حوضه تجن و کویر نشان داد که دو مولفه اول و دوم در مجموع بیش از ۷۸ درصد از تغییرات شکل بدن را شامل می‌شوند (مولفه اول و مولفه دوم = $78/2$). مولفه اول نشان دهنده تغییرات مربوط به جمع شدگی ناحیه پس‌سری، بزرگ شدن فاصله دهان و لبه زیرین چشم و فاصله بین باله سینه‌ای و انتهای شکاف آبششی بود. مولفه دوم نیز بیانگر کوتاه شدن ناحیه پوزه، کاهش بین لبه زیرین چشم و شکاف آبششی بود (شکل ۳). تحلیل تجزیه همبستگی کانونی (شکل ۴) هفت جمعیت مورد مطالعه را از هم متمایز نمود. کمترین فاصله بین جمعیت‌های درون‌گر درگز، تربت‌جام و دربادام قوچان و بیشترین فاصله نیز بین جمعیت‌های کارده و آبقد مشهد بودند.



شکل ۳: نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی شکل بدن برای هفت جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش (ABGH): آبقد مشهد، (DRB): دربادام قوچان، (DRN): درونگر درگز، (CHR): چشمه روئین اسفراین، (KAD): کارده مشهد، (KHA): خان آباد چناران و (TBJ): تربت جام.

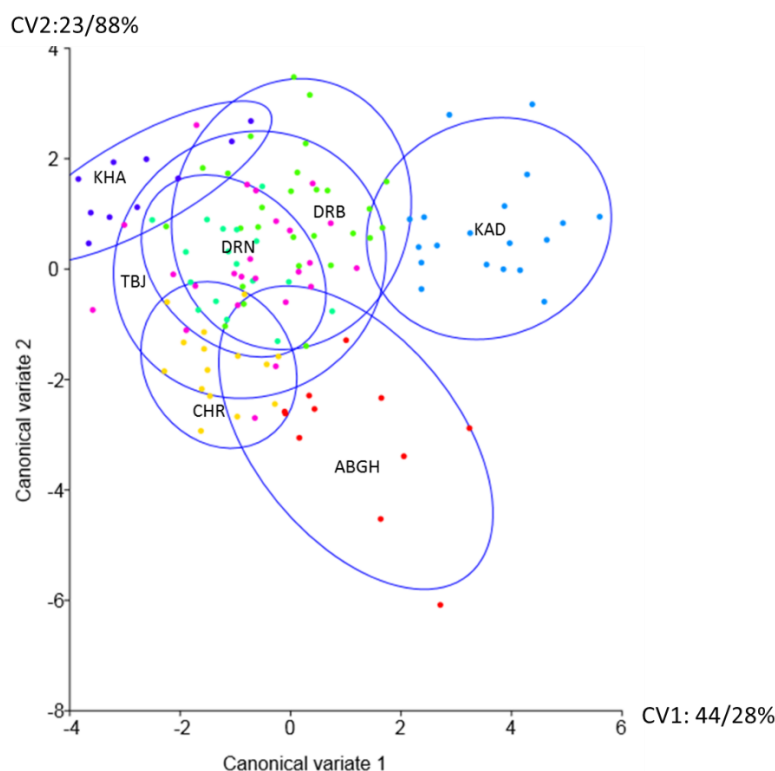


شکل ۴: شبکه تغییرات مربوط به مولفه‌های اصلی هفت جمعیت مورد مطالعه در ریخت‌سنجی هندسی از ماهی خواجه در

شرق کشور (شکل چپ PC1 ۶۸/۲ درصد) و شکل راست PC2 ۹/۷ درصد))

تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی هفت جمعیت حوضه آبریز کویر و تجن در شرق ایران نشان داد که در مولفه اول (PC1) که ۶۸/۲ درصد از تغییرات را شامل می‌شود مربوط به تغییر جایگاه لندمارک‌ها در ناحیه سر و ساقه دم است، مولفه دوم (PC2) نیز تغییرات مربوط به بخش پوزه و انتهای دم را شامل می‌شود که ۱۰ درصد تغییرات است، مولفه سوم (PC3) تغییرات را در ناحیه انتهای و ساقه دم نشان می‌دهد نیز ۵ درصد تغییرات شکل بدن را داشت. تغییرات شکل بدن تا مولفه ششم درصد قابل توجهی داشت و سایر مولفه‌ها نیز به صفر میل کرد. در بررسی مولفه‌های اصلی، جمعیت‌های آبقد مشهد و کارده در ناحیه سر و ساقه دم اختلاف داشتند و جمعیت‌های چشمه روئین، تربت جام، دربادام قوچان در بخش میانی بدن از

لحاظ شکل دارای اختلاف بودند. شبکه تغییرات شکل بدن در تحلیل مولفه‌های اصلی در مولفه اول (PC1) که بیشترین میزان تغییر (۶۸ درصد) را به خود اختصاص داده است، در ناحیه سر، پوزه، پستی و انتهای دم اختلافاتی را نشان می‌دهد که مربوط به لندمارک‌های شماره ۱، ۲، ۱۵، ۱۶، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ است.

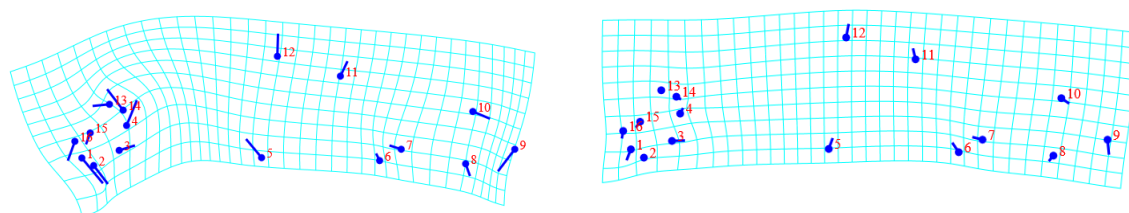


شکل ۵: نمودار CVA مربوط به آنالیز شکل بدن هفت جمعیت بررسی شده در ریخت‌سنجی هندسی در این مطالعه (ABGH): آبقد مشهد، (DRB): دربادام قوچان، (DRN): درونگر درگز، (CHR): چشمه روئین اسفراین، (KAD): کارده مشهد، (KHA): خان آباد چناران و (TBJ): تربت جام.

بر طبق نتایج حاصل شده از تحلیل همبستگی کانونیک (CVA) بر اساس ارزش p حاصل از آزمون جایگشت نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) در آنالیز ریخت‌سنجی هندسی، هفت جمعیت بررسی شده با توجه به عدد ویلکس-لامبادا^۱ (۰/۰۲۶۴۸) وجود داشت و میزان واریانس CV به ترتیب CV1: ۶۸/۲۸، CV2: ۹/۷۸۱، CV3: ۴/۵۳۸، CV4: ۳/۱۲۵ گزارش شد. نتایج مقایسه تغییرات شکل بدن در شبکه تغییر شکل نشان داد که تفاوت شکل بدن^۲ جمعیت‌های مختلف ماهی خواجه از الگوهای متنوعی تبعیت می‌کند (شکل ۵). با توجه به تغییر جایگاه مرز نشانه^۳ نمونه‌های رودخانه‌ها نسبت به شکل اجماع دارای اختلاف در لندمارک‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۱۳، ۱۴ و ۱۶ (شکل ۶) هستند و جمعیت رودخانه آبقد مشهد را عرض بدن کم‌تر نسبت به سایر جمعیت‌ها و جمعیت رودخانه کارده دارای عرض بدن بیشتر می‌باشد. در لندمارک‌های شماره ۱، ۲، ۱۴

1 Wilks lambda
2 Deformation grid
3 Consensus

و ۱۵ (پوزه پهن و بزرگتر، شکل ۶) جمعیت‌های خان آباد و چشمه روئین دارای اختلاف است. در لندها ۵، ۶، ۷، ۱۱ و ۱۲ (اختلاف در طول بدن مشاهده شده و بدن شکل دوکی بیشتری دارد، شکل ۶) جمعیت‌های درونگر درگز، تربت جام و دربادام قوچان اختلاف نشان دادند. لندها ۸، ۹ و ۱۰ (باله پشتی پهن‌تر) اختلاف داشتند (شکل ۶). در بررسی واریانس‌ها نیز CV1 با ۶۹ درصد بیشترین میزان CV را به خود اختصاص داده است و CV2 و CV3 به ترتیب میزان اثرپذیری کمتری دارند. در نمونه‌های بررسی شده از جمعیت‌های مختلف در تحلیل همبستگی کانونیک بیشترین جابجایی لندها مربوط به ناحیه سر و باله پشتی است.



شکل ۶: شبکه تغییرات مربوط به تحلیل کانونیک شکل بدن هفت جمعیت مورد مطالعه در ریخت‌سنجی هندسی شرق

کشور (شکل چپ CV1 (۴۴/۲۸) و شکل راست CV2 (۲۳/۸۸))

در بین مهره‌داران، ماهیان بیشترین حساسیت را نسبت به تغییرات محیطی از خود نشان می‌دهند (Turan, 2000). شرایط محیطی مختلف (دما، دسترسی به غذا، جریان آب، کم‌دورت و عمق آب) سبب تفاوت‌های ریختی جمعیت‌های مختلف یک گونه می‌شود. این پژوهش نشان داد که اختلافات معنی‌داری از لحاظ شکل بدن در بین جمعیت‌های مختلف ماهی خواجه در زیستگاه‌های متفاوت وجود دارد که بیشترین اختلافات مربوط به ناحیه پوزه، موقعیت باله سینه‌ای، باله دم و طول بدن (شکل دوکی) که با نتایج نصری و همکاران، ۱۳۹۳ و اسماعیل‌زادگان و همکاران ۱۳۹۲ با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی مطابقت داشت. با این وجود متاسفانه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص شکل بدن ماهی خواجه (*Schizothorax pelzami*) صورت نگرفته است تا همخوانی اطلاعات به دست آمده از این پژوهش به نقد گذارده شود. با توجه به اینکه بیشترین تغییرات لندها در ریخت‌سنجی هندسی در بخش سر، پوزه و ناحیه پشتی است و اختلافات جغرافیای موجود در بین هفت جمعیت بررسی شده ناشی از وجود اختلافات به نظر می‌رسد، بنابراین شرایط محیطی مناطق دارای اختلاف مثل شیب منطقه، محدودیت‌های جمعیتی و رقابت بر سر غذا در این مناطق می‌تواند این اختلافات را سبب شده باشد.

در بین مهره‌داران، ماهیان بیشترین حساسیت را نسبت به سایر موجودات در برابر تغییرات محیطی از خود نشان می‌دهند (Turan, 2000). نتایج بررسی نشان داد که شکل بدن بسته به منطقه جمعیت‌های مورد مطالعه تغییر یافته است و همین امر جدایی ریختی وابسته به زیستگاه متفاوت جمعیت‌های ماهی خواجه را در حوزه کویر و تجن آشکار می‌سازد. در مطالعه حاضر جدایی جمعیت‌های آبقد مشهد، کارده مشهد، تربت جام و چشمه روئین از سایر جمعیت‌ها به خوبی جالب توجه است. به

خصوص در همبستگی کانونیک در ریخت‌سنجی هندسی از تمایز بیشتر قابل توجه است. در مطالعات بسیاری نیز به سازگاری شکل بدن با زیستگاه متفاوت و برتری روش ریخت‌سنجی هندسی از بین روش‌های ریختی بررسی اختلافات ریختی اشاره شده است (جوهری و همکاران، ۱۳۸۹؛ حقیقی و همکاران، ۱۳۹۱).

به طور کلی، سه فرضیه ممکن است ساختارهای جمعیتی گونه‌های ماهیان را توضیح دهد: (۱) فاکتورهای محیطی، شامل تغییرات سطح دریا در گذشته، و در حال حاضر سدهای فیزیکی از قبیل جریان‌ات اقیانوسی، جمعیت‌های ماهیان را در مناطق مختلف جغرافیایی، گسیخته کرده است، (۲) افزایش فواصل جغرافیایی به منظور افزایش جدایی در میان جمعیت‌ها سه ویژگی‌های تاریخچه‌ی زندگی شامل توانایی پراکندگی، لانه‌سازی به منظور مناطق تخم‌گذاری، و مراقبت از تخم‌ها، ممکن است نقش مهمی در ساختار جمعیت‌ها بازی کند (عمادی و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به اینکه ماهیان یک گونه به واسطه جداسازی زیستگاه جمعیت‌های متفاوتی را تشکیل می‌دهند، در واقع، به واسطه ویژگی‌های آن محیطی فرآیند سازگاری، دچار تغییرات ریختی متفاوتی شده، از سایر جمعیت‌های آن گونه متمایز می‌شوند (Woton, 1991). با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و نزدیکی جمعیت‌های دارای شباهت به یکدیگر می‌توان گفت که در ماهی خواجو (*Schizothorax pelzami*) از مهمترین علل جدایی این جمعیت‌ها در آینده جدایی جغرافیایی به سبب جدایی رودخانه‌های حوزه کویر و تجن و افزایش خشکسالی‌های اخیر و قطع ارتباط اکوسیستم‌های آبی این مناطق خواهد بود.

مطالعه حاضر با هدف تعیین ارزش تشخیصی شکل بدن ماهی به عنوان روشی سریع بررسی افتراق جمعیت‌های گونه ماهی خواجو به روش ریخت‌سنجی هندسی انجام پذیرفت و تفاوت معنی‌داری از لحاظ شکل بدن بین جمعیت‌های این گونه در منابع ذکر شده وجود داشت. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که جمعیت ماهی رودخانه آبقد مشهد و کارده در یک مجموعه و تربت جام و چشمه روئین در یک مجموعه و درونگر درگز و خان آباد چناران و همین‌طور دربادام قوچان در یک مجموعه قرار می‌گیرند. با توجه به این‌که بیشترین تغییرات لندمارک‌ها در ریخت‌سنجی هندسی در بخش سر، پوزه و ناحیه پشتی است و اختلافات جغرافیای موجود در بین هفت جمعیت بررسی شده ناشی از وجود اختلافات به نظر می‌رسد، بنابراین شرایط محیطی مناطق دارای اختلاف مثل شیب منطقه، محدودیت‌های جمعیتی و رقابت بر سر غذا در این مناطق می‌تواند این اختلافات را سبب شده باشد. تفسیر علل به وجود آمدن اختلاف ریختی میان جمعیت‌های مختلف کار بسیار دشواری است. به طور کلی می‌توان گفت این تغییرات هم ناشی از شرایط و عوامل محیطی و هم ناشی از اختلافات ژنتیکی به وجود آمده در طول نسل‌ها به علل متفاوت است (Swain *et al.*, 1999). پاسخ جانوران در برابر تغییرات محیطی بسیار سریع‌تر از تغییرات ژنتیکی است و به صورت چند ژنی کنترل می‌شوند (Soule *et al.*, 1982).

نتایج تابع متمایز کننده^۱ در این مطالعه مشخص نمود که تعداد لندمارک‌ها و محل لندمارک‌های مورد استفاده توانسته است جدایی موجود در جمعیت‌های دو حوزه را به خوبی شامل شود. نتایج این تحقیق، تفاوت معنی‌داری را در شکل بدن ماهیان پرورش یافته در جمعیت‌های متفاوت را نشان می‌دهد. مقدار ویلکس - لامبادا به خوبی اختلاف بین هفت جمعیت بررسی شده را نشان داد. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در مورد ریخت‌سنجی این گونه صورت نگرفته است، بنابراین امکان مقایسه با مطالعه همسان وجود ندارد.

منابع

- اسماعیل‌زادگان، ا.، ایگدری، س.، پیریگی، ع.، ندائی، ش. (۱۳۹۲) اثر سد تاریک رودخانه سفیدرود بر شکل بدن ماهیان خیاطه (*Alburnoides Eichwaldi* De Filippi, 1863) با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی. پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۱ (۲): ۸-۱۲.
- ایگدری، س.، اسماعیل‌زادگان، ا.، مداح، ع. (۱۳۹۲) بررسی تغییرات شکل بدن در جمعیت‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides Eichwaldii* De Filippi, 1863) در حوضه دریای خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی. تاکسونومی و بیوسیتوماتیک، ۱۴ (۵): ۸-۱.
- پیرمحمدی، م.، عبدلی، ا.، و قربانی، ر. (۱۳۹۳) برخی خصوصیات ریختی گاو ماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) در جنوب شرقی دریای خزر، محدوده استان گلستان، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۱): ۱۳-۲۱.
- جوهری، ن.، کاظمیان، م.، شاپوری، م.، وطن‌دوست، ص. (۱۳۸۹). مقایسه مورفومتریک و مرستیک جنس نر و ماده سیاه ماهی (*Capoeta capoeta*) در رودخانه تالار استان مازندران. مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا-دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، ۶ (۲): ۵۳-۶۴.
- حقیقی، ا.، ستاری، م.، درافشان، س.، کیوانی، ی.، خوش خلق، م.، موسوی، ح. (۱۳۹۱) ریخت‌سنجی مقایسه‌ای ماهی خیاطه (*Cyprinidae: Alburnoides Eichwaldii*)، در رودخانه‌های گرگان رود و چالوس با استفاده از سیستم شبکه‌ای تراس. پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۱ (۱): ۱۳-۱۸.
- عمادی، ز.، رجبی مهام، ح.، عبدلی، ا.، کیابی، ب. (۱۳۹۴) تفاوت ویژگی‌های گل خورک (*Periophthalmus Waltoni Koumans, 1941*) در برخی نقاط سواحل خلیج فارس. دومین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران. ۱۲ آذر ۱۳۹۴. تهران.
- یگانه، م.، سیف‌آبادی، ج.، کیوانی، ی.، کاظمی، ب. (۱۳۹۲) مقایسه رابطه طول-وزن در جمعیت‌ها و جنس‌های مختلف دو گونه از کپور دندان ماهیان ایران (*Aphanius vladkovi* و *Aphanius sophiae*) مجله پژوهش‌های جانوری، ۲۶ (۲): ۱۸۱-۱۸۵.

¹ Discriminant function analysis (DFA)

- Eagderi, S., Esmailzadegan, E., and Madah, A. (2013) Body shape variation in riffle minnows (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) populations of Caspian Sea basin. *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 5(4): 1-8.
- Keeley, E.R., Parkinson, E.A., and Taylor, E.B. (2007) The origin of ecotypic variation of rainbow trout: a test of environmental vs. genetically based differences in morphology. *Journal of Evolutionary Biology*. 20 (2): 725-736.
- Soule, M.J. and Couzin, R. (1982) Allometric variation: developmental instability of extreme phenotypes. *American Naturalist*, 120:765-786.
- Swain, D.P. and Foote, C. J. (1999) Stocks and chameleons: The use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*. 43: 113- 128.
- Turan, C. (2000) Otolith shape and meristic analysis of Herring (*Clupea harengus*) in the northeast Atlantic. *Arch. Fish. Mar. Res.* 48: 283-295.
- Van valen L. (1978) The statistics of variation. *Evolutionary theory*, 4: 35-43.

Evaluation of morphological flexibility of Khajoo fish (*Schizotorax pelzami* Kessler 1870) in Eastern Iran using geometric morphometric method

A. Sazgar¹, O. Safari^{2*}, S. Danesh², F. Yazdani Moghadam³

Abstract

Khajoo fish is one of native fishes existing in the northeast of country. Regarding the ability of this species to live in the different habitats, 124 fishes from Tajan and Kavir basins were caught in seven different locations in the northeast of Iran. The left side of the samples were photographed and 17 landmarks (sign mark) were digitized to extract body shape data. There was a significant difference between the body shapes of all five studied populations. Most of these differences were related to changes in the muzzle region, head depth, chest and thoracic position, indicating the flexibility of these parts in response to the environmental conditions of the habitat of the populations under study. Having a mouth with abdominal position, head shape, spindly body shape were common features among members of this species, which could indicate the generality of the shape of the body of this species, which for species that are found in variable environments such as rivers life, can be an advantage.

Keywords: **Tajan basin, Kavir basin, Morphological adaptation, River.**

1- MSc student in Natural Resources and Environmental Sciences- Habitats and Biodiversity

2- Associate Professor, Department of Fisheries and Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

3- Assistant Professor, Department of Animal Biosystematics, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad

*(Corresponding author: omidsafari@um.ac.ir)

مقایسه ریخت‌سنجی هندسی ماهی تیله‌خوس (*Capoeta capoeta*) در سه حوضه ایران

یزدان کیوانی^{۱*}، محمود بنی‌مسنی^۲ و عیسی ابراهیمی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

چکیده

به منظور مقایسه ریخت‌سنجی جمعیت‌های تیله‌خوس (*Capoeta capoeta*) ۷۱۳ قطعه ماهی از ۳۲ رودخانه حوضه خزر، ارومیه و هریرود مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها پس از صید، توسط محلول گل میخک ۱٪ بیهوش و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت و به آزمایشگاه انتقال یافتند. تصاویر دیجیتال با استفاده از دوربین هشت مگاپیکسلی با شرایط یکسان تهیه و با استفاده از نرم‌افزار *Tpsdig2* لندمارک گذاری شدند. روی هم‌گذاری لندمارک‌ها با استفاده از تحلیل پروکراست و حذف تغییرات غیرشکل با نرم‌افزار *TpsRelw* انجام شد. نتایج تحلیل متغیرهای کانونی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌های سه حوضه وجود دارد و جمعیت هریرود کاملاً از جمعیت ارومیه تفکیک شد. جمعیت خزر با هر دو جمعیت هم‌پوشانی نشان داد. تحلیل خوشه‌ای جمعیت‌ها با ضریب کوپرنیک ۰/۸۱۸، جمعیت‌های مورد مطالعه را به دو گروه اصلی تقسیم کرد، خزر و هریرود در یک گروه و ارومیه در یک گروه مجزا که نشان دهنده شباهت بیشتر حوضه خزر و هریرود به همدیگر است. فاصله جغرافیایی و تفاوت‌های زیستگاهی می‌تواند علت این امر باشد، با این وجود برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیاز به مطالعات مولکولی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: حوضه خزر، حوضه ارومیه، حوضه هریرود، سیاه‌ماهی، کپورماهیان

مقدمه

شناسایی جمعیت ماهیان در حفاظت از تنوع زیستی و مدیریت شیلات اهمیت بالایی دارد. علاوه بر این، شناسایی جمعیت‌ها در بررسی صفات زیستی مانند رشد، مرگ و میر، باروری، روابط تغذیه‌ای و حوادث دیرین‌شناسی ضروری می‌باشد. به طور سنتی، شناسایی جمعیت‌های درون گونه‌ای بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی است (Cardini, 2010; Keivany et al., 2017). اما روش‌های سنتی با مشکلاتی در خصوص قابلیت اطمینان مواجه می‌باشد (Samaee et al., 2009; Keivany and Arab, 2017). ریخت‌شناسی سنتی بر پایه مجموعه‌ای از اندازه‌گیری‌های فواصل استوار است و از نظر توصیف تفاوت شکل بدن دارای ضعف‌هایی است (Jerry, 1998). در یکی دو دهه اخیر، روش ریخت‌سنجی هندسی لندمارک پایه به طور موفقیت‌آمیزی در مطالعات ریخت‌شناسی استفاده شده است (Eagderi et al., 2015; Razavipour et al., 2015; Banimasani et al., 2017).

۱-دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.
* (نویسنده مسئول keivany@cc.iut.ac.ir).

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

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

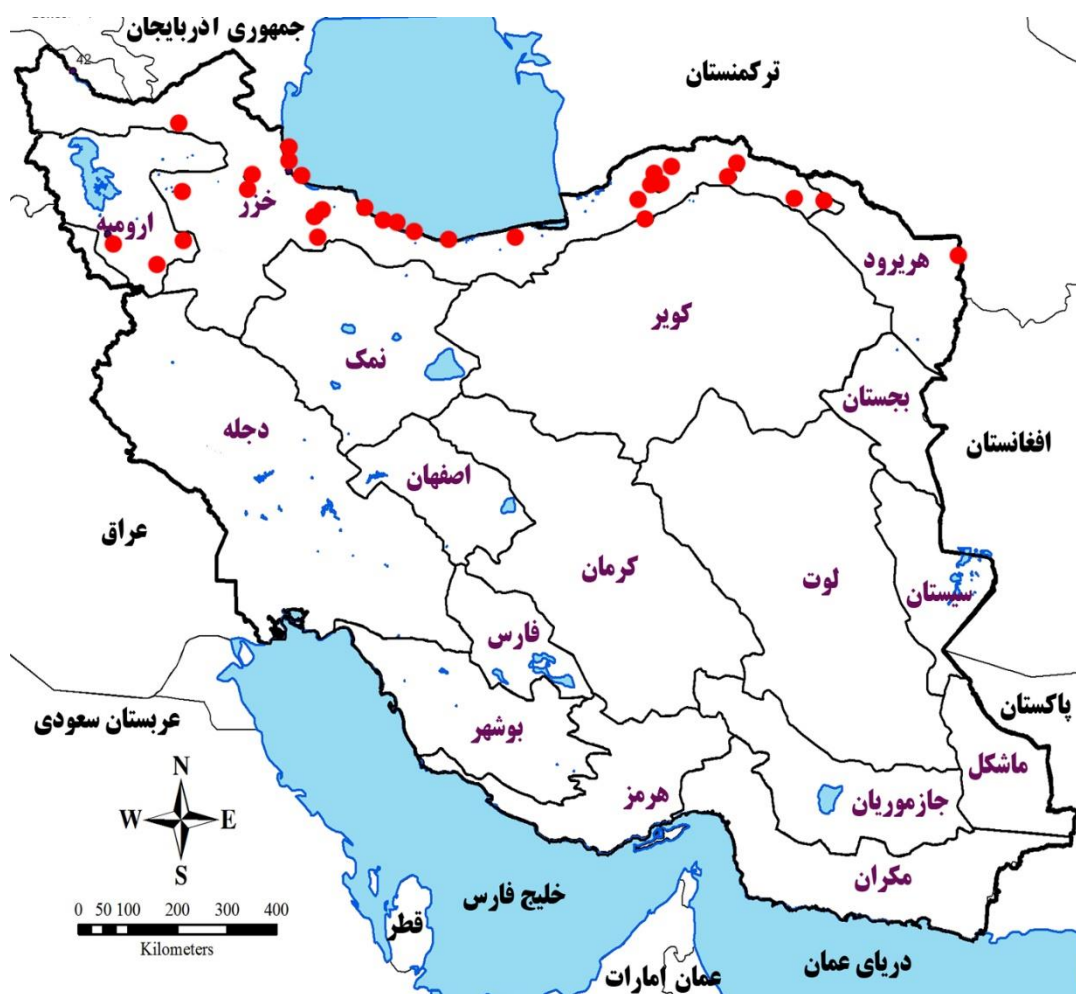
(Mouludi-Saleh *et al.*, 2017; Ghorbani-Ranjbari *et al.*, 2017, 2018). ریخت‌سنجی هندسی در مطالعات بوم‌شناسی، جغرافیای زیستی، رده‌بندی، انعطاف‌پذیری ریختی و تکامل منجر به گونه‌زایی به طور گسترده برای درک تغییرات فرم در فضا و زمان در طول تکامل، ارتباط ژنتیکی و تأثیر فاکتورهای زیست‌محیطی استفاده شده است. این ابزار مقایسه بین فرم‌های زیستی را بر اساس مختصات نقاط لندها امکان‌پذیر می‌سازد (Bookstein, 1991).

سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta*) (Güldenstädt, 1773) در منابع آب شیرین اعم از آبگیرها، دریاچه‌ها، چشمه‌ها و رودخانه‌ها حضور گسترده‌ای دارد. این ماهی با رژیم غذایی همه‌چیزخواری فاقد رقابت غذایی بادیگر گونه‌های ماهیان است و به همین علت می‌توان آن را با دیگر نمونه‌های سنتی پرورش ماهی بصورت کشت توأم پرورش داد. این ماهی در فارسی با نام سیاه‌ماهی، گل‌خور و یا تیل‌خوس شناخته می‌شود و یکی از گونه‌های غالب و بومی حوضه دریای خزر و به خصوص رودخانه سفیدرود به حساب می‌آید. از جمله خصوصیات ظاهری این ماهی داشتن یک جفت سیبک فکی، بدنی کشیده و پوشیده از فلس‌های گرد است. این ماهی دارای ارزش صید تجاری و ورزشی در منطقه می‌باشد و از جمله فراوان‌ترین ماهیان رودخانه‌های حوضه دریای خزر می‌باشد (Keivany *et al.*, 2016; Esmaili *et al.*, 2017). این ماهیان تمایل دارند در آب‌های کم‌عمق با سرعت آب متوسط و پوشش بستر سنگلاخی زندگی کنند. با توجه به اهمیت شناسایی ذخایر آبزیان در مدیریت کارآمد شیلاتی و بهره‌برداری بهینه ذخایر ماهی و با وجودی که مطالعات چندی در زمینه ساختار جمعیتی سیاه‌ماهی در حوضه خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی انجام شده (Heidari *et al.*, 2015; Eagderi *et al.*, 2011; AnvariFar *et al.*, 2009; Samaee *et al.*, 2015) ولی تاکنون مقایسات بین حوضه‌ای برای این گونه انجام نشده است، لذا هدف از این مطالعه، مقایسه سیاه‌ماهی *Capoeta capoeta* در رودخانه‌های سه حوضه خزر، ارومیه و هریرود بود.

مواد و روش‌ها

در مجموع ۷۱۳ قطعه ماهی از ۳۱ جمعیت رودخانه‌های حوضه‌های خزر (۵۹۳ قطعه)، ارومیه (۹۷ قطعه) و هریرود (۲۳ قطعه) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱، جدول ۱). نمونه‌ها پس از صید با تور پره در تابستان ۱۳۸۹ توسط محلول گل میخک ۱٪ بی‌هوش و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت و پس از انتقال به آزمایشگاه و اطمینان از کامل شدن مراحل تثبیت در الکل ۷۰٪ جهت شماره زنی و انجام بیومتری نگهداری شدند. به منظور تهیه لندها، تصاویر دیجیتال با استفاده از دوربین هشت مگاپیکسلی کمن ۱ از فاصله ۱۵ سانتی‌متری با شرایط یکسان از تمامی نمونه‌ها عکس‌برداری شد. سپس لندها (جدول ۲) با استفاده از نرم‌افزار Tpsdig2 (1.46) بر روی تصاویر دو بعدی قرار داده شدند. روی هم‌گذاری جایگاه لندها با استفاده از تحلیل پروکراست و حذف تغییرات غیرشکل (مقیاس، جهت و موقعیت) با نرم‌افزار TpsRelw (1.46) انجام شد.

خصوصیات اندازه‌گیری سیاه‌ماهی در دو جنس نر و ماده در خارج از فصل تولیدمثلی یکسان هستند (Anvarifar *et al.* 2011; Heidari *et al.* 2013). به همین دلیل، همه محاسبات اندازه‌گیری برای دو جنسیت نر و ماده با هم انجام گرفت. داده‌های ریخت‌سنجی گونه‌های مورد مطالعه برای مقایسه ویژگی‌های ریختی با استفاده از نرم‌افزارهای Tps series استخراج شد. تحلیل متغیرهای کانونی، با استفاده از نرم افزار SPSS 19، Excel 2013 و Morphoj (Version 1.02d) برای تجزیه و تحلیل‌های آماری و ترسیمی استفاده شد.



شکل ۱: نقشه موقعیت جغرافیایی نقاط نمونه‌برداری (Keivany *et al.*, 2016).

جدول ۱: مشخصات مناطق نمونه‌برداری.

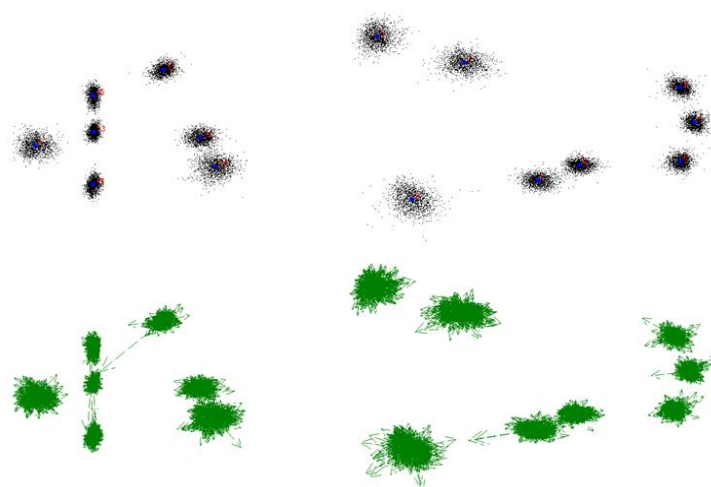
مختصات جغرافیایی	تعداد	نام منطقه	حوضه
61°10'22"E,	۲۳	کانال هریرود	هریرود
46°33'41"E,	۳۷	سنته	ارومیه
47°06'51"E,	۳۰	آق‌دره	
45°41'49"E,	۳۰	مه‌آباد	
55°27'10"E,	۱۶	تیل‌آباد	خزر
50°18'06"E,	۱۷	پل‌رود	
55°42'43"E,	۲۵	مادرسو	
47°02'06"E,	۲۵	اهرچای	
50°52'06"E,	۲۵	تنکابن	
50°45'07"E,	۲۵	چالکرو	
36°52'36"N,	۲۵	پاشایی	
51°14'50"E,	۲۵	پلنگ‌آبرود	
48°16'27"E,	۲۵	قزل‌اوزون	
57°10'20"E,	۲۵	شیرین‌دره	
51°53'57"E,	۲۵	نور	
57°03'16"E,	۲۵	یازه‌را	
48°53'49"E,	۲۵	شیرآباد	
49°32'34"E,	۲۵	شاه‌رود	
58°10'40"E,	۲۵	مفرنقا	
49°09'17"E,	۲۵	شفارود	
45°03'53"E,	۲۵	زنگمار	
55°24'12"E,	۲۵	مینودشت	
48°13'49"E,	۲۵	آریاچای	
55°40'49"E,	۲۵	گرگانرود	
47°07'13"E,	۲۵	قرنقوچای	
49°31'16"E,	۲۵	سفیدرود	
53°05'10"E,	۳۰	تجن	
51°13'11"E,	۳۰	کلارآباد	

جدول ۲: لیست لندمارک‌های تعریف شده.

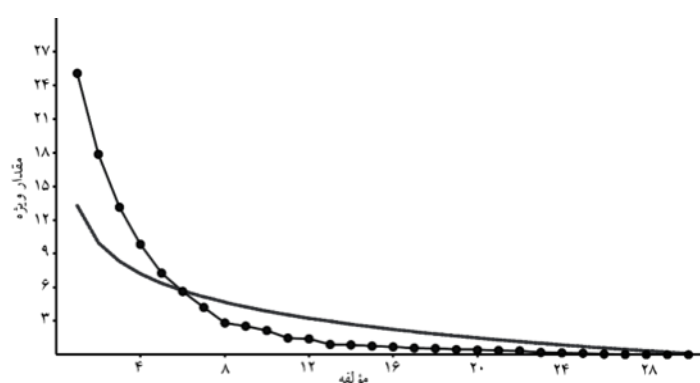
شماره لندمارک	موقعیت نقاط روی بدن ماهی
۱	نوک پوزه
۲	ابتدای قاعده پشتی
۳	انتهای قاعده پشتی
۴	حداکثر تو رفتگی ساقه دم در بالا
۵	انتهای ترین بخش ساقه دم مرز بین ساقه دم و باله دم
۶	حداکثر تو رفتگی ساقه دم در پایین
۷	ابتدای قاعده باله مخرجی (نقطه شروع قاعده باله مخرجی)
۸	انتهای قاعده باله مخرجی (نقطه انتهایی قاعده باله مخرجی)
۹	نقطه شروع باله شکمی (ابتدایی ترین بخش قاعده باله شکمی)
۱۰	نقطه شروع باله سینه‌ای (ابتدایی ترین بخش قاعده باله سینه‌ای)
۱۱	انتهای ترین بخش سرپوش آبششی به سمت بدن
۱۲	خطی موازی با انتهای سرپوش آبششی به سمت بالای بدن
۱۳	وسط چشم
۱۴	امتداد خطی موازی از نقطه وسط چشم به سمت پایین بدن ماهی
۱۵	امتداد خطی موازی از نقطه وسط چشم به سمت بالای بدن ماهی

نتایج

میزان جابجایی و به نوعی دقت لندمارک گذاری از دقت قابل قبولی برخوردار بود و کلیه لندمارک ها در موقعیت هدف قرار داشتند و جابه جایی در موقعیت تعداد ناچیزی لندمارک دیده شد (شکل ۲). مطابق نتایج تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA)، شش مؤلفه اول که بالاتر از نقطه برش جولیف (۰/۰۰۰۳۵۴) قرار داشتند، بعنوان عوامل اصلی تفکیک کننده جمعیت ها انتخاب گردیدند (شکل ۳) که این شش مؤلفه در مجموع ۷۸/۸۸ درصد (جدول ۴) واریانس را به خود اختصاص دادند. نحوه توزیع جمعیت های مورد مطالعه و نیز تغییرات شکل بدنی جمعیت ها در راستای دو محور PC1 و PC2 در نمودار تجزیه به مؤلفه های اصلی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۲: میزان جابجایی و تغییرات در موقعیت لندمارک ها نسبت به شکل میانگین جمعیت های مورد مطالعه.



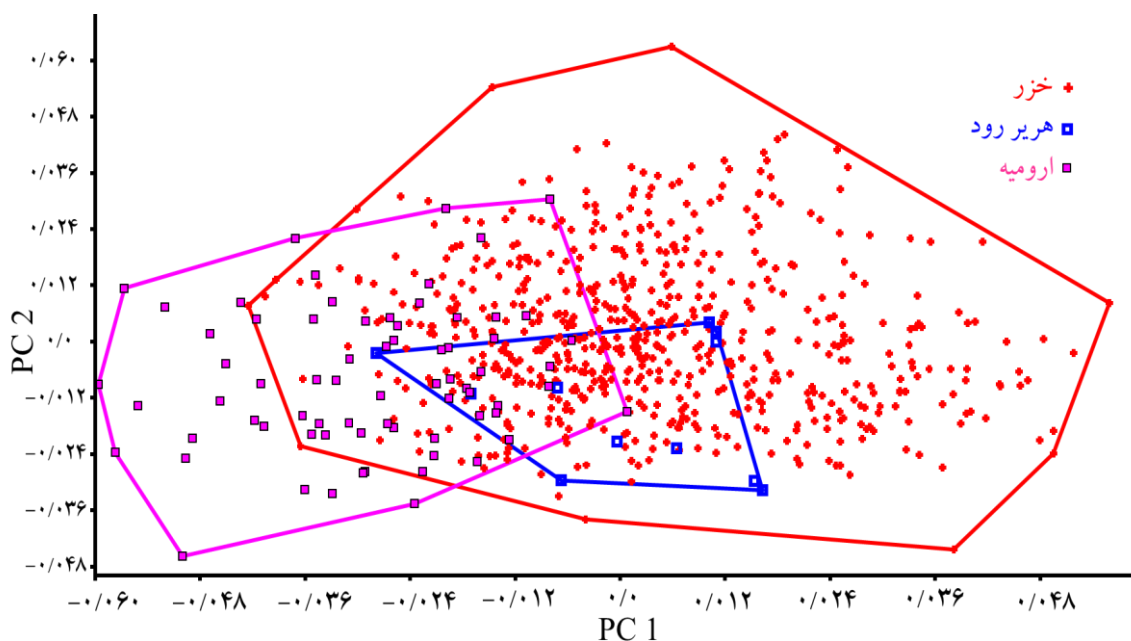
شکل ۳: اسکری پلات^۱ تحلیل مؤلفه های اصلی و نمایش نقطه برش جولیف (خط ممتد) که نشان دهنده مرز مؤلفه های اصلی (دایره ها) معنی دار است.

^۱ Scree plot

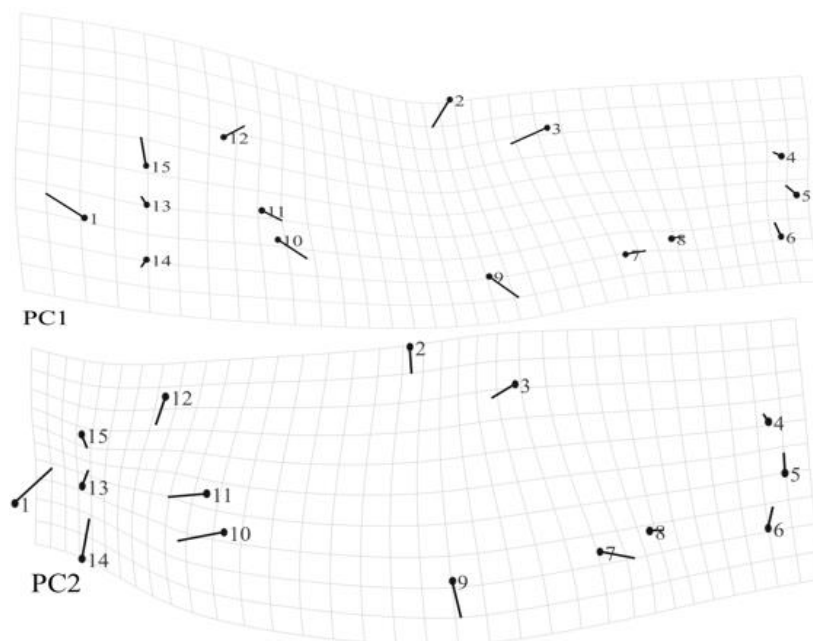
جدول ۳: مقادیر واریانس و مقادیر ویژه شش مؤلفه اصلی اول شکل بدن جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. gracilis*) مورد مطالعه.

مؤلفه‌ها (PCs)	مقادیر ویژه	واریانس
۱	۰/۰۰۰۳۸	۲۵/۰۹
۲	۰/۰۰۰۲۷	۱۷/۸۷
۳	۰/۰۰۰۲۰	۱۳/۱۵
۴	۰/۰۰۰۱۵	۹/۸۴
۵	۰/۰۰۰۱۱	۷/۲۹
۶	۰/۰۰۰۰۸۶	۵/۶۵
جمع		۷۸/۸۸

مطابق شکل ۳، مؤلفه‌های ۱ و ۲ جمعیت‌های مورد مطالعه با هم هم‌پوشانی دارند. در بررسی تغییرات الگوی شکل بدنی جمعیت‌های مورد مطالعه (شکل ۴)، با حرکت در جهت مثبت محور PC1 شکل بدنی جمعیت‌ها تمایل به افزایش اندازه سر (موقعیت لندمارک‌های ۱، ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۱۴)، کاهش ارتفاع بدن (لندمارک‌های ۲، ۳ و ۹) و نیز کاهش طول ساقه دمی (لندمارک‌های ۴، ۵ و ۶) دارند. همچنین با حرکت در جهت مثبت محور PC2 شکل بدنی جمعیت‌ها تمایل به کاهش اندازه سر (موقعیت لندمارک‌های ۱، ۱۵، ۱۲، ۱۰ و ۱۴)، کاهش ارتفاع بدن و حرکت به سمت عقب بدن باله پشتی (لندمارک‌های ۲ و ۳) و نیز تا حدودی کاهش طول ساقه دمی (لندمارک‌های ۷ و ۸) و حرکت رو به عقب باله مخرجی (لندمارک‌های ۷ و ۸) دارند.



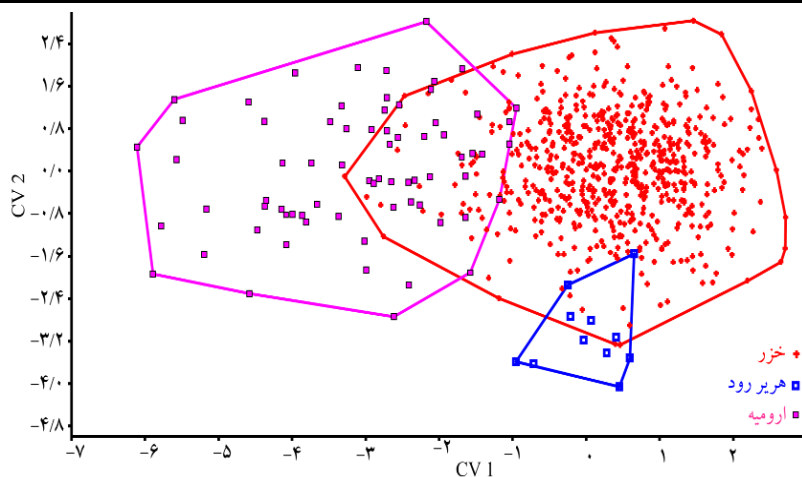
شکل ۳: نمودار تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) شکل بدن جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه.



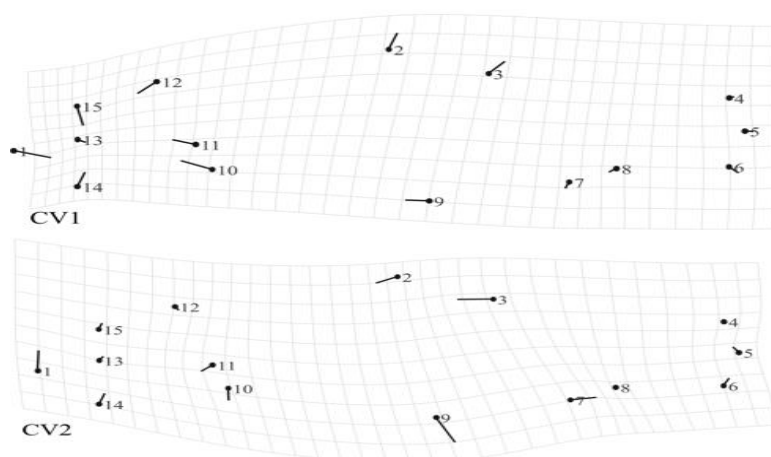
شکل ۴: تغییرات شکل بدنی جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه در جهت هریک محورهای PC1 و PC2.

تحلیل همبستگی کانونی (CVA) بر اساس ارزش p حاصل از آزمون جایگشت (Permutation test) نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P < 0.0002$) و ($f = 13/87$) ($Wilks\lambda = 0.0082$) بین شکل بدن جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. در این شکل همه جمعیت‌ها تا حد زیادی از یکدیگر جدا شدند، ولی جمعیت هریرود کاملاً از جمعیت ارومیه جدا شد (شکل ۵). در شکل ۶ تغییرات شکل بدنی جمعیت‌های مورد مطالعه ارایه شده است. با توجه به شکل با حرکت در جهت مثبت محور CV1 شکل بدنی جمعیت‌های مورد مطالعه تمایل به کاهش اندازه سر (لندمارک‌های ۱، ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۱۴)، افزایش ارتفاع بدن (لندمارک‌های ۳ و ۹) دارند و نیز با حرکت در جهت مثبت محور CV2 شکل بدنی جمعیت‌های مورد مطالعه تمایل به افزایش اندازه سر (لندمارک‌های ۱، ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۱۴)، افزایش ارتفاع بدن (لندمارک‌های ۲، ۳ و ۹) و کاهش طول ساقه دمی (لندمارک‌های ۴، ۵ و ۶) دارند. مقادیر فاصله ماهالانوبیس و پروکراست که بعنوان درجه تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه براساس ویژگی‌های شکل بدن هستند و به نوعی با تمایز رابطه مستقیم دارد، فاصله بیشتری بین جمعیت‌های حوضه ارومیه با جمعیت‌های دو حوضه دیگر نشان می‌دهد (جداول ۴ و ۵). تحلیل خوشه‌ای جمعیت‌ها با ضریب کوپرنیک^۱ ۰/۸۱۸، جمعیت‌های مورد مطالعه را به دو گروه اصلی تقسیم کرده است: هریرود و خزر در یک گروه و ارومیه در یک گروه (شکل ۷).

¹ Copernicus index



شکل ۵: نمودار تحلیل همبستگی کانونی (CVA)^۱ شکل بدن جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه.



شکل ۶: تغییرات شکل بدنی جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) در جهت هر یک محورهای CV1 و CV2.

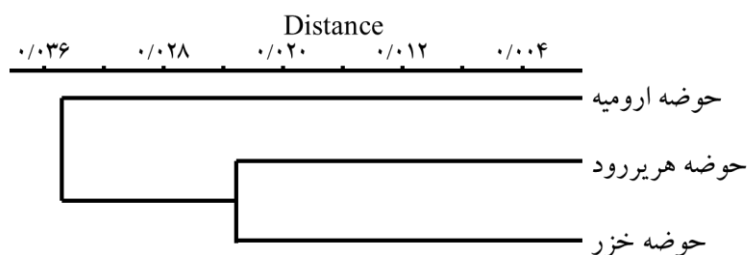
جدول ۴: فواصل Mahalanobis شکل بدن حاصل از آزمون CVA در جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه.

گروه‌ها	خزر	هریرود
هریرود	۳/۱۱۳۲	
ارومیه	۳/۲۶۷۱	۴/۱۶۷۷

جدول ۵: فواصل پروکراست شکل بدن حاصل از آزمون CVA در جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه.

گروه‌ها	خزر	هریرود
هریرود	۰/۰۲۳۱	
ارومیه	۰/۰۳۴۷	۰/۰۳۴۸

^۱ Canonical Variance Analysis



شکل ۷: تحلیل خوشه‌ای شکل بدن در جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*).

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی صفات ریخت‌شناسی ماهیان در مقایسه با سایر مهره‌داران بیشتر دچار تغییرات درون و بین‌گونه‌ای شده و نسبت به تغییرات ناشی از محیط حساسیت بیشتری دارند، بنابراین، اثرات بعضی از عامل‌های محیطی نظیر درجه حرارت، شوری، دسترسی به غذا و یا فاصله مهاجرت می‌تواند به طور بالقوه تفکیک ریختی ماهیان را تعیین کند (Lindsey, 1988; Tajik and Turan, 2000; Keivany, 2018; Smith, 1996). مطالعه صفات‌های ریخت‌شناسی با هدف تعریف و شناسایی واحدهای جمعیتی از پیشینه‌ای طولانی در دانش زیست‌شناسی ماهی برخوردار است. در گذشته تصور می‌شد که تغییرات ریختی صرفاً ژنتیکی است، اما امروزه مشخص شده که منشأ این تغییرات هم محیطی و هم ژنتیکی است. پژوهش‌های اخیر مشخص کرده است که اختلافات ریخت‌شناسی بین گروه‌های مختلف ماهیان الزاماً آن‌ها را از لحاظ ژنتیکی جدا نمی‌کند و در عوض در پاره‌ای از موارد تفاوت‌های ریخت‌شناسی صرفاً ناشی از محیط بوده و اختلافات ژنتیکی هیچ نقشی در آن ندارد به این ترتیب نقش محیط به عنوان عامل اصلی تغییرات ریختی به اثبات رسیده است (Holtby, 1989; Tudela, 1999; Turan, 2000; Poulet et al., 2004). صفات‌های محیطی در خلال دوران اولیه تکامل ماهی غالب بوده و افراد نسبت به شرایط محیطی حساسیت بیشتری دارند. معمولاً ماهیانی که در دوران اولیه زندگی دارای شرایط محیطی مشابهی هستند از لحاظ ریختی وضعیت مشابهی دارند (Pinheiro, 2005) از سوی دیگر، هنگامی که ماهی در اوضاع محیطی جدیدی قرارگیرد، این امکان وجود دارد که تغییرات ریختی سریعاً در آن رخ دهد. ماهیان نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساس بوده و می‌توانند خودشان را با ایجاد تغییرات ریختی لازم با شرایط محیطی جدید سازگار نمایند. به خوبی مشخص شده است که صفات ریختی می‌توانند انعطاف بالایی را در پاسخ به تفاوت‌های شرایط محیطی از جمله فراوانی غذا و دما نشان دهند (Stearns, 1893; Robinson & Wilson, 1994)، از این رو ماهیان تغییرات بالایی در صفات ریختی در هر دو سطح درون و بین جمعیت نسبت به سایر مهره‌داران به نمایش می‌گذارند و نسبت به ایجاد تغییرات ریختی در اثر تغییرات محیطی بسیار مستعد هستند (Stearns, 1893). انعطاف‌پذیری ریختی به وسیله ایجاد اصلاحات و تغییراتی در فیزیولوژی و رفتار نسبت به تغییرات محیطی مثل شرایط جدید ناشی از ساخت سد می‌باشند. این سازگاری‌ها در نهایت در تغییرات شکل بدن همانند تفاوت‌های ریختی مشاهده شده در این تحقیق، را ایجاد می‌کند (Hossain

(et al., 2010). ماهیان گستره وسیعی از تغییرات ریختی درون‌گونه‌ای را نشان می‌دهند که به طور اکولوژیکی و تکاملی مهم هستند. بدون موانع فیزیکی برای جریان ژنی و مهاجرت ماهیان، فرصت کمی برای سازگاری محلی وجود دارد که می‌تواند منجر به یک‌نواختی جمعیت شود (Robinson & Wilson, 1994).

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) شکل بدن برای صفات شمارشی جمعیت‌های سیاه‌ماهی (*C. capoeta*) مورد مطالعه نشان داد که جمعیت حوضه هریرود به خوبی از سایر جمعیت‌ها تفکیک شده است و جمعیت‌های دو حوضه ارومیه و خزر تا حدی با یکدیگر هم‌پوشانی دارند. نتایج تحلیل همبستگی کانونی (CVA) جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که جمعیت‌های مختلف با یکدیگر اختلاف معناداری دارند، هرچند هم‌پوشانی بین آنها وجود دارد. نمودار تحلیل خوشه‌ای نشان داد که جمعیت‌های دو حوضه خزر و ارومیه در یک گروه قرار دارند و بیشترین تمایز را با جمعیت هریرود دارند. سه حوضه هریرود، خزر و ارومیه از نظر شرایط محیطی با هم متفاوت هستند و از سوی دیگر، این حوضه‌ها به واسطه شرایط جغرافیایی از هم دورند و احتمال می‌رود که دلیل اصلی جدایی این سه حوضه شرایط جغرافیایی و محیطی متفاوت باشد.

اثرات بعضی از فاکتورهای محیطی نظیر درجه حرارت، شوری، دسترسی به غذا و یا فاصله مهاجرت می‌تواند به طور بالقوه تفکیک ریختی ماهیان را تعیین کند. حتی در بین جمعیت‌های مختلف از یک گونه، شرایط زیستگاهی می‌تواند تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر ریخت ماهیان اعمال کند (Schluter & McPhail, 1992). Turan et al. (2004)، یکی از دلایل به وجود آمدن اختلافات ریختی ماهیان را در متفاوت بودن بسترهای تخم‌ریزی و در نتیجه جدا بودن منشأ آنها دانسته‌اند. در بررسی تفاوت‌های ریخت‌شناسی ماهی سوف (*Sander lucioperca*) در رودخانه دانوب^۱ نیز وجود چهار جمعیت مجزا در این منطقه تشخیص داده شد و عنوان شد که این اختلاف نه تنها در نتیجه مناطق جغرافیایی جدا از هم، بلکه به دلیل تفاوت در منشأ تولیدمثلی آنها است (Cetkovic & Stamenkovic, 1996).

با توجه به متنوع بودن ویژگی‌های محیطی و جدایی جغرافیایی حوضه‌ها و جمعیت‌های سیاه‌ماهی مورد بررسی، ریخت‌سنجی هندسی جمعیت‌های مورد بررسی را از هم جدا کرد و نشان داد که از نظر ریختی تفاوت‌های وجود دارد و می‌توان آن‌ها را از هم تفکیک کرد. با این وجود برای مطالعه دقیق‌تر نیاز به کارها و آزمایش‌های مولکولی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقایان دکتر سالار درافشان، دکتر منوچهر نصری، دکتر سعید اسدالله، مهندس علی نظام‌السلامی، مهندس سید محمدعلی موسوی، مهندس ابوالفضل روزدار و مهندس علی میرزایی جهت همکاری در

¹ Danube River

نمونه برداری تشکر و قدردانی می نماییم. هزینه های مالی اجرای این پژوهش توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

منابع

- AnvariFar, H., Khyabani, A., Farahmand, H., Vatandoust, S., AnvariFar, H. and Jahageerdar, S. (2011). Detection of morphometric differentiation between isolated up-and downstream populations of Siah Mahi (*Capoeta capoeta gracilis*) (Pisces: Cyprinidae) in the Tajan River (Iran). *Hydrobiology*, 673(1): 41-52.
- Banimasani, M., Keivany, Y. and Ebrahimi, E. (2017). Comparative geometric morphometric study of *Capoeta fusca* populations in Kavir and Harirud basins. *Exp. Anim. Biology*, 7(4): 107-115.
- Bookstein, F.L. (1991). *Morphometric tools for landmark data: geometri and biology* Cambridge: Cambridge University Press.
- Cadrin, S.X. (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 10: 91-112.
- Cardini, A., DinizFilho, J.A.F., Polly, P.D. and Elton, S. (2010). Biogeographic analysis using geometric morphometrics: clines in skull size and shape in a widespread African arboreal monkey. A.M.T. Elewa (Ed.), *Morphometrics for Nonmorphometricians*, Lect. Not. Earth Sciences, 10(53): 958-978.
- Cetkovic, J.K. and S. Stamenkovic. (1996). Morphological differentiation of the pikeperch *Stizostedion luci operca* (L.) populations from the Yugoslav part of the Danube. *Fin. Zool. Bot. Publ. Board*, 33: 711-723.
- Eagderi, S., Esmailzadegan, E. and Madah, A. (2013). Body shape variation in riffle minnows (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii 1863) populations of Caspian Sea basin. *J. Taxon. Biosystematics*, 5(4): 1-8.
- Eagderi, S., Esmailzadegan, E. and Pirbeigi, A. (2015). Morphological responses of *Capoeta gracilis* and *Alburnoides eichwaldii* populations (Cyprinidae) fragmented due to Tarik Dam (Sefidrud River, Caspian Sea basin, Iran). *Iran. J. Ichthyology*, 1(2): 114-120.
- Esmaeili, H.R., Mehraban H, Abbasi K, Keivany Y. and Coad B.W. (2017). Review and updated checklist of freshwater fishes of Iran: Taxonomy, distribution and conservation status. *Iran. J. of Ichthyology*, 4(Suppl. 1): 1-114.
- Ghorbani-Ranjbari, Z., Keivany, Y., and Zamani, F.M. (2017). Geometric morphometric comparison of *Barilius mesopotamicus* (Berg 1932) populations in Diala and Tigris River Basins. *Journal of Fisheries* 70 (3), 231-242.
- Ghorbani-Ranjbari, Z., and Keivany, Y. (2018). Geometric morphometric comparison of *Barilius mesopotamicus* (Berg 1932) populations in Bushehr basin. *J. Anim. Research (Iran. J. Biology)* 31 (2), 242-254
- Heidari, A., Khoshkholgh, M., and Mousavi-Sabet, H. (2015). Tracing the effects of Sefidrud dams on *Capoeta gracilis* (Cyprinidae) populations using Truss distances in southern Caspian Sea basin. *Iran. J. Ichthyology*, 1(2): 106-113.
- Holtmeier, C.L. (2001). Heterochrony, maternal effects, and phenotypic variation among sympatric pupfishes. *Evolution*, 55: 330-338.

- Hossain, M.A., Nahiduzzaman, M., Saha, D., Khanam, M.U. H. and Alam, M.S. (2010). Landmark-based morphometric & meristic variations of the endangered carp, *kalibaus Labeocalbasu*, from stocks of two isolated rivers, the Jamuna and Halda, and a hatchery. *Zool. Studies*, 49(4): 556-563.
- Jalili, P., Eagderi, S. and Keivany, Y. (2015). Body shape comparison of Kura bleak (*Alburnus filippii*) in Aras and Ahar-Chai rivers using geometric morphometric approach. *Res. Zoology*, 5(1): 20-24.
- Jerry, D.R. and Cairns S.C. (1998). Morphological variation in the catadromous Australian bass, from seven geographically distinct riverine drainages. *J. Fish Biology*, 52: 829-843.
- Keivany, Y., Nasri, M., Abbasi, K. and Abdoli, A. (2016). Atlas of inland water fishes of Iran. Iran Department of Environment Press. 218 p.
- Keivany, Y. and Arab, M. (2017). Geometric morphometric comparison of trout barb, *Capoeta trutta* (Teleostei: Cyprinidae) in the Tigris River basin. *Iran. J. Ichthyology*, 4(3): 220-230.
- Keivany, A., Tahmasebi, F. and Farhadian, O. 2017. Body shape variation of Kura barb (*Barbus* spp.) in Iranian basins. *J. Exp. Anim. Biology*, 7(2): 97-103.
- Langerhans, R.B. and Reznick, D.N. (2010). Ecology & evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. In: *Fish locomotion: (eds. Domenici, P. & Kapoor, B.G.) an Ecoethological Perspective*. pp. 200-248.
- Mohadasi, M., Shabanipour N. and Eagderi S. (2013). Habitat-associated morphological divergence in four Shemaya, *Alburnus chalcoides* (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in the southern Caspian Sea using geometric morphometrics analysis. *Internatl. J. Aquat. Biology*, 1(2): 82-92.
- Mouludi-Saleh, A., Keivany, Y. and Jalali, S.A.H. (2017). Geometric Morphometric Comparison of Namak Chub (*Squalius namak*, Khaefi et al., 2016) in Rivers of Lake Namak Basin of Iran. *Res. Zoology*, 7(1): 1-6.
- Pinheiro, A., Teixeira, C.M., Rego, A., Marques, J.F. and Cabral, H.N. (2005). Genetic & morphological variation of *solea lascaris* (Risso, 1890) along the portugese coast. *Fish. Research*, 23: 67-78.
- Poulet, N., Berrebi, P., Crivelli, A.J., Lek, S. and Argillier, C. (2004). Genetic and morphometric variations in the pikeperch (*Sander lucioperca*) of a fragmented delta. *Arch. Hydrobiology*, 159(4): 531-554.
- Razavipour, P., Eagderi, S., Poorbagher, H., Javanshir Khoi, A. and Keivany, Y. (2015). Phenotypic plasticity of the Tuini fish, *Capoeta damascina*, (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in Iranian part of Tigris basin using geometric morphometric approach. *J. Anim. Researches*, 28: 170-179.
- Robinson, B.W. and Wilson D.S. (1995). Experimentally induced morphological diversity in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Copeia*, 1995: pp. 294-305.
- Robinson, B.W. and Wilson, D.S. (1994). Character release & displacement in fishes: a neglected literature. *Amer. Naturalist*, 144: 596-627.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Cussac, V.E., Macchi, P.J. and Alonso, M.F. (1998). Trophic polymorphism, habitat & diet segregation in Percichthystrucha (Pisces: *Percichthyidae*) in the Andes. *Biol. J. Lin. Society*, 65: 191-214.

- Salini, J.P., Milton, D.A., Rahaman, M.J. and Hussein, M.G. (2004). Allozyme & morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, hilsa *Tenualosa ilisha*. Fish. Research, 66: 53-69.
- Samaei, S.M., Patzner, R.A. and Mansour, N. (2009). Morphological differentiation within the population of Siahmahi, *Capoeta capoeta gracilis*, (Cyprinidae, Teleostei) in a river of the south Caspian Sea basin: a pilot study. J. Appl. Ichthyology, 25: 583-590.
- Schluter, D. and McPhail, J.D. (1992). Ecological character displacement and speciation in Sticklebacks. Amer. Naturalist, 140: 85-108.
- Smith, G.R. (1966). Distribution and evolution of the North American catostomid fishes of the subgenus *Pantosteus*, genus *Castostomus*. Miscel. Publ., Mus. Zool., Univ. Mich. 129: 1-122.
- Smith, T.B. and Skulason, S. (1996). Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. Ann. Rev. Ecol. Systematics, 27: 111-133.
- Stearns, S.C. (1983). A natural experiment in life-history evolution: field data on the introduction of mosquitofish (*Gambusia affinis*) to Hawaii. Evolution, 37: 601-617.
- Swain, D.P. and Holtby, L.B. (1989). Differences in morphology and behavior between juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* rearing in a lake & in its tributary stream. Can. J. Fish. Aquat. Sciences, 46(8):1406-1414.
- Tajik, Z. and Keivany, Y. (2018). Body shape comparison of Urmia bleak populations, *Alburnus atropatense*. J. Anim. Environment, 10 (2): 149-160.
- Tudela, S. (1999). Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy. *Engraulis encrasicolus*. Fish. Res. 42(3): 229-243.
- Turan, C. (2000). Otolith shape & meristic analysis of herring (*Clupea harengus*) in the North-East Atlantic. Arch. Fish. Mar. Research, 48(3): 213-225.
- Turan, C. (2008). Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16 s rDNA sequence data. Acta Zoologica 51(2): 1-14.
- Turan, C., Erguden, D., Gurlek, M. and Turan, F. (2004). Morphometric structuring of the Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Black, Aegean & Northeastern Mediterranean Seas. Turk. J. Vet. Anim. Sciences, 28: 865-871.

Geometric morphometric comparison of teilehkhush fish (*Capoeta capoeta*) in three basins of Iran

Y. Keivany^{1*}, M. Banimasani², E. Ebrahimi³

Received: 2017.5.29

Accepted: 2018.1.14

Abstract

In order to compare the geometric morphometrics of teilehkhush (*Capoeta capoeta*) populations, 713 specimens from 32 rivers in Caspian Sea, Urmia and Harirud basins were examined. Specimens were anesthetized in 1% clove oil solution after catching by a seine net and fixed in 10% formalin and transferred to laboratory for further studies. The specimens were photographed in a similar condition by a Canon 8MP and land marked in Tpsdig2 software. Superimposition of the landmarks was performed by Procrustes analysis to eliminate non-shape variations in TpsRelw. The Canonical Variate Analysis (CVA) results of geometric morphometry showed significant differences among the populations, and Harirud population was fully separated from Urmia populations. Caspian Sea population overlapped with both other populations. The Cluster Analysis (CA) with a Copernicus index of 0.818, grouped the populations into two groups, Harirud and Caspian Sea populations in one separate group and Urmia population in another one, indicating a more similarity between the Harirud and Caspian Sea populations. However, for more details, molecular studies are needed.

Keywords: Caspian Sea basin, Urmia basin, Harirud Basin, barb, Cyprinidae.

1- Associate Professor, Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
*(Corresponding author Keivany@cc.iut.ac.ir).

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

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

بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی مستقیم گلرنگ با استفاده از قطعات ریشه، لپه و محور زیر لپه

محمد افشارشاندیز^۱، حسن رهنما^۲، حسین آذر نیوند^{۳*}

تاریخ ارسال: ۱۳۹۵/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

چکیده

گلرنگ یکی از گیاهان روغنی و سازگار یافته به شرایط سخت ایران است. ارقام زراعی زیاد و متنوعی از این گیاه در کشور وجود دارد. ارقام گلرنگ محتوای اسید چرب امگا ۶ بالایی دارند که نشان‌دهنده وجود مسیرهای پیشرفته ساخت اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره نسبتاً بلند در این گیاه است. به همین دلیل است که این گیاه گزینه مناسبی برای مهندسی مسیرهای مختلف سنتز اسیدهای چرب زنجیره بلند شناخته می‌شود. کشت بافت پیش‌نیاز انجام مهندسی ژنتیک (متابولیت) در گیاهان است. بدین منظور در این تحقیق شرایط بهینه کشت بافت رقم گلمهر گلرنگ انجام شد. برای این منظور پاسخ به ساقه‌زایی سه ریزنمونه ریشه، محور زیر لپه و لپه بر روی محیط MS غنی شده با غلظت‌های مختلف تیدیاورون/نفتالین استیک اسید و Zeatin/نفتالین استیک اسید بررسی شد. سپس تیمارهای پرزایی (Multiplication) و طویل‌سازی ساقه‌های باز شده اعمال و در نهایت تیمارهای مختلف ریشه‌زایی نوساقه‌ها بررسی شد. بیشترین باززایی‌های مشاهده شده ۲۸/۸٪، ۲۵/۱۵ و ۲۴/۵۳٪ به ترتیب برای تیمارهای محور زیر لپه (تیدیاورون، ۰.۵=نفتالین استیک اسید=۰)، ریشه (تیدیاورون، ۰.۵=نفتالین استیک اسید=۲) و لپه (تیدیاورون، ۰.۵=نفتالین استیک اسید=۲) بدست آمد. همچنین تیمار هورمونی BA(0.5mg/L)+Thiamin-HCl (4mg/L) توانست باعث پرزایی در ریزنمونه‌های باززا شده شود. به منظور افزایش باززایی ریزنمونه‌هایی که کالوس داده بودند، تیمار هورمونی BA(1mg/L) + نفتالین استیک اسید(1mg/L) اعمال شد که این تیمار تاثیر معنی‌داری در باززایی ریزنمونه‌های کالوس داده نداشت. در این تحقیق نیز ریشه‌دهی نوساقه‌ها با تیمارهای هورمونی مختلف با فراوانی کمتر از چهار درصد بدست آمد.

واژه های کلیدی: باززایی، کالوس‌زایی، کشت بافت، گلرنگ

مقدمه

گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) یکی از گیاهان دارویی با دانه‌های روغنی و یکساله است. این گیاه متعلق به خانواده کاسنی‌ها بوده و برای مناطق نیمه خشک مانند ایران به خوبی سازگار شده است (Kakaei et al. 2013). این گیاه در سطح

۱ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲ دانشیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳ استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول: hazar@ut.ac.ir

وسیع در دنیا برای استفاده‌ی گل‌ها و بذور آن (که هر دو ارزش صنعتی دارند) کشت می‌شود. از روغن بذر این گیاه به وفور در صنایع غذایی، رنگرزی، دارویی و به عنوان روان‌کننده استفاده می‌شود. سطح لینولئیک اسید^۱ (با فرمول شیمیایی $C_{18}H_{32}O_2$ و $\Delta^{9,12}$ 18:2) در بذور گلرنگ بیشترین سطح (۷۵-۹۰٪) در میان تمام روغن‌های گیاهی است به همین دلیل است که روغن گلرنگ با دارا بودن سطوح بسیار بالای اسیدهای چرب غیراشباع و نیز مقادیر قابل توجه آلفا-توکوفرول^۲ (عامل کاهنده‌ی میزان کلسترول خون و تاخیر در پیری) می‌تواند ارزش تغذیه‌ای بسیار بالایی در رژیم غذایی انسان داشته باشد (Yang et al. 2009). گیاه گلرنگ علاوه بر کاربردهای سنتی امروزه به عنوان بستری برای تولید متابولیت‌های ثانویه و محصولات تراریخته‌ای مانند گاما لینولئیک اسید^۳، انسولین انسانی، آپولیپوپروتئین^۴، هورمون‌های رشدی و ... معرفی شده است (Huang et al. 2015). راثو و جورج (Rao & George, 1989) اولین محققینی بودند که بر روی کشت بافت گلرنگ کار کردند. از آن زمان تا کنون کشت بافت و روش‌های باززایی ساقه برای ارقام هندی، آمریکایی، ترکی، چینی، استرالیایی و ایرانی گزارش شده است (Fan & Guo, 2013). باززایی گلرنگ از طریق باززایی مستقیم جوانه ساقه یا باززایی جوانه ساقه با واسطه‌ی کالوس بدست آمده است.

منابع ریزنمونه‌های گزارش شده شامل لپه‌های بریده شده، محور زیر لپه، برگ، ریشه، ساقه، بساک، اندوسپرم و محور جنینی بذور جوانه‌زده با یک لپه حذف شده می‌باشد پائین‌بودن نرخ باززایی گیاه گلرنگ در کشت بافت و عدم وجود دستورالعمل باززایی کارآمد برای اکثر ارقام آن، در اغلب موارد مهندسی ژنتیک این گیاه را با مشکل مواجه کرده است (Huang et al. 2015). برای حل این مشکلات، محققان ارزیابی‌های زیادی در رابطه با عوامل مختلف آزمایش مثل انتخاب نوع ریزنمونه، تغییر در وضعیت محیط کشت و تنظیم شرایط کشت انجام داده‌اند. از طرف دیگر ریشه‌دار کردن نوساقه‌ها نیز یکی از مسائل چالش برانگیز برای محققین بوده است (Kumar et al. 2015).

با توجه به نیاز بهینه‌سازی شرایط کشت بافت قبل از هرگونه انتقال ژن، در این تحقیق اثر پنج سطح هورمونی نفتالین استیک اسید^۵ با سه سطح از سیتوکین‌های تیدیازورون^۶ تیدیازورونو زآتین^۷ بر روی درصد کالوس‌دهی و باززایی سه ریزنمونه‌ی ریشه، محور زیر لپه و لپه رقم گلمهر گلرنگ بررسی شد. همچنین اثر تیمارهای هورمونی مختلف بر رشد ساقه و ریشه‌زایی نیز بررسی شد.

¹ Linoleic Acid

² Alpha tocopherol

³ Gama linolenic acid

⁴ Apo-Lipoprotein

⁵ Naphtalen acetic acid=NAA

⁶ Tidiazoron

⁷ Zeatin

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌های سترون: در این پژوهش از رقم پاییزه گلمهر گلرنگ استفاده شد. بذرهای مورد نیاز از مرکز تحقیقات اصلاح بذر و نهال تهیه شد. به منظور ضدعفونی بذور، ابتدا بذرهای گلرنگ در اتانول ۷۰٪ به مدت ۵۰ ثانیه قرار گرفته و سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس این بذرها به مدت ۸ دقیقه در محلول کلرید جیوه ($HgCl_2$) با غلظت ۰/۱٪ و وزنی به حجمی در حالی که به آرامی تکان داده می‌شدند، غوطه‌ور بودند و در نهایت بذرها ۳ الی ۴ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند و پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی سترون، بر روی محیط جامد 1/2MS (Murashig and Skoog, 1962) بدون هورمون قرار گرفتند. تمامی مراحل ضدعفونی و کشت در زیر هود سترون انجام شد.

تیمارهای هورمونی: محیط‌های کشت بعد از افزودن هورمون‌های گیاهی طبق جدول ۱ در شرایط استاندارد اتوکلاو شده و سپس در پتری‌های ۱۰ سانتی متری توزیع شدند. بذرهای سترون گلرنگ در اتاقک رشد برای جوانه زنی تحت شرایط نوری $35 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفته و در فاصله زمانی ۷-۸ روز گیاهچه‌هایی به طول ۳-۶ سانتی‌متر بدست آمد. این گیاهچه‌ها به زیر هود لامینار منتقل شده و ریزنمونه‌های ریشه (به همراه ریشه‌چه) و محور زیرلپه با طول ۰/۵-۱ سانتی‌متری و لپه‌های با ابعاد حدودی ۱ سانتی‌متر مربع بریده شده و از سمت پشت بر روی محیط هورمونی با ۳۰ گرم ساکارز در لیتر قرار گرفتند. تمامی تیمارها پس از دو هفته در محیط مشابه واکشت شدند تا بتوانند حداکثر استفاده را از محیط مغذی داشته باشند. نمونه‌های مورد آزمایش تا زمان تشکیل نوساقه‌ها هر ۱۴ روز یکبار به محیط مشابه منتقل و فراوانی باززایی نوساقه با شمارش تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری‌دیش محاسبه شده و به طور متناوب تحت شرایط سترون به محیط کشت MS طبق جدول ۱ (محیط طویل شدن ساقه) منتقل شدند تا به حداکثر رشد خود برسند. همچنین تحریک به باززایی کالوس‌هایی که بازانداخته بودند نیز طبق جدول ۱ انجام شد. در نهایت ریشه‌زایی نوساقه‌ها طبق جدول ۱ بررسی شد.

تجزیه داده‌های آماری: نرمال بودن داده‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 portable و در سطح معنی‌داری ۵٪ بررسی گردید. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار بررسی شد.

جدول ۱: اجزای محیط کشت و شرایط مختلف آزمون شده برای باززایی از ریزنمونه‌های مختلف ژنوتیپ گلرنگ

اجزای محیط کشت	محیط کشت
1-MS + TDZ (0.2,0.5,1mg/L) + NAA (0,0.2,0.5,1,2mg/L) + Sucrose (3%) + Agar (7%)	باززایی مستقیم ساقه
2-MS + Zeatin (0.2,0.5,1mg/L) + NAA (0,0.2,0.5,1,2mg/L) + Sucrose (3%) + Agar (7%)	
MS+BA (1mg/L)+ NAA (1mg/L)	القای کالوس‌ها به باززایی
MS+BA(0.5mg/L)+Thiamin-HCl (4mg/L) Sucrose (3%) + Agar (7%)	پرزایی در ریزنمونه‌های باززاشده
MS+control*	
MS+Kin (0.5mg/L)+Sucrose (3%) + Agar (7%)	طویل‌سازی ساقه
1- 1/2MS+ NAA (1mg/L)+ Sucrose (3% , 1.5%) + Agar (7%)	ریشه‌زایی
2- 1/2MS+ NAA (0.5mg/L)+ Sucrose (3% , 1.5%) + Agar (7%)	
3- 1/2MS+NAA (2mg/L)+ Zeatin (0.2mg/L)+ Sucrose (1.5%) + Agar (7%)	
4- 1/2MS+ IBA (0.2, 0.5, 1, 2, 2.5mg/L)+ Sucrose (3%, 1.5%) + Agar (7%)	

* ترکیب هورمونی این محیط مشابه ترکیب هورمونی استفاده شده جهت باززایی ساقه بود.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بیشترین کالوس (جنین‌زا و غیر جنین‌زا) پس از ۲۱ روز تشکیل شد. فراوانی کالوس‌زایی با شمارش تعداد ریزنمونه‌های کالوس داده به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده به دست آمد. در ریزنمونه‌های مختلف فرآیند باززایی نوساقه‌ها پس از ۲-۴ هفته پس از کشت مشاهده شد. اولین ریزنمونه‌های باززاشده مربوط به ریزنمونه‌های محور زیر لپه بودند که فرآیند باززایی در آن‌ها در بازه زمانی حدوداً ۲۰ روزه (از ۱۲-۳۲ روز پس از کشت) مشاهده شد. دیرترین نوساقه‌ها در ریزنمونه ریشه و در بازه زمانی حدود ۱۰ روز (از ۲۵-۳۵ روز پس از کشت) مشاهده شدند.

با توجه به جدول ۲ در ریزنمونه محور زیر لپه بیشترین میزان باززایی در تیمار تیدیاورون 0.5mg/L= با ۲۸/۸٪ مشاهده شد. همچنین کمترین میزان باززایی در تیمار تیدیاورون 1mg/L= و نفتالین استیک اسید 2mg/L= مشاهده شد. گزارش شده است که هورمون تیدیاورون 0.5mg/L= باعث ۹۸/۵٪ باززایی مستقیم می‌شود (Radhika et al. 2006). اگرچه این غلظت در تحقیق ما باعث باززایی بیش از ۹۸٪ در هیچ یک از ریزنمونه‌ها نشد اما باعث حصول بیشترین درصد باززایی در بین سایر تیمارها گردید. درصد کالوس‌زایی در کلیه تیمارهای تیدیاورون/نفتالین استیک اسید بیش از ۹۵٪ بود که این امر نشان دهنده تاثیر مناسب این سیتوکینین بر کالزایی ریزنمونه محور زیر لپه است. اگرچه درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه محور زیر لپه بسیار بالا بود اما میزان باززایی هیچ‌گونه ارتباطی با میزان کالوس‌زایی نداشت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود میزان باززایی از محل پریموردیای برگی^۱ در ریزنمونه‌های محور زیر لپه‌ای بیشتر است. جدیدترین نتایج نیز نشان می‌دهد که پریموردیای برگی

^۱ Leaf primordia

می تواند با فراوانی بالایی سبب باززایی ژنوتیپ های مختلف گلرنگ شوند. همچنین آنالیزهای هیستولوژیکی نشان دادند که منشا این پریموردیای برگی در گلرنگ، نواحی جانبی کورتکس ریزنمونه است (Patial et al. 2016).

جدول ۲: تاثیر تنظیم کننده های رشدی بر درصد کالوس زایی و باززایی ریزنمونه محور زیرپه ای گلرنگ (میانگین \pm انحراف معیار)

NAA	TDZ	کالوس زایی	باززایی	NAA	ZEATIN	کالوس زایی	باززایی
0	0.2	95 \pm 2.27 ^c	15.71 \pm 0.83 ^b	0	0.2	70 \pm 8.22 ^{ab}	7.06 \pm 1.14 ^a
0	0.5	100 \pm 00 ^a	28.8 \pm 2.28 ^a	0	0.5	53 \pm 5.22 ^{de}	0 ^a
0	1	100 \pm 00 ^a	6.76 \pm 3.12 ^{def}	0	1	62 \pm 6.78 ^{abcde}	0 ^a
0.2	0.2	96 \pm 1.72 ^{bc}	16.59 \pm 2 ^b	0.2	0.2	57 \pm 9.25 ^{bcde}	0 ^a
0.2	0.5	100 \pm 00 ^a	1.09 \pm 0.99 ^f	0.2	0.5	65 \pm 9.7 ^{abcd}	0 ^a
0.2	1	100 \pm 00 ^a	10.87 \pm 3.07 ^c	0.2	1	64 \pm 6.27 ^{abcd}	0 ^a
0.5	0.2	97 \pm 1.34 ^b	6.49 \pm 2.07 ^{def}	0.5	0.2	48 \pm 10.71 ^e	0 ^a
0.5	0.5	100 \pm 00 ^a	3.37 \pm 0.86 ^{fg}	0.5	0.5	60 \pm 7.22 ^{abcde}	0 ^a
0.5	1	100 \pm 00 ^a	14.81 \pm 4.49 ^b	0.5	1	56 \pm 10.45 ^{bcde}	0 ^a
1	0.2	100 \pm 00 ^a	9.9 \pm 1.25 ^{cd}	1	0.2	67 \pm 9.94 ^{abcd}	0 ^a
1	0.5	100 \pm 00 ^a	8.55 \pm 1.68 ^{cde}	1	0.5	60 \pm 7.22 ^{abcde}	0 ^a
1	1	100 \pm 00 ^a	1.29 \pm 1.1 ^f	1	1	55 \pm 5.29 ^{bcde}	0 ^a
2	0.2	100 \pm 00 ^a	5.29 \pm 1.24 ^{ef}	2	0.2	69 \pm 3.77 ^{abc}	0 ^a
2	0.5	98 \pm 1.15 ^{ab}	6.12 \pm 0.85 ^{def}	2	0.5	73 \pm 8.11 ^a	0 ^a
2	1	100 \pm 00 ^a	0.91 \pm 1.58 ^f	2	1	54 \pm 5.20 ^{cde}	0 ^a

طبق مشاهدات ما که در جدول ۳ آمده است، بهترین تیمار برای باززایی ساقه از ریزنمونه ریشه زمانی بود که تیمار تیدیاورون 0.5mg/L = و نفتالین استیک اسید 2mg/L اعمال شد. ۲۵٪ ریزنمونه های ریشه تحت تیمار فوق توانستند سبب باززایی نوساقه ها گردند. ریزنمونه ریشه در برخی از ژنوتیپ های گلرنگ به خوبی توانسته است سبب باززایی نوساقه گردد (Radhika et al. 2006). در ریزنمونه ریشه نیز علی رغم اینکه درصد کالوس زایی در هر دو سری تیماری تیدیاورون/نفتالین استیک اسید و Zeatin/نفتالین استیک اسید بالا بود اما نتایج بسیار متفاوتی بدست آمد به طوری که تنها در یک تیمار Zeatin/نفتالین استیک اسید باززایی مشاهده شد حال آنکه در تیمارهای تیدیاورون/نفتالین استیک اسید در چهارده تیمار از پانزده تیمار باززایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که غلظت مناسب هورمون در تنها تیمار باززا شده Zeatin/نفتالین استیک اسید و بهترین تیمار تیدیاورون/نفتالین استیک اسید مشابه بوده و در نسبت سیتوکین/اکسین ۴/۱ بیشترین حالت باززایی را داشت.

جدول ۳: تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر درصد کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه ریشه گلرنگ (میانگین \pm انحراف معیار)

NAA	TDZ	درصد کالوس‌زایی	باززایی	NAA	ZEA	کالوس‌زایی	باززایی
0	0.2	100 \pm 00 ^a	0.62 \pm 1.08 ^f	0	0.2	68 \pm 3.58 ^a	0 ^a
0	0.5	100 \pm 00 ^a	9.63 \pm 2.36 ^d	0	0.5	71 \pm 3.09 ^a	0 ^a
0	1	100 \pm 00 ^a	11.56 \pm 2.07 ^{cd}	0	1	64 \pm 8.40 ^{abc}	0 ^a
0.2	0.2	100 \pm 00 ^a	2.28 \pm 0.73 ^f	0.2	0.2	52 \pm 10.01 ^{bc}	0 ^a
0.2	0.5	100 \pm 00 ^a	14.09 \pm 2.67 ^c	0.2	0.5	59 \pm 5.41 ^{abc}	0 ^a
0.2	1	100 \pm 00 ^a	11.1 \pm 1.77 ^{cd}	0.2	1	62 \pm 10.55 ^{ab}	0 ^a
0.5	0.2	100 \pm 00 ^a	2.03 \pm 0.12 ^f	0.5	0.2	54 \pm 4.92 ^{bc}	0 ^a
0.5	0.5	100 \pm 00 ^a	8.59 \pm 1.82 ^d	0.5	0.5	51 \pm 6.98 ^c	0 ^a
0.5	1	87.66 \pm 3.65 ^c	1.25 \pm 1.17 ^f	0.5	1	66 \pm 11.91 ^c	0 ^a
1	0.2	100 \pm 00 ^a	2.4 \pm 0.91 ^f	1	0.2	48 \pm 8.64 ^c	0 ^a
1	0.5	93.61 \pm 10.27 ^b	18.7 \pm 2.23 ^b	1	0.5	49 \pm 7.02 ^c	0 ^a
1	1	100 \pm 00 ^a	11.64 \pm 3.25 ^{cd}	1	1	53 \pm 6.83 ^{bc}	0 ^a
2	0.2	100 \pm 00 ^a	0 ^f	2	0.2	70 \pm 5.47 ^a	0 ^a
2	0.5	100 \pm 00 ^a	25.15 \pm 1.67 ^a	2	0.5	61 \pm 4.88 ^{abc}	3.3 \pm 1.1 ^a
2	1	100 \pm 00 ^a	5.45 \pm 0.71 ^e	2	1	57 \pm 9.11 ^{abc}	0 ^a

اعمال تیمار تیدیا زورون 0.5mg/L= و نفتالین استیک اسید 2mg/L= باعث کسب بیشترین فراوانی باززایی در ریزنمونه لپه گردید (جدول ۴). تیمار با Zeatin/نفتالین استیک اسید در این ریزنمونه نیز مشابه ریشه و محور زیر لپه نتوانست سبب باززایی بالایی در ریزنمونه‌ها شود اما به هر حال در ریزنمونه لپه بیشترین تیمار پاسخ دهنده به باززایی (چهار تیمار هورمونی از پانزده تیمار هورمونی (Zeatin/نفتالین استیک اسید) مشاهده گردید. در ریزنمونه لپه نیز مشابه ریشه و محور زیر لپه درصد بالایی از ریزنمونه‌ها کالوس دادند اما ارتباط واضحی بین درصد کالوس‌زایی و باززایی مشاهده نشد.

به طور کلی در تمامی تیمارهای تیدیا زورون/نفتالین استیک اسید باززایی هر چند با مقادیر اندک انجام شد اما در مورد تیمارهای Zeatin/نفتالین استیک اسید در اکثر تیمارها هیچ گونه باززایی رخ نداد و در بهترین تیمار نفتالین استیک اسید 0.2= و Zeatin=0.2 در ریزنمونه محور زیر لپه تنها ۷ درصد باززایی مشاهده شد. زآتین همچنین در باززایی سه رقم Th-10 black, NP-9 black, Partialhull black نیز ناموفق بود (George and Rao 1982). احتمالاً هورمون رشد زآتین نمی‌تواند به عنوان یک سیتوکینین مناسب برای باززایی گلرنگ مورد استفاده قرار گیرد. فراوانی جنین‌زایی به علاوه‌ی تعداد جنین‌های سوماتیکی بسته به نوع اکسین و غلظت آن در گلرنگ متفاوت بوده است. اما در اکثر آن‌ها نسبت اکسین به سیتوکینین بیشتر از یک، نرخ رشد کالوس را افزایش داده است. در برخی ریزنمونه‌ها اکسین IBA (Kumar et al. 2008b) و در برخی دیگر نفتالین استیک اسید (Mandal et al. 2003) به تنهایی توانست باعث باززایی نوساقه‌ها گردد ولی در اکثر تحقیقات انجام شده اکسین نفتالین استیک اسید در ترکیب با BA (Ghasempour et al. 2014; Huang et al. 2015; Patial et al. 2016) یا تیدیا زورون (Basalma et al. 2008; Nikhil et al. 2014) توانسته است که به خوبی سبب القای باززایی ساقه شود.

جدول ۴: تاثیر تنظیم کننده های رشدی بر درصد کالوس زایی و باززایی ریزنمونه لپه گلرنگ (میانگین \pm انحراف معیار)

NAA	TDZ	کالوس زایی	درصد باززایی	NAA	ZEA	کالوس زایی	باززایی
0	0.2	85.49 \pm 7.93 ^e	0 ^f	0	0.2	53 \pm 7.01 ^{cd}	0 ^a
0	0.5	95.72 \pm 2.18 ^{bcd}	9.07 \pm 1.73 ^b	0	0.5	59.33 \pm 8.34 ^{abcd}	0 ^a
0	1	87.15 \pm 6.76 ^e	7.74 \pm 2.9 ^{bc}	0	1	69 \pm 6.58 ^{ab}	2.04 \pm 0.1 ^a
0.2	0.2	98.35 \pm 0.96 ^{ab}	4.25 \pm 0.86 ^{de}	0.2	0.2	63 \pm 7.05 ^{abcd}	0 ^a
0.2	0.5	88.40 \pm 6.19 ^e	0.66 \pm 1.15 ^f	0.2	0.5	71 \pm 4.98 ^a	0 ^a
0.2	1	100 \pm 00 ^a	0.7 \pm 1.25 ^f	0.2	1	57 \pm 9.11 ^{abcd}	0 ^a
0.5	0.2	100 \pm 00 ^a	0.33 \pm 0.57 ^f	0.5	0.2	53 \pm 8.18 ^{cd}	0 ^a
0.5	0.5	97.85 \pm 1.25 ^{ab}	3.73 \pm 0.72 ^{de}	0.5	0.5	58 \pm 5.71 ^{abcd}	0.66 \pm 0.11 ^a
0.5	1	96.84 \pm 1.86 ^{abc}	6.26 \pm 0.39 ^{cd}	0.5	1	61 \pm 10.04 ^{abcd}	0 ^a
1	0.2	92.61 \pm 3.87 ^d	2.04 \pm 0.56 ^{ef}	1	0.2	50 \pm 3.74 ^d	0 ^a
1	0.5	100 \pm 00 ^a	9.9 \pm 3.52 ^b	1	0.5	55 \pm 4.13 ^{bcd}	4.54 \pm 0.8 ^a
1	1	96.84 \pm 1.86 ^{abc}	4.78 \pm 1.66 ^d	1	1	60 \pm 9.29 ^{abcd}	0 ^a
2	0.2	94.25 \pm 2.94 ^{cd}	0.37 \pm 0.64 ^f	2	0.2	61 \pm 9.38 ^{abcd}	0 ^a
2	0.5	100 \pm 00 ^a	24.53 \pm 0.87 ^a	2	0.5	56 \pm 7.52 ^{bcd}	0 ^a
2	1	87.77 \pm 6.60 ^e	0 ^f	2	1	65 \pm 5.37 ^{abc}	1.33 \pm 0.57 ^a

همچنین نتایج بدست آمده در سه جدول ۲ و ۳ و ۴ نشان می دهد که در هر سه ریزنمونه پرتوانی^۱ بالایی برای تبدیل ریزنمونه های گیاهچه های ۸-۹ روزه به سمت کالوس دهی وجود دارد. به همین دلیل می توان ادعا کرد که احتمالاً تفاوت فراوانی باززایی ریزنمونه های مختلف رقم گلمهر گلرنگ متأثر از تفاوت در میزان هورمون های درون زاد باشد تا اثر پرتوانی بافت های مختلف. این در حالی است که Patial و همکاران (۲۰۱۶) اعتقاد دارند که تفاوت فراوانی باززایی در ریزنمونه های مختلف یک ژنوتیپ گلرنگ احتمالاً بدلیل تفاوت در پرتوانی بافت های مختلف آن است.

به منظور القای ساقه زایی کالوس ها و با توجه به اینکه درصد زیادی از ریزنمونه ها کالوس داده بوند، تیمار +BA (1mg/L) نفتالین استیک اسید (1mg/L) در کنار واكشت متوالی کالوس ها بر روی محیط کشت اولیه حاوی تیدیاورون/نفتالین استیک اسید و Zeatin/نفتالین استیک اسید اعمال شد. گزارش های قبلی نشان دادند که تیمار +BA (1mg/L) نفتالین استیک اسید (1mg/L) معمولاً در ارقام مختلف سبب القای ساقه زایی می شود (Radhika et al. 2006). به همین دلیل در این تحقیق نیز پاسخ ساقه زائی کالوس های بدست آمده از رقم گلمهر با استفاده از این تیمار هورمونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که از بین ۷۳۶ کالوس کشت شده در ترکیب هورمونی فوق تنها ۱۶ نوساقه تشکیل شد. این در حالی بود که در واكشت متوالی کالوس ها بر روی محیط کشت کالوس زایی (به عنوان شاهد) تعداد ۱۳ نوساقه از مجموع ۷۸۰ کالوس بدست آمد.

تقریباً در تمامی تیمارهای زآتین، کالوس هایی که باززا نشده بودند به سمت ریشه زایی رفتند. به همین منظور تیمار نفتالین استیک اسید (0.2mg/L) Zeatin + (2mg/L) که بیشترین ریشه زایی مستقیم از کالوس را داشت نیز به عنوان تیمار

¹ Totipotency

ریشه‌زایی نوساقه‌ها مورد استفاده قرار گرفت اما این تیمار منجر به هیچ‌گونه ریشه‌زایی نشد. از آنجایی که مقدار و نسبت هورمون‌های درون‌زا در بافت‌های گیاهی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر فرایند اندام‌زایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای دارند (Jimenez and Bangerth, 2001) بنابراین احتمال می‌رود هورمون‌های درون‌زای موجود در نوساقه‌های حاصل از تیمار فوق، تعادل هورمونی را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که فرایند ریشه‌زایی رخ ندهد.

در تیمارهای هورمونی نفتالین استیک اسید و IBA که به منظور القای ریشه‌زایی نوساقه‌ها استفاده گردید تنها ۳٪ ریشه‌زایی در تیمار نفتالین استیک اسید 1 mg/L = مشاهده شد. همین پاسخ اندک نوساقه‌های گلرنگ سبب شد محققان دنبال استفاده از روش‌های جایگزین مانند ریزپیوندی باشند (Belide et al. 2011; Huang et al. 2015). در این تحقیق برای اولین بار از قلمه‌زنی نوساقه‌های بازاشده برای ریشه‌دهی استفاده شد اما هیچ‌کدام از قلمه‌ها چه با تیمار IBA و چه بدون تیمار با IBA ریشه‌دار نشدند. به طور کلی فرایند ریشه‌زایی یکی از مراحل محدود کننده کشت بافت گلرنگ است (Nikhil et al. 2014). با توجه به میزان متفاوت ریشه‌زایی در ارقام مختلف گلرنگ، می‌توان نتیجه گرفت که ریشه‌زایی نوساقه‌ها در گلرنگ به مقدار زیادی تحت تاثیر ژنوتیپ است (Ligiao & Meili 2013).

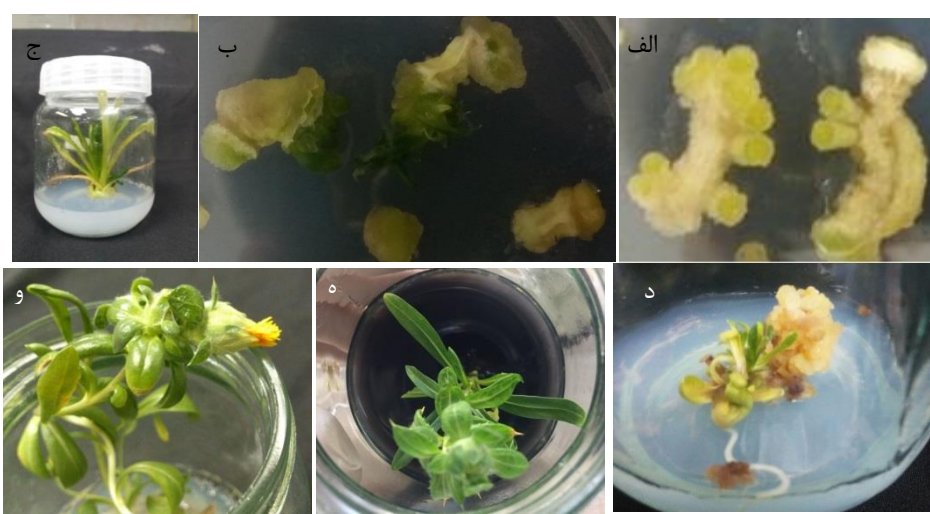
از ویژگی‌های کشت بافت گلرنگ، القای کاپیتولوم در شرایط درون شیشه است و تا کنون تلاش‌های متعددی به منظور القای جوانه‌های گل برای غلبه بر مشکل عدم همزمانی گلدهی در گلرنگ انجام شده است (Sujatha & Dineshkumar, 2007). در مطالعه حاضر نیز بدون اینکه ریشه‌زایی در برخی از نوساقه‌ها در شرایط درون شیشه القا شود، تشکیل پرموردیای گل در آن‌ها مشاهده شده و برخی از آن‌ها وارد مرحله گلدهی شدند (شکل ۱). گل‌هایی که در شرایط درون شیشه تشکیل شدند فاقد توانایی تشکیل بذر بوده و عقیم بودند.

ریشه‌زایی نوساقه‌ها یکی از مشکلات اساسی است که از اولین تلاش‌ها برای کشت بافت گلرنگ تا کنون وجود داشته است. نرخ ریشه‌زایی با استفاده از اکسین‌های مختلف در ارقام مختلف بسیار متفاوت بوده است به طوری که این نرخ از ۴٪ (Patial et al. 2016) تا ۷۰٪ (Shilpa et al. 2010) متغیر بوده است. در بیشتر تحقیقات بدلیل ریشه‌زایی بسیار پایین، نرخ ریشه‌زایی ذکر نشده است (Fan & Guo 2013; Fan and Guo 2014). در این تحقیق نیز نرخ ریشه‌زایی با اعمال تیمارهای هورمونی مختلف نتیجه بخش نبود و تنها کمتر از ۴٪ نوساقه‌ها ریشه‌دار شدند.

چندین تحقیق در مورد اثر محیط‌های پایه کشت مختلف از جمله MS, LS, N6, B5, Chaleff's انجام شده که در تمام تحقیقات مشاهده شد که محیط MS از سایر محیط‌ها برای ساقه‌زایی ارقام مختلف مناسب‌تر بوده است (Prasad et al. 1991; Nikam et al. 1999). به همین دلیل در این پژوهش از محیط کشت MS جهت اعمال تیمارهای هورمونی استفاده شد.

بطور کلی، فاکتورهایی مانند ژنوتیپ، سن گیاهچه، نوع ریزنمونه، اجزای محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشدی (سیتوکینین، اکسین، اتیلن و...)، منبع کربن و دیگر ترکیبات فعال بیشترین تاثیرات را بر روی کشت بافت گلرنگ و تعیین

موفقیت یا شکست در آزمایش‌های باززایی داشته‌اند. همچنین، pH محیط، پیش تیمار ریزنمونه (خراش، تیمار سرما یا گرما و...) و شرایط کشت (دما، رطوبت، روشنایی و...) نیز در کشت بافت گلرنگ مهم هستند. هنگامی که ریزنمونه از گیاهچه‌های ۵-۷ روزه گرفته می‌شوند، فراوانی باززایی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد این مسئله احتمالاً به دلیل این است که بافت‌های جوان فعالیت مریستمی بیشتری نسبت به بافت‌های بالغ‌تر دارند (Shilpa et al. 2013; Fan & Guo 2014). به طور کلی محیط کشت پایه‌ی MS (Prasad et al. 1991; Nikam et al. 1999) و منبع کربن ساکارز (Nikam et al. 1999) برای کشت بافت گلرنگ بهینه‌ترین شرایط است. pH محیط ۵/۸ و نگهداری کشت‌ها در دمای $25 \pm 30^\circ \text{C}$ و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت تابش $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{S}^{-1}$ (لامپ فلورسنت سفید سرد) نیز از شرایط مناسب برای کشت بافت این گیاه است (Fan & Guo 2014).



شکل ۱- مراحل مختلف باززایی مستقیم رقم گلمهر گلرنگ. الف) تشکیل کالوس‌های بازشونده از محل قطع شدگی ریشه-چه‌ها از ریشه‌ی اصلی ده روز پس از کشت ب) نوساقه‌های بازشده از ریزنمونه‌ی محور زیر لپه ج) محیط طویل سازی ریشه د) ریشه‌دهی نوساقه‌ی بازشده ه) شروع تشکیل پریموردیای گل در شرایط درون شیشه و) گلدهی در شرایط درون شیشه نتایج حاصل نشان داد که از بین ریزنمونه‌های مورد استفاده بیشترین باززایی مشاهده شده $28/8\%$ مربوط به محور زیر لپه و در ترکیب هورمونی (تیدیازورون 0.5 =نفتالین استیک اسید 0) است. لذا از این تیمار هورمونی می‌توان در مهندسی ژنتیک این گیاه بهره برد. بنابراین، براساس نتایج حاصل تیمار هورمونی فوق و استفاده از محور زیر لپه بیشترین میزان باززایی را داشته و می‌تواند برای اهداف مهندسی ژنتیک گیاه گلرنگ مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Basalma, D., Uranbey, S., Mirici, S., Kolsarici, O. (2008). TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African Journal of Biotechnology, 7 (8):960-966.
- Belide, S., Hac, L., Singh, SP., Green, AG., Wood, C. (2011). Agrobacterium-mediated transformation of safflower and the efficient recovery of transgenic plants via grafting. Plant Methods, 7:12.
- Fan, LJ., Guo, M. (2013). Progress of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) regeneration through tissue culture. Journal of Medical Colleges of PLA, 28 (5):289-301. Fan, LJ., Guo, M. (2014). Regeneration of *Carthamus tinctorius* from jimsar. Chinese Herbal Medicine, 6 (3):237-241.

- George, L., Rao, PS. (1982). In vitro multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through tissue culture. Proc Indian Natn Sci Acad, 48:791-794.
- Ghasempour, H., Soheilikhah, Z., Zebarjadi, AR., Ghasempour, S., Karimi, N. (2014). In vitro micro propagation, callus induction and shoot regeneration in safflower L. Cv. Leaf. Iranian Journal of Plant Physiology, 4 (2):999-1004.
- Huang, J., Yang, J., Guan, L., Yi, S., Du, L., Tian, H., Guo, Y., Zhai, F., Lu, Z., Li, H., Li, X., Jiang, C. (2015). Expression of bioactive recombinant human fibroblast growth factor 10 in *Carthamus tinctorius* L. Seeds. Protein Expression and purification, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.016>.
- Jimenez, VM., Bangerth, F. (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. Physiol. Plant, 111: 389-395.
- Kakaei, M., Mansouri, M., Abdollahi, MR., Moradi, F. (2013). Effect of NaCl induced osmotic stress on callus growth parameters of two safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. International Journal of Agriculture and crop sciences, 6 (3):127-132.
- Kumar, JV., Kumari, BR., Castano, E. (2008). Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. Biologia Plantarum, 52 (3):429-436.
- Kumar, S., Pandey, RK., Kumar, U. (2015). in-vitro callus induction from two different explants stem and leaf in *Carthamus tinctorius* Linn. European Journal of Experimental Biology, 5(2):1-4.
- Mandal, AKA., Gupta, SD. (2003). Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 72 (1):27-31.
- Motamedi, J., Zebarjadi, A., Kahrizi, D., Salmanian, AH. (2011). In vitro propagation and Agrobacterium-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using a bacterial mutated *aroA* gene. Australian Journal of Crop Science, 5 (4):479-486.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Nikam, TD., Shitole, MG. (1999). In vitro culture of safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55 (1):15-22.
- Nikhil, M., Dudhare, MS., Jadhav, PV., Moharil, MP., Deshmukh, AG. (2014). In vitro shoot regeneration plantlet development in safflower (*Carthamus tinctorius*). The bioscan, 9 (2):551-555.
- Patial, V., Krishna, R., Arya, G., Singh, VK., Agrawal, M., Goel, S., Jagannath, A., Kumar, A. (2016). Development of an efficient, genotype independent plant regeneration and transformation protocol using cotyledonary nodes in safflower (*Carthamus tinctorius*). Journal of Plant Biocemistry and Biotechnology, 25 (4):421-432.
- Prasad, BR., Khadeer, MA., Seeta, P., Anwar, SY. (1991). In vitro induction of androgenic haploids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Cell Report, 10 (1):48-51.
- Radhika, K., Sujatha, M., Rao, T N. (2006). Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum, 50 (2):174-179.
- Shilpa, KS., Kumar, VD., Sujatha, M. (2010). Agrobacterium mediated genetic transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103 (3):387-401.

Yang, J., Xiong, L., Li, T. (2009). The Effect of Phytohormones on safflower regeneration plant. *Journal of Traditional Chinese Medecine*, 32 (9):1335-1338.

Callusgenesis and direct regeneration optimization for root, cotyledon and hypocotyle explants of safflower

M. Afsharshandiz¹, H. Rahnama², H. Azarnivand^{3*}

Received:2017.01.17

Accepted:2019.03.04

Abstract

Safflower (*Carthamus tinctorius*) is one of the oil crops which well adapted to Iran's semi-hard land. High content of omega-6 fatty acids in safflower oils representing an advanced semi-long chain poly unsaturated fatty acid (SLC-PUFA) pathway in the plant, and make this plant as a suitable candidate for SLC-PUFA pathway engineering. Tissue culture optimization and plant regeneration is a prerequisite for any genetic engineering procedure. In this research, the optimisation of tissue culture of Golmehr cultivar was performed. For this, regeneration of three explants include root, hypocotyle and cotyledon on MS riched by different concentration of TDZ/NAA and Zeatin/NAA was investigated. Shoot propagation, shoot elongation and root induction studied in the present work. Shoot regenerations were obtained in TDZ=0.5mg/L with 28.8%, TDZ=0.5mg/L+NAA=2mg/L with 25.15% and TDZ=0.5mg/L+NAA=2mg/L with 24.53% was obtained in hypocotyle, root and cotyledon explant respectively. The highest propagation was observed in BA=0.5mg/L+Thiamin-HCl=4mg/L treatment for regenerated explants. However, BA=1mg/L+NAA=1mg/L treatment have no significant effects on the regeneration of callus inducing explants. In this research, we obtain less than 4% rooting in shoots by hormonal treatment.

Key words: Regeneration, Callusgenesis, Tissue culture, Safflower.

1-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2- Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

*(corresponding author: hos.sabouri@gmail.com)

جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از رسوبات آلوده به نفت پالایشگاه نفت آبادان

هدی سباتی^۱، حسین معتمدی^{۲*}

تاریخ ارسال: ۹۶/۶/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۵

چکیده

بیودمولسیفایرها به عنوان ترکیبات جایگزین دمولسیفایرهای شیمیایی و سازگار با محیط زیست مطرح هستند. هدف از تحقیق حاضر دستیابی به باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر است. برای این منظور، جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر با استفاده از محیط پایه نمکی حاوی پارافین مایع از رسوبات نفتی جداسازی و پس از غربالگری جدایه‌های برتر، شرایط رشد بهینه آن‌ها و اثر نوع منبع کربن بر تولید بیودمولسیفایر بررسی و تعیین هویت گردیدند. *Alcaligenes sp. strain HS20* با ۷۱/۴۳ درصد و *Alcaligenes sp. strain HS22* با ۸۵/۷۱ درصد شکست آمولسیون جدایه‌های برتر بودند. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS20 ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نیترات و برای جدایه HS22 ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نیترات بود. بیودمولسیفایر جدایه HS20 خارج سلولی و جدایه HS22 در دو موقعیت خارج سلول و متصل به سلول حضور دارد. بر اساس این نتایج ارزیابی عملکرد بیودمولسیفایرهای تولیدی در آمولسیون‌های نامطلوب آب در نفت خام در مقیاس صنعتی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آمولسیون آب در نفت، بیودمولسیفایر، جداسازی زیستی، شکست آمولسیون

مقدمه

بیودمولسیفایرها گروه متنوعی از ترکیبات فعال سطحی بوده که توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌ها تولید می‌شوند. این مولکول‌ها به علت دو قطبی بودن ترجیحاً تمایل دارند در سطح بین مایعات با درجه قطبیت و باندهای هیدروژنی مختلف مانند آب/نفت قرار بگیرند (Huang et al., 2013). یکی از ویژگی‌های مشخصه بیودمولسیفایرها عدم تعادل شاخصه چربی دوستی - آب دوستی در اجزا تشکیل دهنده آن است به طوری که وقتی خاصیت آب دوستی و چربی دوستی دارای توازن خوب باشد ماده به عنوان آمولسیون کننده اثرات کافی از خود نشان می‌دهد در حالی که اگر این توازن وجود نداشته باشد و هیچ کدام از بخش‌های آب دوست و آب گریز ماده در فاز میانی یک آمولسیون حاکم نباشند آن ماده به عنوان شکننده آمولسیون عمل می‌کند (Kronberg et al., 2014; Gadhav, 2014; Kontogeorgis & Kiil, 2016). این مولکول‌ها قادرند با قرار گرفتن در حد فاصل سیالات غیرامتزاج پذیر، موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حد فاصل و تسهیل شکست آمولسیون

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* (نویسنده مسئول: motamedih@scu.ac.ir, hhmotamedi@yahoo.com)

می‌شوند (e. Silva *et al.*, 2017). به طور معمول هیدروکربن‌های هیدروفوب به عنوان سوبسترا برای تولید بیودمولسیفایر توسط باکتری‌ها مصرف می‌شوند. بدیهی است که عملکرد بیولوژیکی ترکیبات فعال سطحی به ترکیبات هیدروکربنی وابسته است. کربوهیدرات‌ها کمتر به عنوان منبع کربن و انرژی برای تولید بیودمولسیفایر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Amirabadi, 2014; Hou *et al.*, 2014). مطالعات گذشته نیز نشان داده است که عمده باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از محیط‌هایی جدا شدند که به ترکیبات هیدروکربنی و نفتی آلوده هستند و به نظر می‌رسد که تولید این ترکیبات یکی از مکانیسم‌های بقای آن‌ها در این محیط‌ها است و به آن‌ها کمک می‌کند که بتوانند از ترکیبات هیدروفوب موجود در این محیط‌های آلوده استفاده کنند (Liu *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010). بیودمولسیفایرها بر اساس ساختار شیمیایی و منشأ میکروبی، به دو گروه اصلی شامل بیودمولسیفایرهای متصل به سطح سلول (عمدتاً از جنس اسیده‌های چرب) و بیودمولسیفایرهای خارج سلولی (عمدتاً از جنس استوئین، پلی‌ساکاریدها، گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها، گلیکوپروتئین‌ها و رامنولیپیدها) تقسیم می‌شوند. این ترکیبات با داشتن مزایایی چون امکان تولید از منابع تجدیدپذیر و ارزان قیمت، سازگاری بیشتر با محیط زیست، سمیت کمتر و قابلیت تجزیه زیستی بالاتر، نسبت به دمولسیفایرهای شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. بیودمولسیفایرها در صنایع مختلف نساجی، فلزی، غذایی، بهداشتی-آرایشی و به خصوص صنایع نفتی و حفاری به عنوان عوامل شکننده و حذف کننده امولسیون‌های نامطلوب به کار می‌روند (Li *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012). بزرگ‌ترین بخش بازار مصرف بیودمولسیفایرها به صنعت نفت اختصاص دارد. این ترکیبات برای استحصال نفتی با کمیت و کیفیت بیشتر، حذف لجن نفتی و بهبود تصفیه پساب‌های حاصله از استخراج نفت خام مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sad *et al.*, 2015, Atta *et al.*, 2014). هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از رسوبات نفتی پالایشگاه نفت است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

رسوبات نفتی مخازن ذخیره‌سازی و خطوط انتقال نفت پالایشگاه نفت آبادان (با مختصات جغرافیایی 30° شمالی و 48° شرقی) واقع در استان خوزستان از عمق ۲ سانتی‌متری با استفاده از تیغه‌ی استریل جمع‌آوری و درون شیشه‌هایی استریل ریخته شد و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. از ۴ نقطه متفاوت دو سری نمونه تهیه شد.

جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده بیودمولسیفایر

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر از محیط کشت پایه نمکی تعدیل یافته (MMSM: Modified Mineral Salt Medium) همراه چهار درصد پارافین مایع به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده شد. این محیط (pH 7.2) حاوی ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۴ گرم آمونیوم نیترات، ۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۶ گرم پتاسیم دی هیدروژن

فسفات، ۰/۲ گرم منیزیم سولفات هفت آبه و ۱ میلی لیتر محلول عناصر معدنی کم مقدار است. محلول عناصر معدنی کم مقدار (pH 7) حاوی ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۱ گرم کلسیم کلرید دو آبه، ۱ گرم سولفات آهن (II) هفت آبه و ۱/۴ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید است. میزان ۱ گرم از نمونه‌های رسوب درون این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و بر روی شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۵۰ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۷ روز، ۱ میلی لیتر از محیط برداشته شد و به محیط MMSM جدید انتقال یافت. این عمل تا ۲ پاساژ ادامه یافت تا اینکه کدورت به دست آمده ناشی از رشد باکتری‌ها باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ نهایی میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت MMSM آگار منتقل گردید. پس از رشد، باکتری‌ها به صورت تک کلنی جداسازی و به محیط MMSM آگار جدید انتقال یافتند. محیط MMSM آگار از افزودن ۲۰ گرم آگار بیولوژیک و یک درصد پارافین مایع به عنوان منبع انرژی و کربن به محیط مذکور فوق تهیه شد (Huang *et al.*, 2009).

تست‌های غربالگری

(۱) سنجش فعالیت همولایتیک:

برای انجام این سنجش باکتری‌های جدا شده در مراحل قبل در محیط کشت بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت داده شده و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. همولیز که به صورت هاله نمایان می‌شود، نشان‌دهنده مثبت بودن فعالیت همولیتیک است و باکتری که فعالیت همولیتیک مثبت دارد، می‌تواند مولد بیودمولسیفایر باشد (Thavasi *et al.*, 2011).

(۲) گسترش نفت خام:

بدین منظور ابتدا سویه‌ها درون محیط کشت مولر هینتون براث (بیولایف، ایتالیا) تلقیح شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رشد سویه‌ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته شد. ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پلیت (قطر ~۸۰ میلی‌متر) ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن افزوده گردید که به صورت یک لایه نازک یکپارچه بر روی سطح آب مقطر قرار گرفت. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت براث جدایه بر روی سطح نفت ریخته شد. تشکیل ناحیه شفاف در لایه نفتی نشان‌دهنده حضور بیودمولسیفایر در محیط است. در این تست آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. نتایج به صورت منفی (بدون هاله) و مثبت (ایجاد هاله) گزارش شد (Thavasi *et al.*, 2011).

(۳) انهدام قطره:

در این تست ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی رشد یافته در محیط کشت مولر هینتون براث (۲۴ ساعت، ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر روی یک قطره حاوی ۱۰ میکرولیتر نفت خام بر روی یک لام تمیز قرار داده شد. پس از گذشت یک

دقیقه قطر قطره ایجاد شده در سطح نفت خام بررسی گردید. در صورتی که قطر قطره ایجاد شده حداقل یک میلی‌متر از قطر قطره آب مقطر استریل (کنترل منفی) بیشتر بود تولید بیودمولسیفایر توسط میکروارگانیسم به صورت مثبت گزارش می‌شود در غیر این صورت نتیجه منفی خواهد بود (Thavasi *et al.*, 2011).

سنجش هیدروفوبیسیتیه سلولی

ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در بافر نمکی فسفات که واجد ترکیبات: (گرم بر لیتر) ۸ گرم نمک طعام، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۶۱ گرم فسفات دی سدیک، ۰/۱۹ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات است تهیه شد. سپس به مدت ۳ دقیقه همزنی شدید انجام گرفت و میزان جذب اولیه توسط دستگاه خوانش الیزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. سپس ۲ میلی‌لیتر نفت سفید به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. پس از گذشت زمان انکوباسیون، مخلوط بعد از ۲ دقیقه همزنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. نتایج به صورت اختلاف درصد جذب فاز آبی پس از تیمار و جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر سنجیده شد (Huang *et al.*, 2009).

آزمون شکست امولسیون

دو میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هینتون براث به درون لوله آزمایش مدرج ۱۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵ میلی‌لیتر امولسیون بود اضافه شد و به منظور اختلاط کامل این لوله به صورت دستی هم زده شد. سپس این لوله به صورت ساکن در حمام آبی با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تغییرات حجم فاز نفتی (در بالای لوله)، فاز آبی (در عمق لوله) و فاز امولسیون (میان این دو) بعد از ۴۸ ساعت از کارگذاری لوله در حمام آب ثبت گردید. در تمامی تست‌های دمولسیفیکاسیون لوله کنترل که حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت بدون تلقیح و ۵ میلی‌لیتر امولسیون است در کنار سایر لوله‌ها استفاده شد. با جای‌گذاری نتایج بدست آمده در معادله (۱) درصد شکست امولسیون توسط باکتری محاسبه گردید. امولسیون مورد بررسی در این سنجش از اختلاط آب مقطر استریل و نفت به نسبت ۱:۱ (حجمی/حجمی) و با افزودن ۱/۶۷ درصد (حجمی/حجمی) سورفاکتانت غیر یونی اسپان ۸۰ آماده شد و نوع آن توسط تست حلالیت رنگ مورد تایید قرار گرفت (Huang *et al.*, 2010). امولسیون حاصله میزان تفکیک کمتر از ۱۰ درصد را در طی ۲۴ ساعت نشان داد.

$$(1) \text{ معادله} \quad 100 \times \left(\frac{\text{حجم امولسیون باقی مانده}}{\text{حجم اولیه امولسیون} + \text{حجم محیط کشت افزوده}} \right) - 1 = \text{درصد شکست امولسیون (درصد دمولسیفیکاسیون)}$$

تعیین موقعیت بیودمولسیفایر

برای تعیین موقعیت بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌ها فعالیت شکست امولسیون سوسپانسیون سلولی و مایع رویی بدون سلول هر یک از جدایه‌ها در تست‌های شکست امولسیون مجزا در امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (Huang *et al.*, 2010).

شناسایی باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر

با استفاده از آزمون‌هایی مانند رنگ آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، آزمون KOH، آزمایش اکسیداز و کاتالاز و بررسی مورفولوژیک کلنی شناسایی اولیه باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر انجام گرفت. در ادامه شناسایی مولکولی باکتری‌ها با تکثیر قسمتی از ژن *16S rRNA* توسط پرایمرهای ذکر شده در جدول (۱) صورت گرفت (Weisburg *et al.*, 1991).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی باکتری‌ها

توالی	طول	نوع پرایمر
5´-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´	۳۷ باز	پرایمر رفت (fD1)
5´-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3´	۳۳ باز	پرایمر برگشت (rD1)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR: Polymerase Chain Reaction) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت نهایی ۰/۴ پیکومول، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (Mastermix 2X) (Amplicon، دانمارک) و ۹/۵ میکرولیتر آب میلی کیو (MiliQ water) استریل انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۲۵ چرخه شامل واسرشت شدن (۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه)، اتصال (۵۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه و گسترش (۷۲ درجه سانتی گراد، ۱۲۰ ثانیه) و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی ۳ میکرولیتر رنگ سایبرگرین الکتروفورز گردید. پس از تایید مشاهده باند ۱۵۰۰ جفت بازی، محصول PCR به منظور تعیین توالی ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در نرم افزار ویرایش زیستی (Bioedit) بررسی و همولوژی آن‌ها با سایر باکتری‌ها مقایسه گردید (Chen, 2002). برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA7 استفاده شد که این کار با روش Neighbor-joining انجام گرفت و رابطه فیلوژنی آن‌ها بررسی شد (Saitou & Nei, 1987; Felsenstein, 1985; Tamura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2016).

بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری

به منظور انتخاب دما، pH و منبع نیتروژن مناسب جهت رشد باکتری‌های منتخب، منحنی رشد این باکتری‌ها ابتدا در سه دمای 35°C ، 40°C و 45°C در محیط اختصاصی MMSM حاوی پارافین مایع ۴ درصد از طریق روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۵۵ نانومتر رسم شد و پس از انتخاب مناسب‌ترین دمای رشد، با ثابت نگه‌داشتن دما، pH مناسب رشد نیز تعیین شد. برای تعیین pH مناسب رشد، سه pH ۶، ۷ و ۸ انتخاب شد. انتخاب مقادیر دما و pH برای بهینه‌سازی براساس بازه دما و pH موجود در محل نمونه‌گیری صورت گرفت. پس از انتخاب مناسب‌ترین pH رشد، با ثابت نگه‌داشتن دما و pH در حالت بهینه برای هر جدایه، بهینه‌سازی منبع نیتروژنی صورت گرفت. به منظور بهینه‌سازی منبع نیتروژن جدایه‌های منتخب در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط MMSM دارای ۴ درصد پارافین مایع با هر کدام از منابع مختلف نیتروژن شامل ۴ گرم در لیتر آمونیوم نیترات، ۸/۸۴ گرم در لیتر سدیم نیترات یا ۳ گرم در لیتر اوره کشت داده شدند. مقادیر به کار برده شده از هر منبع نیتروژنی بر حسب اکی‌والان نیتروژن در آمونیوم نیترات (کنترل) محاسبه گردید. از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند به میزان ۱ درصد حجم محیط کشت به MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع تلقیح شد و در شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰ rpm به منظور هوادهی، گرماگذاری شد. بعد از آن هر ۲ ساعت میزان جذب باکتری در طول موج ۶۵۵ نانومتر خوانده شد و در طی ۲۴ ساعت منحنی رشد باکتری توسط برنامه اکسل رسم شد (Sabati & Motamedi, 2018).

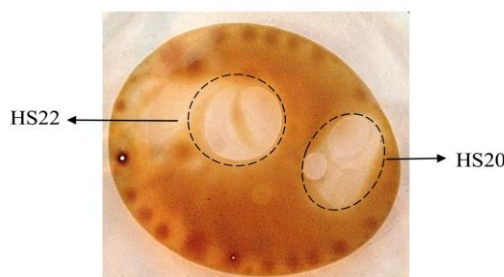
بررسی تأثیر نوع منبع کربنی بر رشد و شکست امولسیون

به منظور بررسی تأثیر منابع کربنی هیدروفیل و هیدروفوب بر رشد و عملکرد شکست امولسیون توسط سویه‌ها رشد و شکست امولسیون جدایه‌های منتخب در سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در حالت اول جدایه‌ها در محیط MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع (v/v) به عنوان منبع کربن هیدروفوب و ۰/۱۴ درصد نیترات آمونیوم (w/v) به عنوان منبع نیتروژن کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در حالت دوم جدایه‌ها در محیط مولر هینتون برات کشت داده شدند. محیط کشت مولر هینتون برات که حاوی مجموعه‌ای از منابع کربنی هیدروفیل است و به منظور بررسی تأثیر حضور مجموعه منابع کربنی هیدروفیل در رشد و عملکرد جدایه‌های شکننده امولسیون مورد استفاده قرار گرفت. در حالت سوم ابتدا جدایه‌ها در محیط MMSM حاوی ۴ درصد پارافین مایع و ۰/۱۴ درصد نیترات آمونیوم کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت جدایه‌های رشد کرده به محیط مولر هینتون برات منتقل شدند و مجدداً این جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در هر سه حالت رشد جدایه‌ها از طریق مقایسه کدورت محیط تلقیح یافته با شاهد بررسی گردید و عملکرد شکست امولسیون توسط

جدایه‌های رشد کرده به وسیله آزمون سنجش شکست امولسیون در امولسیون آب در نفت سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (Sabati & Motamedi, 2018).

نتایج و بحث

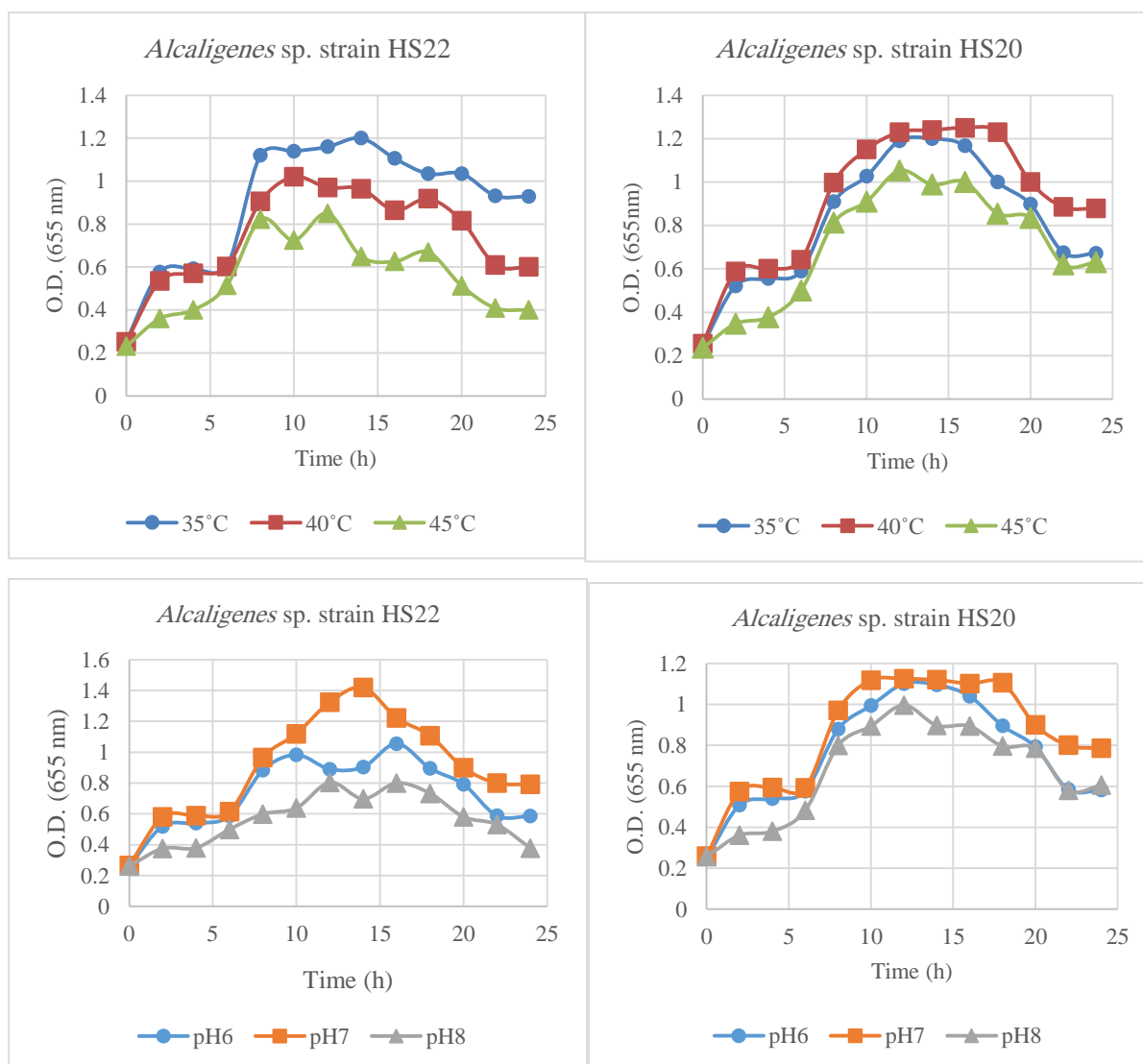
۶ جدایه باکتریایی تولید کننده بیودمولسیفایر از رسوبات نفتی مخازن ذخیره سازی نفت خام پالایشگاه جداسازی گردید. از مجموع جدایه‌ها، ۵ جدایه در تست همولیز فعالیت همولیتیکی را نشان دادند. در تست انهدام قطره جدایه HS22 بهترین شکل قطره را ایجاد کرد و در تست گسترش نفت دو جدایه HS20 و HS22 ناحیه شفاف را در سطح لایه نفت خام ایجاد کردند (شکل ۱). بر اساس این سه تست ۲ جدایه HS20 و HS22 به عنوان جدایه‌های مولد بیودمولسیفایر برای مراحل بعدی غربالگری انتخاب شدند.

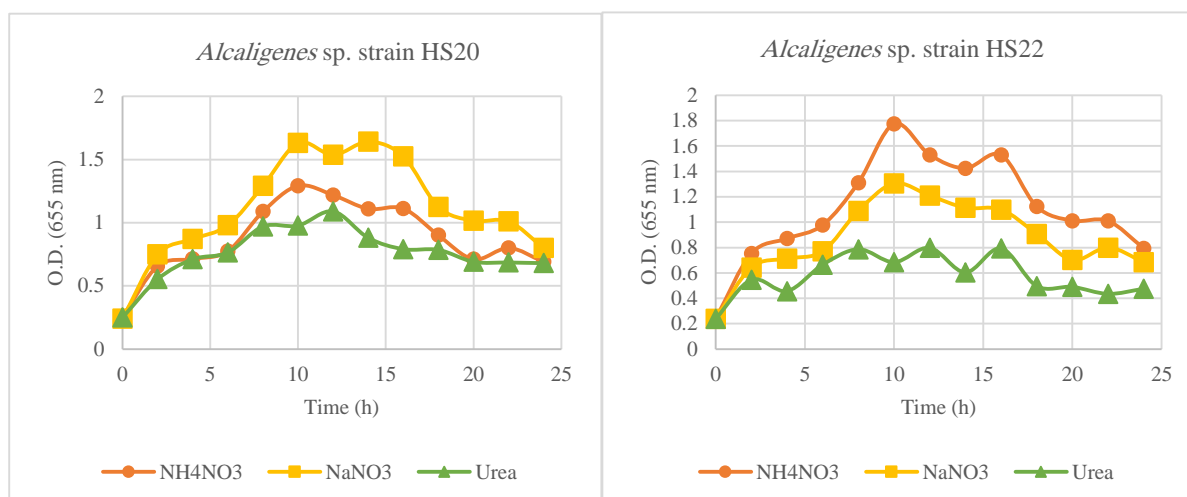


شکل ۱: ناحیه شفاف ایجاد شده در تست گسترش نفت توسط دو جدایه HS22 و HS20

جدایه HS20 که از نمونه رسوب مخازن ذخیره سازی نفت خام جداسازی شد، یک کوکوباسیل گرم منفی با تست اکسیداز، کاتالاز و اسنات مثبت است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد این جدایه به ترتیب ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نترات است (شکل ۲). حداکثر درصد شکست امولسیون این جدایه در امولسیون آب در نفت خام ۴۸ ساعت بعد از تلقیح جدایه به امولسیون ۴۸/۵۷ درصد گزارش شد. جدایه HS22 که نیز از نمونه رسوب مخازن ذخیره سازی نفت خام به دست آمد، یک باکتری باسیل گرم منفی با تست اکسیداز، کاتالاز و اسنات مثبت است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS22 به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نترات است (شکل ۲). حداکثر درصد شکست امولسیون توسط این جدایه در امولسیون آب در نفت خام ۴۸ ساعت بعد از تلقیح جدایه به امولسیون ۴۵/۷۱ درصد گزارش شد. میزان شکست صورت گرفته در امولسیون‌های آب در نفت سفید و آب در نفت خام توسط این دو جدایه در مقایسه با لوله شاهد در جدول (۲) و شکل (۳) نشان داده شده است. کلنی هر دو جدایه دایره‌ای، محدب، سفید بدون پیگمانت، نرم و با حاشیه‌ای صاف و کامل بود. پس از شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* مشخص گردید که هر دو جدایه به جنس *Alcaligenes* تعلق دارند. جدایه‌های یاد شد با عناوین *Alcaligenes* sp. strain HS22 و *Alcaligenes* sp. strain HS20 شناسایی شدند و سپس به ترتیب با شماره‌های دسترسی MF871631 و MF871632 در پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI: National Center for

Biotechnology Information) ثبت شدند. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با استفاده از پرایمرهای $rD1$ و $fD1$ در شکل (۴) نشان داده شده است. نتایج حاصل از بلاست نوکلئوتیدی دو سویه نشان داد که سویه HS20 با طول توالی ۱۳۳۱ جفت باز و سویه HS22 با طول توالی ۹۹۲ جفت باز به سویه‌های جنس *آلکالیژنر* ثبت شده در بانک ژن تشابه ۱۰۰ درصد دارند. بررسی ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های HS20 و HS22 با سویه‌های باکتریایی ثبت شده در پایگاه NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن‌ها نشان داد که سویه‌های مذکور از نظر تاکسونومی به عنوان سویه‌ای از *Alcaligenes* طبقه بندی می‌شوند (شکل ۵).

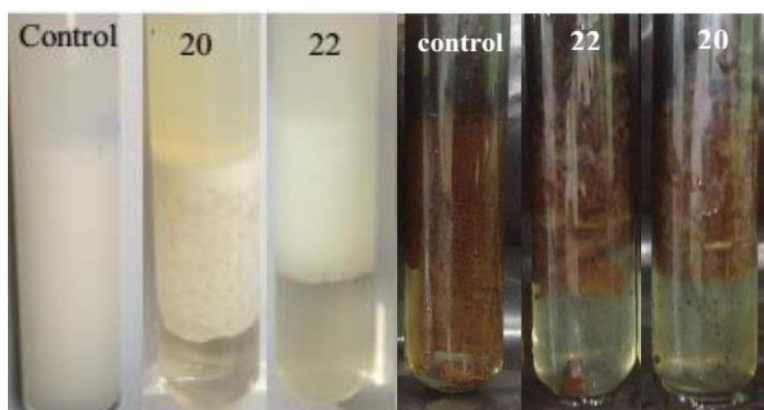




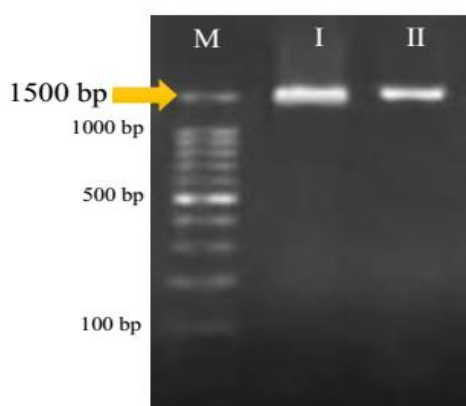
شکل ۲: منحنی رشد سویه‌های HS20 (سمت راست) و HS22 (سمت چپ) در الف) دماهای مختلف (35°C ، 40°C ، 45°C) - ب) شرایط pH متفاوت (۶، ۷، ۸) - ج) حضور منابع نیتروژن آمونیوم نیترات، سدیم نیترات و اوره. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد سویه HS20 به ترتیب ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۷ و سدیم نیترات است. دما، pH و منبع نیتروژن بهینه رشد جدایه HS22 به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ و آمونیوم نیترات است.

جدول ۲: میزان فعالیت شکست امولسیون و هیدروفوبیسیته سطح سلولی جدایه‌های منتخب

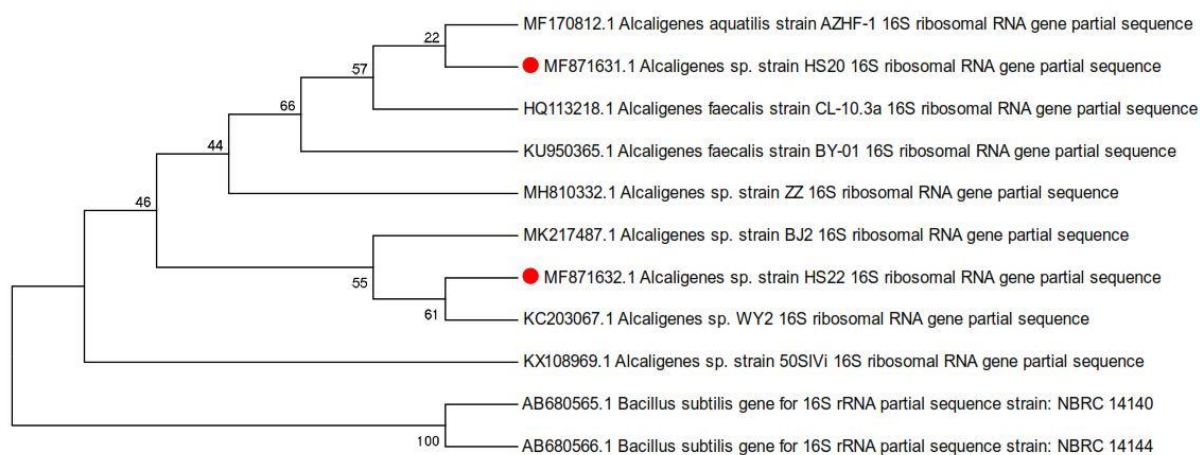
HS22	HS20	پارامتر اندازه‌گیری/سویه
۸۵/۷۱	۷۱/۴۳	حداکثر درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید
۵۰	۹۲/۸۶	درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید توسط مایع رویی
۵۰	۳۴/۲۸	درصد شکست امولسیون آب در نفت سفید توسط سوسپانسیون سلولی
۴۵/۷۱	۴۸/۵۷	درصد شکست امولسیون آب در نفت خام توسط محیط کشت تلقیح یافته
۷۲/۲۴	۷۲/۹۹	درصد هیدروفوبیسیته سلولی



شکل ۳: میزان شکست امولسیون آب در نفت سفید (سمت چپ تصویر) و آب در نفت خام (سمت راست تصویر) توسط دوسویه HS20 و HS22 در مقایسه با لوله شاهد در آزمون شکست امولسیون. حداکثر شکست امولسیون توسط دو سویه HS20 و HS22 به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۸۵/۷۱ درصد در امولسیون آب در نفت سفید، ۴۸/۵۷ و ۴۵/۷۱ درصد در امولسیون آب در نفت خام حاصل شد.

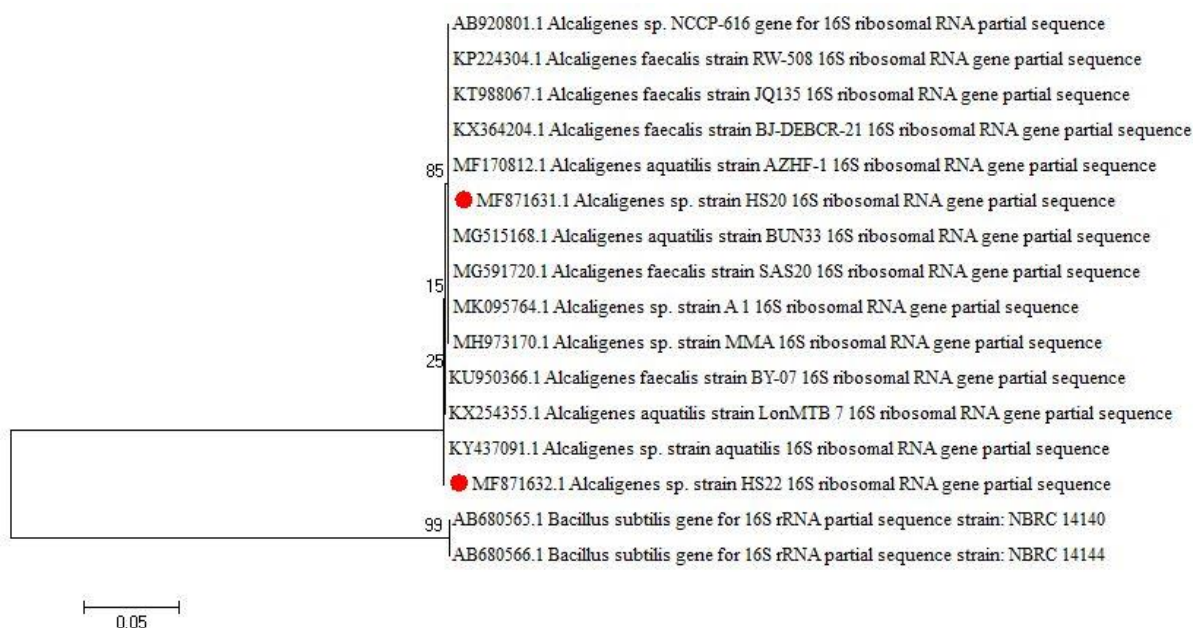


شکل ۴: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه‌های باکتریایی HS20 و HS22. (M) DNA نشانگر، (I) سویه HS20 و (II) سویه HS22



0.05

شکل ۵: درخت فیلوژنی، براساس آنالیز توالی ژن *16S rRNA* با استفاده از روش Neighbor-Joining بر طبق فواصل تکاملی ایزوله‌های مورد مطالعه (مشخص شده با دایره) و توالی‌های مرجع در GenBank رسم شد. اعداد نشان داده شده در کنار گره‌ها بیانگر شاخص اعتبارسنجی (Bootstrap) است. باکتری *Bacillus subtilis* (AB680566) به عنوان گروه بیرونی (Outgroup) استفاده شد. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۵۰۰ نوکلئوتید است.



ادامه شکل ۵: درخت فیلوژنی، براساس آنالیز توالی ژن *16S rRNA* با استفاده از روش Neighbor-Joining بر طبق فواصل تکاملی ایزوله‌های مورد مطالعه (مشخص شده با دایره) و توالی‌های مرجع در GenBank رسم شد. اعداد نشان داده شده در کنار گره‌ها بیانگر شاخص اعتبارسنجی (Bootstrap) است. باکتری (*Bacillus subtilis* (AB680565.1, AB680566)) به عنوان گروه بیرونی (Outgroup) استفاده شد. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۵۰۰ نوکلئوتید است.

به منظور بررسی تاثیر منابع کربنی بر رشد و عملکرد شکست امولسیون، رشد و شکست امولسیون جدایه‌های منتخب در سه حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی به ترتیب در جدول (۳) آمده است. در ارزیابی صورت گرفته مشخص گردید که سویه‌های منتخب شکننده امولسیون قادرند در حضور پارافین مایع (به عنوان منبع کربنی هیدروفوب) و در محیط مولر هینتون برات که حاوی مجموعه‌ای از منابع کربنی هیدروفیل است رشد کنند (شکل ۸).

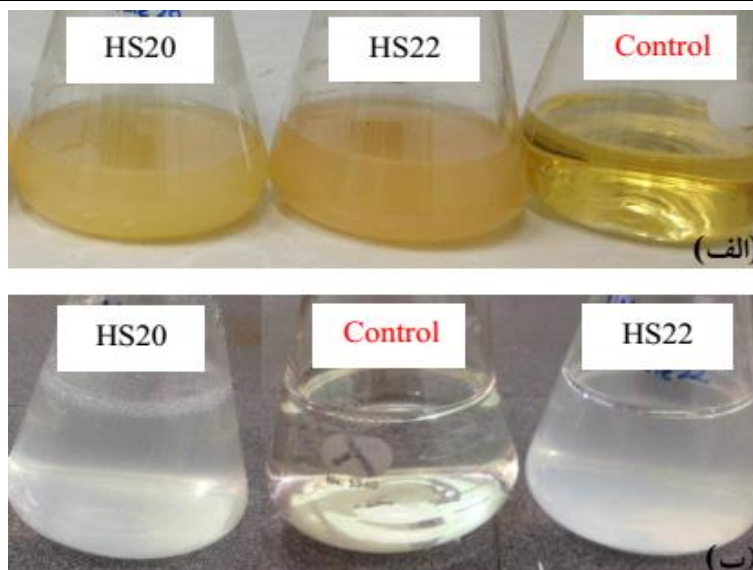
این سویه‌ها برخلاف فعالیت شکست امولسیون مناسبی که در حضور منابع کربنی هیدروفیل نشان دادند در حضور پارافین مایع به تنهایی فعالیت شکست امولسیون نشان ندادند. استفاده از هر دو نوع منبع کربنی برای سویه‌های HS20 و HS22 موجب بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط آن‌ها گردید و درصد شکست امولسیون آن‌ها را به میزان ۱۰ درصد افزایش داد.

جدول ۳: متوسط درصد دمولسیفیکاسیون جدایه‌های منتخب در حضور و عدم حضور منبع کربنی هیدروفوب پس از ۲۴

ساعت

حالت اول		حالت دوم		حالت سوم	
رشد	درصد شکست امولسیون*	رشد	درصد شکست امولسیون*	رشد	درصد شکست امولسیون*
+	-	+	۵۸/۲±۱۴	+	۶۰/۵±۸۵
+	-	+	۶۲/۲±۵۷	+	۷۰/۳±۱۴

* نتایج به صورت متوسط داده‌های حاصل در دو سری آزمون شکست امولسیون ± انحراف معیار گزارش شد.



شکل ۸: رشد سویه های HS20 و HS22 در (الف) محیط مولر هینتون براث و (ب) محیط نمکی حاوی پارافین مایع

بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش نشان داد که بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه HS20 ترکیبی خارج سلولی است چرا که میزان فعالیت شکست امولسیون در حالت کاربرد مایع رویی محیط تلقیح یافته باکتری بیش از حالات دیگر است در حالی که بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه HS22 بیودمولسیفایری است که در دو موقعیت خارج سلول و متصل به سلول حضور دارد.

اکثر باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر مورد بررسی در مطالعات گذشته از محیط‌هایی جداسازی شده‌اند که به منابع هیدروکربنی آلوده بودند چرا که این باکتری‌ها عمدتاً قادرند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند. به عنوان مثال سویه شکننده امولسیون *Alcaligenes sp. S-KJ-1* مورد بررسی در مطالعه هانگ و همکاران از طریق غربال‌گری خاک‌های آلوده به نفت جداسازی گشت (Huang *et al.*, 2009). سویه شکننده امولسیون *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1 مورد بررسی در مطالعه محبعلی و همکاران از طریق غربال‌گری نفت، پساب و خاک‌های آلوده به نفت و روغن صنایع غذایی حاصل شد (Mohebbali *et al.*, 2012). در این پژوهش نیز به منظور به دست آوردن سویه‌هایی که توانایی شکست امولسیون را داشته باشند از رسوبات آلوده به نفت مخازن ذخیره سازی نفت خام پالایشگاه نفت نمونه‌گیری انجام شد. انتخاب این نقطه جهت نمونه‌گیری به دلیل وجود محرک محیطی مناسب (آلودگی بستر نمونه‌گیری به نفت خام) بود. عملکرد شکست امولسیون سویه‌های باکتریایی بدست آمده از طریق آزمون شکست امولسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون شکست امولسیون صورت گرفته در مراحل ابتدایی، بر روی امولسیون آب در نفت سفید و در مراحل نهایی به منظور کاربرد صنعتی سویه‌ها بر روی امولسیون آب در نفت خام انجام شد. نتایج آزمون شکست امولسیون همان‌طور که در جدول (۲) بیان شده است از قابلیت خوب این سویه‌ها در شکست امولسیون آب در نفت سفید حکایت می‌کند به گونه‌ای که حداکثر درصد شکست امولسیون سویه‌های HS20 و HS22 به ترتیب ۷۱/۴۳ و ۸۵/۷۱ درصد گزارش شد. بر این اساس سویه‌های منتخب فعالیت شکست امولسیون قابل

قبولی را در مقایسه با سویه‌های باکتریایی شکننده امولسیون مورد بررسی در مطالعات پیشین دارند. به عنوان مثال در مطالعه هانگ و همکاران (۲۰۰۹) درصد شکست امولسیون تقریباً ۸۵ درصدی را برای شکست امولسیون آب در نفت توسط جدایی *Alcaligenes sp. S-KJ-1* گزارش شد (Huang *et al.*, 2009). لین و همکاران درصد شکست امولسیون جدایی *Deitzia sp. S-1* برای امولسیون آب در نفت را ۸۸/۳ درصد گزارش دادند (Liu *et al.*, 2009). بر خلاف عملکرد خوب سویه‌های منتخب در شکست امولسیون آب در نفت سفید این سویه‌ها عملکرد شکست امولسیون متوسطی را در شکست امولسیون آب در نفت خام نشان دادند (جدول ۲). عملکرد متوسط آن‌ها در شکست امولسیون آب در نفت خام به صورت ذیل قابل تفسیر است: در این پژوهش امولسیون آب در نفت خام از نفت خامی تهیه شد که از چاه نفتی استخراج شده و هنوز وارد عملیات پالایش نشده است ولی آب‌گیری آن در عملیات بالادستی انجام شده است. بدیهی است که این نفت خام پالایش شده حاوی ترکیبات امولسیون‌کننده طبیعی همچون رزین و آسفالتن است که موجب پایداری بیشتر امولسیون تهیه شده می‌شوند. پیچیدگی ساختار نفت خام در مقایسه با نفت سفید یکی از دلایل عملکرد متوسط سویه‌های منتخب در امولسیون آب در نفت خام است. لذا در مطالعاتی که هدف جداسازی باکتری‌های شکننده امولسیون باشد به منظور جلوگیری از حذف باکتری‌هایی که ممکن است دارای پتانسیل شکست امولسیون باشند، نخست بهتر است فعالیت شکست امولسیون آن‌ها در امولسیون‌هایی از آب-نفت سفید ارزیابی شود. نتایج پژوهش حاضر موید این مطلب است. در مطالعه لین و همکاران نتایج مشابهی با نتیجه پژوهش حاضر گزارش شده است (Liu *et al.*, 2011).

به لحاظ موقعیت، بیودمولسیفایرها به دو گروه خارج سلولی و متصل به سلول تقسیم می‌شوند (Huang *et al.*, 2012). موقعیت یک بیودمولسیفایر سختی استخراج و خالص کردن آن را تعیین می‌کند که به نوبه‌ی خود بر آنالیز بیشتر آن بیودمولسیفایر و هزینه تولید آن موثر است. براین اساس بیودمولسیفایرهایی که متصل به سلول هستند در مقایسه با بیودمولسیفایرهای خارج سلولی دارای استخراج و خالص‌سازی سخت‌تر و پرهزینه‌تری می‌باشند. هووانگ و همکاران گزارش دادند که بیودمولسیفایرهای کارآمد (با درصد دمولسیفیکاسیون بالای ۹۰ درصد) را می‌توان در هر دو موقعیت خارج سلولی و متصل به سلول یافت (Huang *et al.*, 2010). در بررسی موقعیت بیودمولسیفایرهای تولیدی توسط سویه‌های HS20 و HS22 مشخص شد که بیودمولسیفایر خارج سلولی سویه HS20 زمانی که به صورت تنها و جدا از سایر محتویات سلول به کار می‌رود عملکرد شکست امولسیون بسیار خوبی را نمایش می‌دهد و نتیجه شکست امولسیون مایع رویی این جداییه مؤید این مطلب است (جدول ۲). به نظر می‌رسد جدا کردن این بیودمولسیفایر از سایر عوامل سلولی موجب برداشتن اثر مهارتی عوامل سلولی و بهبود عملکرد آن می‌شود. لذا در صنعت و کاربرد عملی تزریق خالص این بیودمولسیفایر پیشنهاد می‌شود. بیودمولسیفایر سویه HS22 هم به صورت خارج سلولی و هم به صورت متصل به سلول است. بهترین عملکرد شکست امولسیون این سویه زمانی حاصل می‌شود که سلول‌های کامل به کار برده شود که این امر به همراه نتایج تست شکست امولسیون ذکر شده در جدول (۲) مؤید دو

موقعیتی بودن این بیودمولسیفایر است. لذا در کاربرد عملی تزریق سلول‌های کامل این جدایه به امولسیون پیشنهاد می‌شود. تاکنون تعداد کمی از بیودمولسیفایرهای خارج سلولی گزارش شده است و در بیشتر مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه مانند مطالعات هو و همکاران (Hou et al., 2014) و یان و همکاران (Yan et al., 2012) بر روی عوامل متصل به سلول کار کردند و در تعداد کمی از مطالعات مانند مطالعه لی و همکاران بر روی بیودمولسیفایرهای خارج سلولی کار کردند (Li et al., 2012).

بررسی‌ها نشان داده است که شرایط رشدی مانند دما و pH و شرایط تغذیه‌ای به ویژه نوع منبع کربنی بر رشد، عملکرد شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر و نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط آن‌ها موثر است که هر کدام به تفکیک مورد بررسی قرار می‌گیرد. مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که بیوسنتز ترکیبات بیودمولسیفایر در حضور منابع کربنی هیدروفوب در مقایسه با منابع کربنی هیدروفیل غالب‌تر است (Kiran et al., 2014) و عمده باکتری‌های شکننده امولسیون قادرند از منابع کربنی هیدروفوب مانند نفت خام، تترادکان، هگزادکان و نفت سفید به عنوان منبع کربن استفاده کنند (Liu et al., 2011). از طرفی نوع منبع کربنی بر فعالیت شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر نیز موثر است به گونه‌ای که در تولید ترکیبات بیودمولسیفایر هر دو نوع منبع کربنی هیدروفیل و هیدروفوب مشاهده می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر منابع کربنی بر رشد و عملکرد شکست امولسیون در این پژوهش با نتایج مطالعات پیشین در این زمینه مطابقت دارد. به عنوان مثال مطالعه لی و همکاران نشان داد که پارافین مایع موجود در محیط به عنوان منبع کربنی به صورت یک محرک در تولید بیودمولسیفایر عمل می‌کند و حضور آن برای تولید بیودمولسیفایر الزامی است (Li et al., 2012). مطالعه هو و همکاران نشان داد که جدایه باکتریایی *Bacillus cereus* LH-6 بهترین فعالیت شکست امولسیون خود را در حضور پارافین مایع نشان می‌دهد که این امر از سازش و مواجه طولانی مدت این باکتری با این منبع حکایت می‌کند. از طرفی پارافین مایع مجموعه‌ای از آلکان‌های کوتاه زنجیر بوده که برای این باکتری که قادر است نفت خام را مصرف کند یکی از منابع کربنی رایج قابل استفاده است. این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیبی از منابع کربنی و نیتروژنی به طرز قابل توجهی عملکرد شکست امولسیون را بهبود می‌بخشد (Hou et al., 2014). مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که نوع منبع کربنی علاوه بر تأثیر بر عملکرد شکست امولسیون باکتری‌های شکننده امولسیون بر نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط آنها نیز تاثیر می‌گذارد به گونه‌ای که بیودمولسیفایرهای متصل به سلول عمدتاً در حضور منابع کربنی هیدروفوب همچون نفت خام، روغن‌های سرخ کردنی، پارافین مایع و نفت سفید تولید می‌شوند که این امر نشان می‌دهد که منابع کربنی هیدروفوب می‌تواند به عنوان محرک برای تولید این ترکیبات باشد (Liu et al., 2011; Hou et al., 2014).

از آنجایی که بیودمولسیفایرها محصولاتی با ارزشی برای کاربردهای صنعتی به ویژه در صنعت نفت هستند تعیین شرایط بهینه برای عملکرد آنها و رشد باکتری‌های مولدشان به لحاظ اقتصادی اهمیت دارد (Luna et al., 2015). در مطالعات

لی و همکاران و لیو و همکاران گزارش شده است که تولید و نوع بیودمولسیفایر تولیدی توسط جدایه‌های باکتریایی به شرایط رشد باکتری بستگی دارد بنابراین بهینه سازی شرایط رشد و شرایط تغذیه ای باکتری‌های شکننده امولسیون یکی از فاکتورهای کلیدی در بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط آن‌هاست که باید مورد بررسی قرار گیرد (Li et al., 2000; Liu et al., 2010).

در این پژوهش به منظور بهبود فعالیت شکست امولسیون توسط سویه‌های HS20 و HS22 برای آن‌ها بهینه سازی دما، pH و منبع نیتروژنی صورت گرفت. نتایج بهینه‌سازی دما و pH برای آن‌ها نشان می‌دهد که هر دو سویه در دماهای تعیین شده برای بهینه‌سازی (یعنی دماهای ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و مقادیر pH تعیین شده برای بهینه‌سازی (یعنی مقادیر pH ۶، ۷ و ۸) قادر به رشد هستند اما براساس پیک منحنی‌های رسم شده دمای بهینه و pH بهینه سویه HS22 ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ و دما و pH بهینه‌ی سویه‌ی HS20 ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ تعیین گردید. انتخاب دماها و مقادیر pH بهینه‌سازی براساس میانگین دما و pH در محیط جداسازی انجام شد. نتایج بهینه‌سازی دما و pH در مطالعه حاضر در تطابق با بسیاری از مطالعات پیشین است. به عنوان مثال در مطالعه لیو و همکاران دمای بهینه برای رشد و عملکرد شکننده امولسیون سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Liu et al., 2010). در مطالعه امیرآبادی و همکاران دمای بهینه برای رشد و عملکرد سویه مولد بیودمولسیفایر *Paenibacillus alvei* ARN63 ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Amirabadi et al., 2013).

در زمینه بهینه‌سازی pH مطالعه لیو و همکاران نشان داد که pH بهینه سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 قلیایی و تقریباً ۹/۵ است (Liu et al., 2010) که با نتایج بهینه‌سازی pH در پژوهش حاضر در تضاد است. این سویه باکتریایی از خاک‌های آلوده به نفت و ترکیبات هیدروکربنی جداسازی شده است و ممکن است یکی از دلایل رشد و عملکرد بهتر آن در pH قلیایی، قلیایی بودن بستری است که باکتری از آن جداسازی شده است. این امر با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد چرا که میانگین دما و pH بستری که باکتری از آن جداسازی شده است به ترتیب ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ است. در مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد بیشتر سویه‌های باکتریایی از جمله *Paenibacillus alvei* ARN63 (Amirabadi et al., 2013)، *Microbacterium* sp. (Salehizadeh et al., 2013) و *Bacillus cereus* LH-6 (Hou et al., 2014) pH خنثی را برای رشد و فعالیت شکست امولسیون ترجیح می‌دهند. در زمینه بهینه‌سازی منبع نیتروژن برای رشد و شکست امولسیون باکتری‌های مولد بیودمولسیفایر مطالعات بسیاری صورت گرفته است. به عنوان مثال مطالعه لیو و همکاران نشان داد که منبع نیتروژن بهینه برای رشد و شکست امولسیون سویه *Alcaligenes* sp. S-KJ-1 را آمونیوم سترات گزارش داد. این مطالعه نشان داد که نیتروژن آمونیومی و نیتراتی هر دو اثری یکسان بر رشد و فعالیت تعلیق شکنی دارند و میان استفاده از هر یک از آنها جهت بهینه سازی تفاوت شاخصی وجود ندارد (Liu et al., 2010). براین اساس در پژوهش حاضر از آمونیوم نیترات به عنوان منبع نیتروژن کنترل استفاده شد و دو منبع نیتروژنی نیترات سدیم و اوره مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. انتخاب منابع نیتروژنی براساس منابع در دسترس موجود در آزمایشگاه صورت گرفت. انتخاب اوره به عنوان منبع نیتروژن با هدف امکان استفاده از اوره صنعتی در مرحله

کاربرد صنعتی جدایه‌های برتر صورت گرفت. در این پژوهش منبع نیتروژن بهینه رشد سایر سویه‌های منتخب به ترتیب برای سویه ی HS22 آمونیوم نیترات و برای سویه ی HS20 سدیم نیترات گزارش شد. در مطالعه هوو و همکاران نشان داده شده است که میان بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری به لحاظ دما، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن و فعالیت شکست امولسیون سویه *Bacillus cereus* LH-6 ارتباط مثبتی وجود دارد به گونه‌ای که بهینه‌سازی این شرایط موجب بهبود عملکرد شکست امولسیون توسط این سویه می‌شود. این مطالعه شرایط بهینه رشد و عملکرد این سویه را دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ و ترکیبی از منابع کربنی و نیتروژنی گزارش می‌دهد (Hou et al., 2014).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های جداسازی شده دارای قابلیت قابل توجهی در شکست امولسیون هستند و در نتیجه پتانسیل بالایی در تولید ترکیبات بیودمولسیفایر و حذف امولسیون های نامطلوب آب در نفت دارند. از طرفی این سویه ها می‌توانند به منظور پاکسازی آلودگی های محیطی ناشی از پساب‌هایی نفتی و نیز در صنایع دمولسیفایر سازی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین پژوهانه (شماره SCU.SB98.673) و پالایشگاه نفت آبادان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

منابع

- Amirabadi, S.Sh., Jahanmiri, A., Rahimpour, M.R., Nia, B.R., Darvishi, P. and Niazi, A. (2013). Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: medium optimization to break heavy crude oil emulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces* 109:244-252.
- Atta, A.M., Allohedan, H.A., El-Mahdy, G.A. (2014). Dewatering of petroleum crude oil emulsions using modified Schiff base polymeric surfactants. *J Pet Sci Eng* 122: 719-728.
- Chen, B.Y. PCR cloning protocols. 2nd edition. New York: Humana Press; 2002:196-235.
- E Silva, F. C. P. R., Roque, B. A. C., e Silva, N. M. P. R., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A. and Sarubbo, L. A. (2017). Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. *AMB Express* 7(1): 202.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gadhve, A. (2014). Determination of hydrophilic-lipophilic balance value. *IJSR* 3(4):573-75.

- Hou, N., Feng, F., Shi, Y., Cao, H., Li, Ch., Cao, Zh. and Cheng, Y. (2014). Characterization of the extracellular biodemulsifiers secreted by *Bacillus cereus* LH-6 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimizing the cultivation conditions. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(17): 10386-10398.
- Huang, X.F., Guan, W., Liu, J., Lu, L.J., Xu, J.C. and Zhou, Q. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. *Bioresour Technol* 101(1): 317-323.
- Huang, X.F., Li, M.X., Lu, L.J., Yang, S. and Liu, J. (2012). Relationship of cell-wall bound fatty acids and the demulsification efficiency of demulsifying bacteria *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 cultured with vegetable oils. *Bioresour Technol* 104:530-536.
- Huang, X.F., Liu, J., Lu, L.J., Wen, Y., Xu, J.C., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2009). Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresour Technol* 100(3):1358-1365.
- Huang, X.F., Peng, K., Feng, Y., Liu, J. and Lu, L. (2013). Separation and characterization of effective demulsifying substances from surface of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in water-in-kerosene emulsion. *Bioresour Technol* 139: 257-264.
- Kiran, G.S., Nishanth, L.A., Priyadarshini, S., Anitha, K. and Selvin, J. (2014). Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardioopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnol* 14(1):1-10.
- Kontogeorgis, G.M. and Kiil, S. (2016). Emulsions. Pp.269-282. In: Introduction to applied colloid and surface chemistry, 1st edition. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Kronberg, B, Holmberg, K. and Lindman, B. (2014). Emulsions and emulsifiers. Pp.431-445. In: Surface chemistry of surfactants and polymers. 1st edition. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874.
- Li, Gh. Zhang, X. and Huang, W. (2000). Characteristics of degrading microorganism distribution in polluted soil with petroleum hydrocarbons. *Huan Jing Ke Xue* 21(4): 61-64.
- Li, X., Li, A., Liu, Ch., Yang, J., Ma, F., Hou, N., Xu, Y. and Ren, N. (2012). Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. *Process Biochem* 47(4):626-634.
- Liu, J., Huang, X.F., Lu, L.J., Xu, J.C., Wen, Y., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2009). Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. *Bioresour Technol* 100(24):6481-6487.
- Liu, J., Huang, X.F., Lu, L.J., Xu, J.C., Wen, Y., Yang, D.H. and Zhou, Q. (2010). Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. *J Hazard Mater* 183(1-3):466-473.
- Liu, J., Peng, K., Huang, X., Lu, L., Cheng, H., Yang, D., Zhou, Q. and Deng, H. (2011). Application of waste frying oils in the biosynthesis of biodemulsifier by a demulsifying strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. *J Environ Sci* 3(6):1020-1026.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Jara, A.M.A.T, Brasileiro, P.P.F. and Sarubbo, L.A. (2015). Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 480: 413-418.

- Mohebbali, G., Kaytash, A. and Etemadi, N. (2012). Efficient breaking of water/oil emulsions by a newly isolated de-emulsifying bacterium, *Ochrobactrum anthropi* strain RIPI5-1. *Colloids Surf B Biointerfaces* 98:120-128.
- Sabati, H. and Motamedi, H. (2018). Ecofriendly demulsification of water in oil emulsions by an efficient biodemulsifier producing bacterium isolated from oil contaminated environment. *Biotechnol Lett* 40(7): 1037-1048.
- Sad, C.M.S., Santana, Í.L., Morigaki, M.K., Medeiros, E.F., Castro, E.V.R., Santos, M.F.P. and Filgueiras, P.R. (2015). New methodology for heavy oil desalination. *Fuel* 150: 705-710.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Salehizadeh, H., Ranjbar, A. and Kennedy, K. (2013). Demulsification capabilities of a *Microbacterium* species for breaking water in crude oil emulsions. *Afr J Biotechnol* 12(16):2019-2026.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11030-11035.
- Thavasi, R., Sharma, S. and Jayalakshmi, S. (2011). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J Pet Environ Biotechnol* 1:1-6.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2):697-703.
- Yan, P., Lu, M., Yan, Q., Zhang, H., Zhang, Z., Chen, R. (2012). Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresour Technol* 116:24-28.

Isolation of biodemulsifier producing bacteria from petroleum-contaminated deposits of Abadan Oil Refinery

H. Sabati¹, H. Motamedi^{1, 2*}

Received: 2017.9.22

Accepted: 2019.5. 26

Abstract

Biodemulsifiers as environmental friendly compounds are alternatives for chemical demulsifiers. The aim of this study was to achieve biodemulsifier producing bacteria. For this purpose, biodemulsifier producing bacteria were isolated from deposits in oil reservoirs in petroleum refinery through enrichment in saline-based enrichment medium with liquid paraffin and following screening and identifying of selected isolates, their optimum growth condition and the effect of carbon source on biodemulsifier production were assessed. As a result, HS20 and HS22 isolates with 71.43 and 85.71 percentage demulsification of water in kerosene were identified as *Alcaligenes* sp. strain HS20 and *Alcaligenes* sp. strain HS22, respectively. Optimum temperature, pH and nitrogen source for HS20 were as 40°C, 7 and NaNO₃ and for HS22 were 35°C, 7 and NH₄NO₃. The HS20 biodemulsifier was extracellular while in case of HS22 was in both extracellular and cell attached forms. The results of this study showed that these isolates have appropriate biodemulsifier production and emulsion breaking. Therefore, evaluation of their potential to improve the breakdown of undesirable water in crude oil emulsions at industrial scale is proposed.

Key words: Biodemulsifier, Biological separation, Water in oil emulsion, Emulsion breaking

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2-Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*(Corresponding author: motamedih@scu.ac.ir, hhmotamedi@yahoo.com)

بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های سویا تحت تنش کادمیوم

شهلا هاشمی^۱، فرشته محمد حسنی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱

تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۴

چکیده

در این پژوهش، اثرات تیمار کادمیوم (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) بر رشد ریشه و ساقه، محتوای مالون‌دی‌آلدئید، فنل کل، پراکسید هیدروژن، کلروفیل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در سه رقم سویا شامل تلار، کاسپین، DPX گزارش شد. نتایج نشان داد که تیمار کادمیوم باعث کاهش پارامترهای رشد ریشه و ساقه و همچنین محتوای کلروفیل در رقم‌های تلار، کاسپین، DPX شده است که این کاهش در رقم تلار چشم‌گیرتر بود. محتوای آنتوسیانین، فنل کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در تیمار گیاهان با کادمیوم در سه رقم سویا افزایش یافت. محتوای مالون‌دی‌آلدئید در هر سه رقم در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داده است. نتایج این تحقیق نشان داد که رقم تلار تحت تنش کادمیوم حساسیت بیشتری نسبت به رقم‌های کاسپین و DPX دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، سویا، فنل، کادمیوم

مقدمه

گیاه سویا یا لوبیای روغنی با نام علمی *Glycine max* L. از خانواده بقولات می‌باشد (Shafi et al., 2009). سویا بزرگ‌ترین منبع تأمین‌کننده پروتئین و روغن دنیاست و یکی از معدود گیاهان فراهم‌کننده پروتئین کامل برای سلامتی انسان است. همچنین سویا دارای خواص دارویی نظیر خواص ضدسرطانی، ضدمیگرنی، ضدعفونی‌کنندگی، پایین‌آوردندگی چربی خون و ضددیابتی (Abuajah et al., 2015) می‌باشد. بنابراین بدلیل خواص گوناگون سویا، کشت وسیعی از این گیاه صورت می‌گیرد. از سوی دیگر، آلودگی با فلزات سنگین از مهم‌ترین معضلات جهانی آلودگی خاک است که با فعالیت‌های انسانی از قبیل معدن-کاوی، صنایع فلزی و شیمیایی، وسایل نقلیه فرسوده و غیره در ارتباط است. بسیاری از عناصر سنگین حتی در غلظت‌های بسیار پایین نیز سمی به شمار می‌روند (Lee et al., 2003). کادمیوم به‌عنوان یک فلز بسیار سمی برای انسان و همه موجودات زنده شناخته شده است (Chen et al., 2007). موضوع ورود عناصر سنگین به خاک‌های کشاورزی، یکی از نگرانی‌های مهم زیست محیطی در دنیا می‌باشد (Shafi et al., 2009). کادمیوم اگر چه برای رشد گیاه ضروری نیست، اما این فلز براحتی از

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول: fereshtehmhasani@yahoo.com)

طریق پوست ریشه جذب می‌شود. ریشه گیاه اولین محل تماس با این یون است، بنابراین، غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه به عنوان سد بین سیتوپلاسم و محیط خاکی عمل می‌کند. شواهد زیادی پیشنهاد می‌کند که محتوای چربی و پروتئین غشاها ممکن است به وسیله این فلز آسیب ببینند (Schützendübel & Polle, 2002). تاکنون نشان داده شده است که کادمیوم موجب بسیاری از تغییراتی در گیاهان از جمله مهار جوانه‌زنی (Benavides *et al.*, 2005)، کاهش جذب عناصر معدنی (Siedlecka, 1995)، زرد شدن برگ و نکروزه شدن آن‌ها (Stroiński, 1999)، تغییر ساختار سلول بالاحص کلروپلاست‌ها و تسریع پیری (Benavides *et al.*, 2005) می‌شود. غلظت زیاد کادمیوم رشد گیاهان را مهار می‌کند (Schützendübel & Polle, 2002). پراکسیداسیون لیپید، یکی دیگر از اثرات سمیت کادمیوم می‌باشد (Vassilev *et al.*, 2002). در گیاه نخود و لوبیا، کادمیوم به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید شد، در صورتی که در ریشه‌های هویج پراکسیداسیون لیپید مشاهده نشد (Toppi & Gabrielli, 1999; Schützendübel & Polle, 2002). پاسخ‌های گوناگون به تنش کادمیوم، احتمالاً به سطح کادمیوم تیمار شده و به گونه گیاه بستگی دارد. رقم‌های مختلف یک گیاه نیز پاسخ‌های متفاوتی در برابر تنش فلزات سنگین نشان می‌دهند. برای مثال، ارقام مختلف گیاهی از لحاظ جذب و تجمع عناصر سنگین تفاوت دارند که این تفاوت‌ها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار می‌گیرد. گرگر و لوفستد گزارش کردند که رقم‌های مختلف گندم پاسخ‌های متفاوتی نسبت به یکدیگر در مواجهه با تنش کادمیوم نشان دادند. وجود تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و ارقام گیاهی از لحاظ تجمع کادمیم و پاسخ‌های مقاومتی، امکان استفاده از روش‌های اصلاحی جهت انتخاب ژنوتیپ‌هایی با میزان پایین تجمع کادمیم را میسر می‌سازد (Greger & Lofstedt, 2004). در این پژوهش به دلیل خواص خوراکی و دارویی این گیاه که در بالا ذکر شد و از سوی دیگر به دلیل اهمیت موضوع آلودگی خاک‌های کشاورزی در مناطق مجاور مناطق صنعتی، اثر کادمیوم بر واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های این گیاه از جمله رقم‌های تار، کاسپین، DPX که دارای تفاوت‌های ژنتیکی و پاسخ‌های مقاومتی متفاوتی هستند در شرایط تحت تنش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رقم‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ارقام تار، کاسپین و DPX گیاه سویا بود که بذره‌های مربوطه از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. برای بررسی اثر فلز کادمیوم بر واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام مختلف سویا آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با تعداد ۳ تیمار و ۳ تکرار در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. ابتدا بذره‌های ارقام مذکور با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۶ دقیقه ضدعفونی و سپس بخوبی با آب مقطر دو بار شستشو شدند. بذرها به گلدان‌های حاوی پرلیت با قطر دهانه ۱۹ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر انتقال داده شد. در هر گلدان

۳ بذر کشت داده شد. در طول هفته اول آبیاری با آب به صورت سه بار در هفته انجام شد. آبیاری در هفته دوم و سوم با محلول هوگلند (سه بار در هفته) با pH تقریبی ۶ توسط تنظیم pH محلول‌ها با استفاده از اسید کلریدریک و سود یک میلی‌مولار انجام گرفت. بعد از سپری شدن این زمان، آبیاری به مدت سه هفته توسط محلول‌های غذایی حاوی غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم انجام شد. سپس گیاهان جمع‌آوری و در ازت مایع فریز گردید و برای سنجش پارامترهای رشد، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سیلسیوس نگهداری شد.

اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه

طول ساقه و ریشه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهایی ساقه و طول ریشه از یقه تا انتهایی ریشه در نظر گرفته شد. برای هر گروه تیماری ۳ تکرار و مقادیر بر اساس سانتی‌متر گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید

مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش پراکسید هیدروژن با پتاسیم یدید (KI) با روش الکسیوا و همکاران انجام شد (Alexieva *et al.*, 2001). در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه در تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد روی یخ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در $12000 \times g$ در دمای ۴ درجه سیلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ mM (pH=7) و ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱M اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید. اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید به روش هیت و پکر انجام شد (Heath & Packer, 1968). طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت فریز شده برگ با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره ی حاصل با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. از فاز رویی برای سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید استفاده گردید.

سنجش محتوای آنتوسیانین

برای سنجش محتوای آنتوسیانین از روش واگنر استفاده شد (Wagner, 1979). برای سنجش محتوای آنتوسیانین، ۰/۱ گرم برگ گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سیلسیوس قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در $4000 \times g$ سانتریفیوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian اندازه‌گیری شد.

محتوای فنل کل

محتوای فنل کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Guo *et al.*, 2004). ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در $2000 \times g$ سانتریفیوژ شدند و از محلول رویی برای سنجش فنل کل استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر آب مخلوط گردید و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به مخلوط اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian خوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید

مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش لیچتن تالر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987). $0/2$ گرم از برگ های فریز شده گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفوتومتر در طول موج های $646/8$ ، $663/20$ و 470 نانومتر خوانده شد.

تعیین میزان یون کادمیوم در ریشه و برگ به روش جذب اتمی

اندازه‌گیری یون کادمیوم از روش جذب اتمی (Lozak *et al.*, 2002) توسط دستگاه جذب اتمی Absorption Atomic Spectrometer مدل Spectr AA220 ساخت آمریکا انجام گردید. اندازه‌گیری یون کادمیوم در بافت ریشه و برگ انجام شد. برای این منظور $0/5$ گرم از بافت گیاهی خشک در ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا نمونه گیاهی به خوبی در اسید هضم شود. بعد از این مدت محلول حاصل را گرم کرده تا بخارات اسیدی از محلول خارج شوند. سپس حجم محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از عبور از کاغذ صافی محلول بدست آمده برای اندازه‌گیری عنصر مورد نظر استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز (PAL)

جهت تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با $6/5$ میلی‌لیتر بافر تریس-HCL (50 میلی‌مولار) حاوی بتامرکاپتواتانول (15 میلی‌مولار) در هاون سرد سائیده شد. سپس عصاره بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با دور $5000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. در این روش از فنیل آلانین به‌عنوان سوبسترای آنزیمی استفاده شد و فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تشکیل سینامیک اسید تعیین گردید. در یک لوله

آزمایش ۱ میلی لیتر از بافر استخراج به همراه ۰/۵ میلی لیتر ال-فنیل آلانین (۱۰ میلی مولار)، ۰/۴ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (۱۰ درصد) پایان پذیرفت. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $9500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بدست آمد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه است (Hahldbrock & Rogg, 1975).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون دانکن صورت گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر طول ساقه و ریشه

با افزایش غلظت کادمیوم، طول ساقه و ریشه در هر سه رقم سویا نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. پایین‌ترین طول ساقه و ریشه در رقم تلار و در غلظت ۴۰۰ میکرومولار کادمیوم، مشاهده شد. طول ساقه رقم‌های تلار، کاسپین و DPX در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد، به ترتیب ۳۶، ۱۳ و ۷ درصد کاهش یافت و طول ساقه در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به تیمار ۲۰۰ میکرومولاری به ترتیب ۳۵، ۲۶، ۱۷ درصد کاهش یافت. (جدول ۱). تیمار کادمیوم طول ریشه را نیز در ارقام مورد بررسی سویا به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم‌های تلار، کاسپین و DPX به ترتیب منجر به کاهش ۳۲، ۱۱ و ۹ درصد طول ریشه نسبت به شاهد شد. همچنین در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم، طول ریشه نسبت به شاهد کاهش یافت که این کاهش در رقم تلار بیش از دو رقم مورد بررسی دیگر بود (جدول ۱).

نتایج اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید

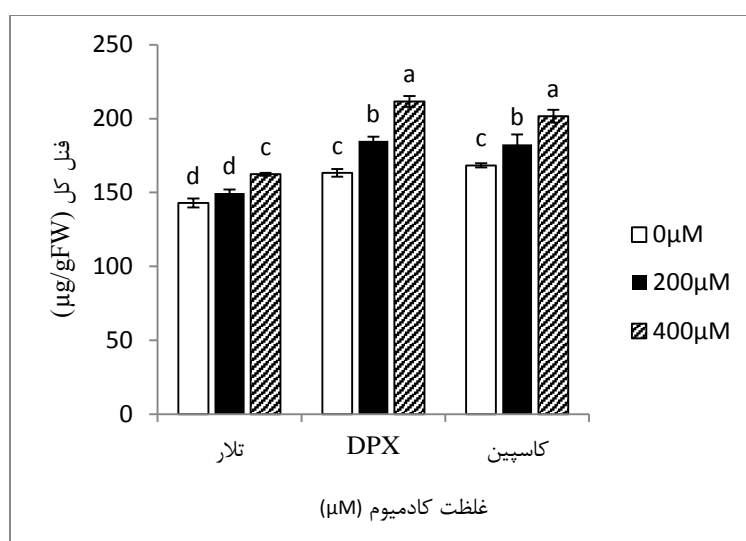
با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید در ارقام مورد مطالعه سویا نسبت به شاهد کاهش نشان داد و بیشترین کاهش مربوط به بالاترین غلظت یعنی غلظت ۴۰۰ میکرومولار بود (جدول ۲). نتایج همچنین نشان داد بیشترین کاهش محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید نسبت به نمونه‌های شاهد مربوط به رقم تلار بوده است و کمترین کاهش محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید در دورقم دیگری مشاهده گردید.

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن برگ

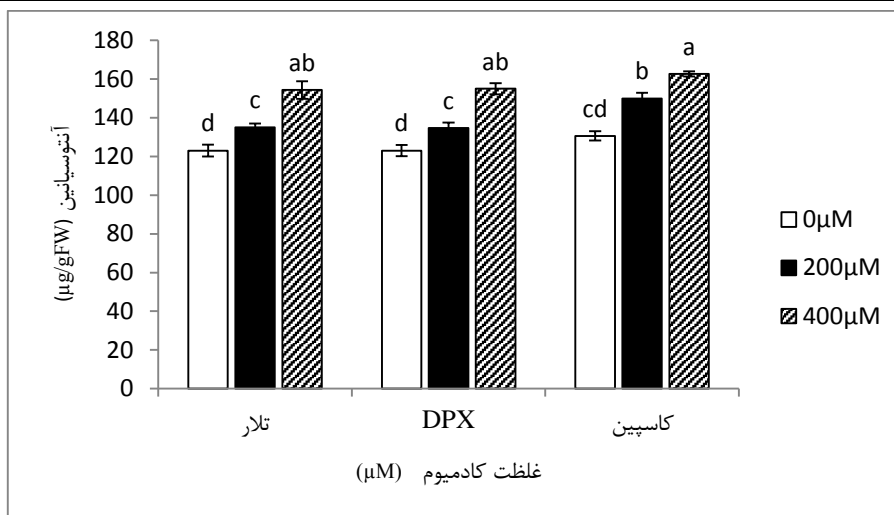
تیمار کادمیوم بر محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در هر سه رقم سویا افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. افزایش محتوای مالون دی آلدئید در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد در رقم های تلار، DPX و کاسپین به ترتیب ۱۵، ۸/۵ و ۷ درصد بود. همچنین افزایش محتوای پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد در رقم های تلار، DPX و کاسپین به ترتیب ۲۸، ۸ و ۳ درصد بود. بالاترین محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در رقم تلار، در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای فنل کل و آنتوسیانین برگ

تیمار کادمیوم بر محتوای فنل کل و آنتوسیانین در سه رقم مورد مطالعه سویا افزایش معنی داری را نسبت به شاهد نشان داد. بالاترین محتوای فنل کل و آنتوسیانین در رقم های کاسپین و DPX در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم مشاهده شد. محتوای فنل کل در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم تلار تغییر معنی داری را نسبت به نمونه شاهد نشان نداد (شکل ۱).



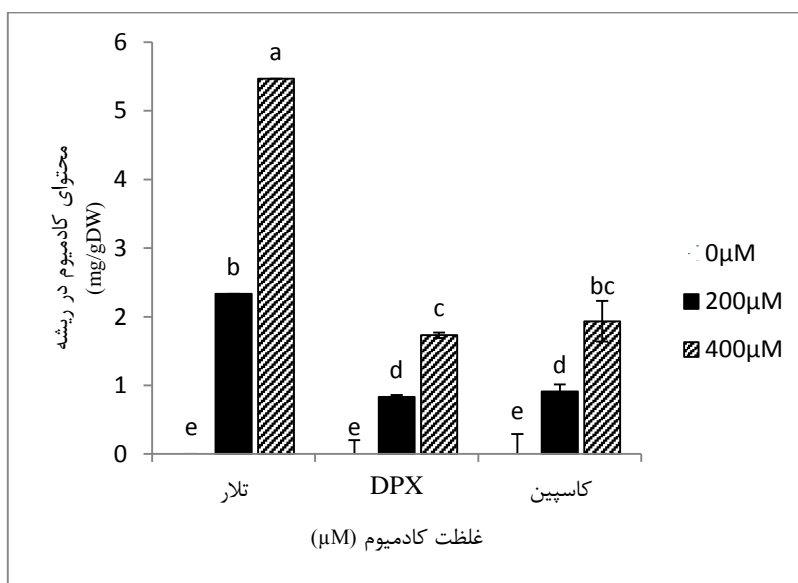
شکل ۱: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای فنل کل رقم های مختلف سویا. میانگین های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).



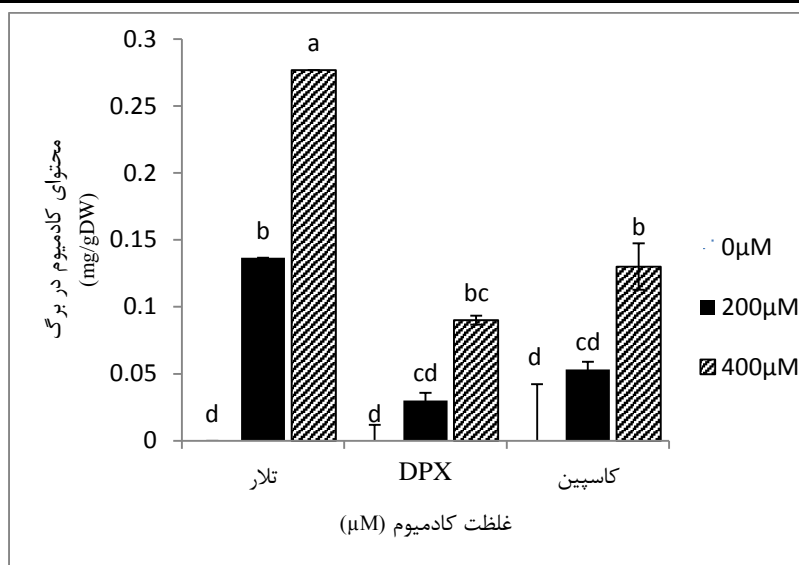
شکل ۲: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای آنتوسیانین رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم ریشه و برگ

بررسی غلظت کادمیوم در ریشه و برگ نشان داد، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط محتوای آن در بافت ریشه و برگ نیز افزایش یافت. بالاترین مقدار محتوای کادمیوم در ریشه و برگ در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم تلار و پایین‌ترین محتوای کادمیوم در دو رقم دیگری مشاهده شد.



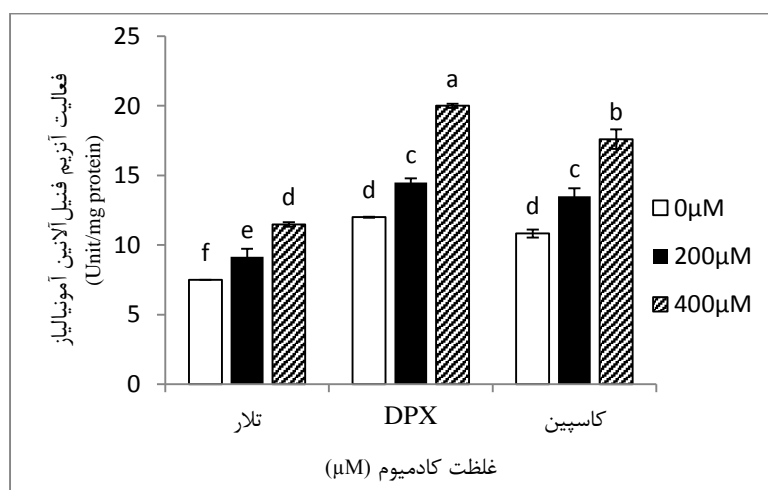
شکل ۳: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم در ریشه و برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).



ادامه شکل ۳: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم در ریشه و برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز برگ

شکل ۴ نشان داد که تیمار کادمیوم منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز برگ در ارقام مورد مطالعه سویا نسبت به شاهد شده است. بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز مربوط به تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم DPX بود. تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در ارقام تلار، DPX و کاسپین به ترتیب باعث افزایش ۱۷، ۱۷ و ۲۰ درصدی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز نسبت به شاهد شده است. همچنین در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در ارقام DPX، کاسپین و تلار به ترتیب ۴۰، ۳۸ و ۳۳ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت.



شکل ۴: اثر تیمار کادمیوم بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).

جدول ۱: مقایسه میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) اثرات کادمیوم بر رشد در سه رقم سویا

گیاه	غلظت Cd (μM)	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)
تلار	۰	۱۲/۶ ^{ab} ±۰/۳	۱۵/۶ ^a ±۰/۲
	۲۰۰	۷/۹۶ ^e ±۰/۳۱	۱۰/۴۶ ^d ±۰/۳۱
	۴۰۰	۵/۱ ^f ±۰/۳۷	۷/۶ ^e ±۰/۳۷
DPX	۰	۱۳/۰۳۳ ^{ab} ±۰/۳۱	۱۶/۰۳ ^a ±۰/۲۹
	۲۰۰	۱۲/۰۶ ^{bc} ±۰/۱۲	۱۴/۵۶ ^b ±۰/۱۲
	۴۰۰	۸/۸۳ ^{de} ±۰/۴۴	۱۱/۳۳ ^d ±۰/۴۴
کاسپین	۰	۱۳/۳۶ ^a ±۰/۴۴	۱۵/۸۶ ^a ±۰/۴۴
	۲۰۰	۱۱/۵ ^c ±۰/۲۸	۱۴ ^{bc} ±۰/۲۸
	۴۰۰	۹/۵ ^d ±۰/۲۸	۱۳/۳ ^c ±۰/۴۴

حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) اثرات کادمیوم بر محتوای رنگیزه‌ها در سه رقم سویا

گیاه	غلظت Cd (μM)	محتوای کاروتنوئید ($\mu\text{g/gFW}$)	محتوای کلروفیل a ($\mu\text{g/gFW}$)	پراکسید هیدروژن ($\mu\text{g/gFW}$)	مالون دی-آلدئید ($\mu\text{g/gFW}$)
تلار	۰	۱۰۱ ^{ab} ±۳	۱۳۱ ^{ab} ±۳	۱۷۵ ^e ±۳	۱۶۳ ^{ef} ±۳
	۲۰۰	۵۴/۶ ^e ±۳/۱	۸۴/۶۶۶۷ ^e ±۳/۱	۲۰۳ ^b ±۲	۱۹۱ ^{bc} ±۲
	۴۰۰	۲۶ ^f ±۳/۷	۵۶ ^f ±۳/۷	۲۴۲ ^a ±۵/۷	۲۳۶ ^a ±۳/۳
DPX	۰	۱۰۱ ^{ab} ±۲	۱۳۱ ^{ab} ±۲	۱۷۲ ^c ±۲/۸	۱۶۰ ^f ±۲/۸
	۲۰۰	۹۴/۶ ^b ±۲/۹	۱۲۴/۶ ^b ±۲/۹	۱۸۷ ^c ±۲/۸	۱۷۵ ^d ±۲/۸
	۴۰۰	۷۳/۶ ^d ±۳/۶	۱۰۳/۶ ^d ±۳/۶	۲۰۰/۳ ^b ±۱/۲	۱۸۸/۳ ^{bc} ±۱/۲
کاسپین	۰	۱۰۸/۶ ^a ±۴/۴	۱۳۸/۶۶ ^a ±۴/۴	۱۷۹ ^{ce} ±۱/۷	۱۷۰/۳ ^{de} ±۲
	۲۰۰	۹۰ ^{bc} ±۲/۸	۱۲۰ ^{bc} ±۲/۸	۱۸۶ ^c ±۲	۱۸۴ ^c ±۲
	۴۰۰	۷۹/۶ ^{cd} ±۵/۴	۱۰۹/۶ ^{cd} ±۵/۴	۲۰۳ ^b ±۱/۵۲	۱۹۴/۳ ^b ±۲/۶

حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، در حضور تیمار کادمیوم، طول ریشه و ساقه ارقام سویا کاهش نشان داد. این کاهش در رقم تلار چشمگیرتر از رقم DPX و کاسپین بود. در تحقیقاتی که پوپووا و همکاران انجام دادند، مشخص شد که کادمیوم، منجر به کاهش رشد در گیاه نخود شده است (Popova *et al.*, 2009). همچنین آیدینپ و مارینوا گزارش کردند که کادمیوم طول ریشه و ساقه را در گیاه یونجه کاهش داده است (Aydinalp & Marinova, 2009). مهار رشد توسط کادمیوم می‌تواند به علت مهار تقسیم سلولی و سرعت طویل شدن سلول‌ها باشد که اغلب توسط مهار غیر قابل برگشت پمپ پروتون که مسئول این فرایند است، رخ می‌دهد (Liu *et al.*, 2004). همچنین در تحقیق حاضر، محتوای کلروفیل a تحت تیمار کادمیوم در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰

میکرومولاری در سه رقم مورد مطالعه کاهش یافت که این کاهش در رقم تلار چشمگیرتر بود. در این زمینه هو و همکاران گزارش کردند که کادمیوم باعث کاهش محتوای کلروفیل در گیاه لوبیا شده است (Hou *et al.*, 2011). همچنین پوپووا و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کلروفیل در گیاهان نخود کاهش یافت (Popova *et al.*, 2009) کاهش ذخیره کلروفیل در برگ‌ها می‌تواند به علت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل باشد. مهار بیوسنتز کلروفیل احتمالاً بواسطه مهار سنتز δ -آمینولولونیک اسید و مهار تشکیل پروتوکلروفیل در اکتاز می‌باشد. همچنین در برگ‌های تحت تنش کادمیوم، تشکیل LHCII مختل می‌شود که علت آن مهار سنتز پروتئین LHCII در مرحله نسخه‌برداری است که باعث فتواکسید شدن کلروفیل می‌گردد (Popova *et al.*, 2009). مقدار کاروتنوئیدها نیز شاخص دیگری است که تحت تاثیر کادمیوم قرار گرفت. با افزایش غلظت کادمیوم مقدار کاروتنوئیدها نیز در هر سه رقم مورد مطالعه سویا کاهش یافت. کاهش کاروتنوئیدها بدلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و منجر به برهم‌ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت-زدایی کلروفیل برانگیخته سه‌تایی نقش دارند (Egert & Tevini, 2002). کاروتنوئیدها در چند سطح باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند که از جمله واکنش با کلروفیل برانگیخته برای ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن است. بنابراین، کاروتنوئیدها بعنوان یک سیستم حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن القا شده از بین می‌روند. گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل، اکسیژن یکتایی و غیره هستند. گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های بسیار فعال و ناپایدار هستند که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شوند (Finnegan & Chen, 2012). بررسی‌های انجام شده سنجش پراکسید هیدروژن در سویا نشان داد که در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم، محتوای پراکسید هیدروژن در هر سه رقم سویا نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. نتایج میزان پراکسید هیدروژن بدست آمده در این تحقیق با یافته‌های تحقیقات اسمیت و همکاران در حضور کادمیوم، مطابقت دارد (Smeets *et al.*, 2005). همچنین این محققان مشخص کردند که کادمیوم، تاثیر افزایشی بر میزان پراکسید هیدروژن در گیاه لوبیا داشته است. پراکسید هیدروژن یکی از شاخص‌های سنجش تنش فلزات سنگین می‌باشد. پراکسید هیدروژن در حضور کاتالیزورهای فلزی خاص یا کلاته‌های فلزی از طریق واکنش‌های هابر-ویس یا فنتون، تولید رادیکال بسیار فعال OH^- می‌نماید و سمیت خود را افزایش می‌دهد (Finnegan & Chen, 2012). رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی هستند که موجب پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود. در این تحقیق افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در هر سه رقم نسبت به شاهد مشاهده شد که این تغییرات احتمالاً بدلیل اثرات سمی کادمیوم می‌باشد. همچنین تحقیقاتی مشابه با نتایج بدست آمده در این تحقیق گزارش شده است که غلظت بالای کادمیوم باعث افزایش سطوح مالون‌دی‌آلدئید در برگ و ریشه گیاه جو شده است (Popova *et al.*, 2009). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول‌ترین و قابل قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء محسوب می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع،

آلدئیدهایی مانند مالون‌دی‌آلدئید تولید می‌کنند که این محصولات آلدئیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Shulaev & Oliver, 2006). در شرایط طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن تعادل وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی و زنده این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی دارند که قادر به سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. با کمک این سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه قادر به کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌باشد. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها دارای نقش آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Egert & Tevini, 2002). ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها حاصل مسیر فنیل پروپانویدها هستند. آنزیم‌های مختلفی در سنتز ترکیبات فنیل پروپانویدی نقش دارند که نخستین و مهم‌ترین آن‌ها، آنزیم PAL است. آنزیم PAL نخستین واکنش در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها را کاتالیز می‌کند و فنیل آلانین را به صورت غیراکسیداتیو دآمین می‌کند و طی آن سینامیک اسید تولید می‌گردد.

نتایج حاصل از سنجش ترکیبات فنلی در سه رقم سویا نشان داد که میزان این ترکیبات تحت تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم افزایش معنی‌داری داشتند. بالاترین محتوای ترکیبات فنلی در غلظت ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در ارقام کاسپین و DPX بود. تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعددی مانند اشعه UV، دمای پائین، جراحت، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی گزارش شده است. در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیبات فیتوفنولیک بخصوص پلی‌فنل‌ها در کاهش سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات - گلوکاتایون در دفع رادیکال‌های پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند (Sakihama *et al.*, 2002). همچنین در پژوهش حاضر محتوای آنتوسیانین در سه رقم سویا تحت تیمار کادمیوم افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. محتوای آنتوسیانین در غلظت ۴۰۰ میکرومولار کادمیوم تفاوت معنی‌داری در بین ارقام تلار، کاسپین و DPX نشان نداد. دای و همکاران گزارش دادند که کادمیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL گردید و از این طریق در بیوسنتز آنتوسیانین نقش دارد (Dai *et al.*, 2006). در این پژوهش، افزایش فعالیت آنزیم PAL با تغییرات مقدار ترکیبات فنلی و آنتوسیانین در شرایط تنش هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی و آنتوسیانین در کاهش اثرات تنش پیشنهاد شد که ارقام سویا با افزایش فعالیت آنزیم PAL، محتوای ترکیبات فنلی و آنتوسیانین را سبب شده است. دای و همکاران نیز گزارش کردند که فلز سنگین کادمیوم از طریق تاثیر بر فعالیت فنیل آلانین-آمونیلایز که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین می‌باشد، منجر به افزایش محتوای آنتوسیانین در گیاه آزولا شده است (Dai *et al.*, 2006). همچنین افزایش همزمان فعالیت PAL، سطح آنتوسیانین و ترکیبات فنولی نیز در ارقام توت فرنگی گزارش شده است (Jiang & Joyce, 2003). در این پژوهش، با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کادمیوم ریشه و برگ در سه رقم سویا افزایش یافت، اما این افزایش در رقم تلار چشمگیرتر بود. به عبارت دیگر، جذب کادمیوم در ارقام کاسپین و DPX

کمتر از تلار بود. نتایجی مشابه با نتایج بدست آمده در این تحقیق توسط پیچ و همکاران گزارش گردید که در آن با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کادمیوم در گیاهان لوبیا و ذرت افزایش نشان داد (Page *etal.*, 1971).

نتیجه گیری کلی

وجود فلزات سنگین از جمله کادمیوم در محیط، یکی از عوامل تاثیر گذار بر گیاهان محسوب می شود؛ با این حال، برخی گیاهان از مکانیسم های فیزیولوژیک خاصی استفاده می کنند که می توانند در حضور مقادیر بالایی از فلزات سنگین که به طور طبیعی برای بیشتر گیاهان سمی اند، به فعالیتهای حیاتی خود ادامه دهند. بنابراین در این پژوهش هدف ما شناسایی رقم های مقاوم سویا به کادمیوم می باشد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که رقم های تلار، کاسپین و DPX نیز تحت تاثیر سمیت کادمیوم قرار گرفته و کاهش رشد و همچنین افزایش تنش اکسیداتیو را نشان دادند. نتایج این تحقیق حاکی از این است که رقم تلار تحت تنش کادمیوم حساسیت بیشتری نسبت به رقم های کاسپین و DPX دارد. به عبارت دیگر رقم های کاسپین و DPX مقاومت بالاتری در مقابل سمیت کادمیوم دارند. و به نظر می رسد افزایش بیشتر محتوای ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله محتوای ترکیبات فنلی، آنتوسیانین ها و افزایش فعالیت آنزیم PAL و کاهش میزان جذب یون کادمیوم در این دو رقم میتواند در ایجاد مقاومت بیشتر نسبت به کادمیوم موثر باشد.

منابع

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C. and Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 2522-2529.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment*, 24: 1337-1344.
- Aydinalp, C. and Marinova, S. (2009). The effects of heavy metals on seed germination and Plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15: 347-350.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 21-34.
- Chen, F., Dong, J., Wang, F., Wu, F., Zhang, G., Li, G., Chen, Z., Chen, J. and Wei, K. (2007). Identification of barley genotypes with low grain Cd accumulation and its interaction with four microelements. *Chemosphere*, 67: 2082-2088.
- Dai, L.P., Xing, Z.T., Huang, Y. and Li, M.J. (2006). Cadmium induced changes in pigments, total phenolics and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of *Azolla imbricate*. *Environmental Toxicology*, 505-512
- Egert, M. and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48: 43-48.
- Finnegan, P.M. and Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in physiology*, 3: 1-18.

- Greger, M. and Lofstedt, M. (2004). Comparison of Uptake and Distribution of Cadmium in Different Cultivars of Bread and Durum Wheat. *Crop Science*, 44: 501–507.
- Guo, P., Cao, Y., Li, Z., and Zhao, B. (2004). Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant, Cell and Environment*, 27: 473-47
- Hahlbrock, K. and Ragg, H. (1975). Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Archive Biochemistry Biophysics*, 166: 41–46.
- Heath, R.L and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics*, 125: 189-198.
- Hegedus, A., Erdi, S. and Horvath, G. (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant Science*, 160:1085- 1093.
- Hou, L.Y., Shi, W.M., Wei, W.H. and Shen, H. (2011). Cadmium uptake, translocation, and tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biological Trace Element Research*, 139:228–240
- Jiang, Y.M., Joyce, D.C. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 39:171–174.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J.Y., Yang, Y.Y. and Hwang, I. (2003). Functional expression of a bacterial Heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance and decrease uptake of heavy metals. *Plant Physiology*, 133:589-596.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Liu, D., Jiang, W. and Gao, X. (2004). Effect of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Plant Biology*, 47: 79 -83.
- Lozak, A., Solytk, K., Ostapczuk, P. and Fijaleka, Z. (2002). Determination of selected trace elements in herbs and their influence. *Science of The Total Environment*, 289:33-40.
- Marss, K.A. and Walbot, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutation s-transferase bronzee Z gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiology*, 113: 93-102.
- Memon. A.R., Aktoprakligul, D., Zdemur, A. and Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Botany journal*, 25:111-121.
- Page, A. L., Bingham, F.T. and Nelson, C. (1971). Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. *Journal of Environmental Quality*, 1: 288-291.
- Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Ivanova, A., Krantev, A., Szalai, G. and Janda, T. (2009). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 224-231.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolics antioxidant and oxidant activity: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. *Toxicology*, 177: 67-80.
- Schützendübel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Journal of Experimental Botany*, 53: 1351- 1365.
- Shafi, M., Bakht, J., Hasan, M., Raziuddin, M., and Zhang, G. (2009). Effect of cadmium and salinity stresses on growth and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum. L*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82:772-776.

- Shulaev, V. and Oliver, D.J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*, 141: 367-372
- Siedlecka, A. M. (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum poloniae*, 64:265-272.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., VanLaera, A. and Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:437-444.
- Stroiński, A. (1999). Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiologia Plantarum*, 21: 175-188.
- Toppi, L. and Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants- review. *Environmental and Experimental Botany*, 41:105-130.
- Vassilev, A., Vangronsveld, J. and Yordanov, I. (2002). Cadmium phytoextraction; present state, biological backgrounds and reaserch needs –review. *Plant Physiology*, 28:68-95.
- Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93

Study of physiological and biochemical parameters of some soybean (*Glycine max*) varieties under cadmium stress

Sh. Hashemi ¹, F. Mohamadhasani^{*2}

Received:2018.2.20

Accepted:2018.12.25

Abstract

In the current study, the effect of different concentrations of cadmium (0, 200, 400 μM) on root and shoot growth, malondialdehyde (MDA), total phenol, hydrogen peroxide (H_2O_2), chlorophyll and anthocyanin contents, phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity were investigated in three varieties of soybean plant (Telar, DPX, Caspian). The results showed that cadmium treatment caused reduction of root and shoot biomass as well as chlorophyll a content in all three cultivars with the highest reduction in Telar. Significant increase in total phenolics and anthocyanin contents and PAL activity was observed in all the three soybean cultivars with the cadmium treatment. The content of MDA in all three cultivars was significantly increased in 400 μM concentration of cadmium treatment as compared to control. The results of this study indicated that Telar cultivar was the most sensitive cultivar to cadmium stress compared with Caspian and DPX cultivars.

Keywords: Anthocyanin, Cadmium, , Phenol , Soybean

1-Biology Department, Faculty of Science, ShahidBahonar University of Kerman, Iran

2-Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

*(corresponding author: fereshtehmhasani@yahoo.com)

Content

The treatment effect of Paclitaxel on some effective physiological traits of cold stress tolerance in bud grape of cv. Bidane Sefide P.Roostaei, M.Rasouli, A.Babae.....	21
The effect of silver nanoparticles on the antioxidant capacity and total soluble protein pattern in tomato seedlings under in vitro culture R.Razavizade.....	38
The levels of heavy metals of copper, zinc and iron in muscle and gill tissues of the three species of (Carassius auratus), (Vimba persa) and (Luciobarbus capito) in the manjil dam E.Sogi ,H.Bigdeli , A.Solimany.....	53
The effect of superabsorbent nanocomposite on drought stress resistance in sport turfgrass H. Bagheri, M. Solgi, M. Taghizadeh, A. Mirzakhani.....	68
Comparison of different methods of tannin extraction from the leaves of Iranian walnut (<i>Juglans regia</i> L.) and their effects on chemical composition and fermentative parameters <i>in vitro</i> B.Amir , S.Sobhani rad.....	82
Association analysis of genes controlling morphological traits in rice using ISSR markers in flooding and drought condition M.R. Karim , H. Sabouri, A.R. Dadras.....	103
Evaluation of morphological flexibility of Khajoo fish (<i>Schizothorax pelzami</i> Kessler 1870) in Eastern Iran using geometric morphometric method A. Sazgar, O. Safari, S. Danesh, F. Yazdani Moghadam.....	114
Geometric morphometric comparison of teilehkhous fish (<i>Capoeta capoeta</i>) in three basins of Iran Y.Keyvani ,M.Banimasani ,E.Ebrahimi.....	128
Callusgenesis and direct regeneration optimization for root, cotyledon and hypocotyle explants of safflower M.Afsharshandiz ,H.Rahnama , H.Azarnivand.....	140
Isolation of biodegradable producing bacteria from petroleum-contaminated deposits of Abadan Oil Refinerybean varieties (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) H.Sabati , H.Motamedi.....	159
Study of physiological and biochemical parameters of some soybean (<i>Glycine max</i>) varieties (Telar, DPX, Caspian) under cadmium stress SH.Hashemi , F.Mohamad hoseini.....	174

Journal of Applied Biology
Autumn2019

AlZahra University - Vice Chancellery for Research

Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor of Alzahra University

Chief Editor: A. 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, 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: 10 copies

Publication Frequency: Quarterly

Price: 10000 Rls

In order to have access to the table of Contents and abstracts contact:

**Address: AlZahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak Sq,
Tehran, 1993891176, Iran.**

Tel/Fax:021- 85692205

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

ISSN: 1607- 9884

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir