



مجله زیست‌شناسی کاربردی

زمستان 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، استادیار 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: خانم بنفشه محمدی

چاپ و صحافی: انتشارات دانش‌نگاران اوج

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

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

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

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می‌شود: [www.Isc.gov.ir](http://www.Isc.gov.ir)

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

۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

Email: [Japplbiol@alzahra.ac.ir](mailto:Japplbiol@alzahra.ac.ir)

# راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

## هدف

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

## موضوعات مرتبط با مجله

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

## قوانین نشر

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

## پیش از ارسال مقاله حتماً به نکات زیر توجه فرمایید:

- مقاله به زبان فارسی پذیرفته خواهد شد.
- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله (<http://jab.alzahra.ac.ir>) به دبیرخانه ارسال شود. مقالاتی که از طریق دیگری سایت ارسال شوند، در جلسه هیئت تحریریه بررسی نخواهند شد. تمامی مراحل داوری نیز از طریق سایت مجله قابل پیگیری است.
- نگارندگان همزمان با ارسال مقاله، فرم تعهدنامه را در سایت مجله، تکمیل و پس از امضای تمام نگارندگان و اسکن فرم، آن را به همراه مقاله از طریق سایت مجله ارسال نمایند.
- در مقاله‌های ارسالی باید تمامی نکات مربوط به شیوه صحیح نگارش از جمله اصول نقطه گذاری، رسم جدول، شکل، نوشتن منابع و ... به دقت رعایت شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی باشد، این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد (استادان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
- به دانشجویان محترم توصیه می‌شود پیش از ارسال مقاله، از استاد راهنمای خود تقاضا نمایند که آن را مطالعه و کاستی‌های آن را رفع نمایند.
- در متن مقاله، اعداد صفر تا نه به حروف و اعداد ۱۰ به بالا به عدد نوشته شوند (به استثنای اعداد جداول، شکل‌ها، شماره

منابع و شماره گذاری فرمول‌ها).

- در متن مقاله، علامت % با کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جدول‌ها و شکل‌ها که علامت % در سمت چپ اعداد قرار گیرد).
- در متن مقاله (بجز جداول، شکل‌ها و چکیده انگلیسی که بر اساس سال میلادی بیان شوند)، اگر مقاله فارسی است سال شمسی، و اگر مقاله انگلیسی است سال میلادی باید باشد.
- اسامی علمی (از جمله نام گیاهان، جانوران، میکروب‌ها) باید بر اساس سیستم دوفامی طبق جدیدترین طبقه بندی‌های سیستماتیک و با حروف ایتالیک نوشته شوند. این اسامی در عنوان و چکیده بدون ذکر نام‌گذار (author) درج شوند، اما در متن، آنجا که برای اولین بار ذکر می‌شود، همراه ذکر مخفف نام‌گذار (به عنوان مثال L. به معنی Linnaeus) و به صورت غیر ایتالیک نوشته شوند و در صورت تکرار در متن، دیگر به نام‌گذار اشاره نشود. اسم نام‌گذار باید طبق استانداردهای مربوطه نوشته شود.
- میان کلمه و نقطه (.)، کاما (،)، علامت سوال (؟) و پرانتز ( ) فاصله نباشد و بعد از این علامت‌ها یک فاصله (Space) منظور شود.
- در نگارش مقاله تا حد امکان، از واژه‌های فارسی استفاده شود.
- در موارد ضروری، اصطلاح خارجی در متن مقاله به زبان فارسی نگاشته و خواننده به زیرنویس (Footnote) صفحه که واژه مورد نظر به زبان اصلی نوشته شده، هدایت شود. عدد هر زیرنویس در قسمت بالا و سمت چپ زیرنویس مربوطه و با قلم Times New Roman 10 نازک درج شود. اعداد زیرنویس در هر صفحه از عدد ۱ آغاز شوند.
- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). در صورتی که منبع مورد استفاده دو نگارنده داشته باشد، نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001). در منابع با بیش از دو نگارنده، تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه et al. و سپس سال انتشار ذکر شود (Fernandes et al., 2001). در متن مقاله می‌توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953) معتقد است... و یا به اعتقاد شیمی و همکاران (Shimi et al., 2005).
- et al. واژه‌ای لاتینی است و حتماً باید ایتالیک و به نقطه ختم شود.
- متن مقاله با نرم افزار Microsoft Word 2007 و با پسوند \*.doc تهیه شود.
- مقاله به صورت الکترونیک روی کاغذ سفید به ابعاد ۲۱ × ۲۹/۷ سانتی‌متر (A<sup>4</sup>) با حاشیه ۲/۵ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (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 ۱/۲۷ سانتی‌متر باشد.

## تدوین مقاله با شرح جزئیات

- عناوین اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و Abstract انگلیسی.

-عناوین اصلی فارسی: راست چین، ۱۴ توپر، انگلیسی: چپ چین، ۱۲ توپر

-پس از عناوین اصلی، نیازی به استفاده از دو نقطه (: نیست. مانند مقدمه (نه مقدمه:).

- سایر عناوین، عناوین درجه دوم و سوم محسوب می‌شوند.

-پس از عناوین اصلی و درجه دوم، ادامه متن از سطر جدید آغاز شود. اما عناوین درجه سوم، با دو نقطه (: از مطلب جدا

شوند.

-تمام عناوین اعم از اصلی، درجه دوم و سوم، توپر باشند.

۱- عنوان مقاله: فارسی: وسط چین، ۱۴ نازنین توپر، انگلیسی: وسط چین، Times new Roman ۱۲ توپر

۲- نام نگارندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ توپر، با ویرگول از هم جدا شوند. شماره هر نگارنده، ۱۱ توپر در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)، درج علامت ستاره (\*) در سمت راست و بالای (superscript) نام نگارنده مسئول مکاتبه، انگلیسی: ۹ توپر با ویرگول از هم جدا شوند. قبل از آخرین نگارنده از حرف ربط and استفاده شود. شماره هر نگارنده در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)،

۳- آدرس نویسندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ نازک، انگلیسی: وسط چین، ۹ نازک در پاورقی

۴- چکیده: فارسی: ۱۲ نازک و ایتالیک تنها در یک پاراگراف، حداکثر ۳۰۰ تا ۳۰۰ کلمه، فاقد علائم اختصاری مبهم. پس از ذکر اهمیت موضوع در یک سطر، اشاره‌ای به اهمیت پژوهش، روش و نتایج شود. انگلیسی (Abstract): ۱۲ نازک و تنها در یک پاراگراف، ترجمه دقیق و علمی چکیده فارسی، فاقد علائم اختصاری مبهم

۵- واژه‌های کلیدی: فارسی: (۱۲ توپر و ایتالیک)، انگلیسی (Key words): (۱۰ توپر).

-واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی، کلمات مشترکی با عنوان مقاله نداشته باشند، به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.

۶- مقدمه: ۱۲ معمولی، محتوی بررسی منابع کامل با تاکید به آن موضوع خاص و با استناد به جدیدترین منابع، اشاره دقیق به اهمیت تحقیق و هدف بررسی.

۷- مواد و روش‌ها: ۱۲ معمولی، توضیح دقیق مواد و روش‌ها از جمله محل و سال اجرای تحقیق، محل جمع آوری نمونه، شرح دقیق روش کار. در صورت استفاده از روش‌های متداول، نیازی به ذکر کامل روش نیست و تنها به منبع مورد استفاده اشاره شود.

۸- نتایج و بحث: ۱۲ معمولی، به جدیدترین منابع مرتبط با آن موضوع اشاره شود. تحلیل کاملی از نتایج انجام و نتایج حاصل از آزمایش با نتایج سایر پژوهش‌ها مقایسه شود.

-برای بیان اوزان و مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.

-نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها

- استفاده از جدول و شکل تنها هنگامی مجاز است که نتوان اطلاعات بدست آمده (نتیجه) را براحتی بیان کرد.

عنوان جدول و شکل باید گویا باشد به نحوی که نیاز به مراجعه به متن مقاله نباشد. علائم اختصاری یا زیرنویس‌ها در پایین جدول یا شکل معرفی شوند.

-داده‌ها یا بصورت جدول و یا شکل نمایش داده شوند، یعنی داده‌هایی نباشند که به هر دو صورت شکل و جدول ارائه شوند.

-شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند، بصورت سیاه و سفید، با بافت ساده طراحی و شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند، بدون سایه و با کیفیت بالا، ارسال شوند.

-در هر قسمت که به یک جدول یا شکل اشاره می‌شود، حتی المقدور بلافاصله ارائه شوند و ارائه آنها به صفحات بعد موکول نشود.

- ابعاد جدول یا شکل طوری تنظیم شود که حداکثر در یک صفحه مجله جا بگیرد.

-جدول با ۳ خط افقی رسم شود. (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 سانتی متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشند.

- عنوان مجله‌ها کامل نوشته شوند.

(برای استفاده از نام‌های اختصاری استاندارد یا کامل مجلات علمی، به سامانه مجلات مربوطه مراجعه شود .

- بین حروف اختصاری نام‌های اول یک نگارنده، فاصله نباشد (مثال: A.D.C).

- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده اند، به جای ذکر سال، از عبارت in press استفاده شود.

- بر حسب نوع منبع، فقط مطابق الگوی زیر عمل و حتماً به علائم جداکننده و ویرایشی توجه شود.

### نشریات

الف) با یک نویسنده: نام خانوادگی، نام (ها). (سال انتشار) عنوان مقاله. عنوان نشریه، جلد (شماره): شماره صفحات.

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

ب) با دو نویسنده:

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

ج) با بیش از دو نویسنده: مشابه بالاست، جز این که بعد از نام کوچک نویسنده اول، ویرگول بیاید.

Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998) Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posremergnce 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 صفات مقاله، عنوان کتاب. ناشر (کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ).

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

- خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، 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/michelmor/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](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.

- جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی ایجاد کننده ورم پستان در گاوهای شیری شهر اصفهان  
 سارا امیری فهلیانی، کیوان بهشتی مآل، فرشته قندهاری.....۹
- مطالعه بیوسیستماتیک قورباغه مردابی (*Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) در زیستگاه های تالابی  
 الشتر (استان لرستان)  
 اشرف جزایری، فروغ پاپهن، اسماء حاتمی.....۲۳
- اثر آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی روی رشد، رنگ پذیری ، فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی آزاد  
 خزر (*Salmo trutta*)  
 محمد کاسعلی پور، حسین خارا، علی صادق پور.....۳۸
- اثر زیره سیاه بر فاکتورهای آنتی اکسیدانی و پارامترهای استرس اکسیداتیو در رت های مواجه شده با ۱ و  
 ۲- دی متیل هیدرازین  
 ابوالفضل دادخواه، فائزه فاطمی، سالومه دینی.....۵۸
- بررسی محتوای برخی از متابولیت های ثانویه و اثر آللوپاتیک اندامهای مختلف علف هرز شاتره (*Fumaria*  
*parviflora*) بر یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*)  
 عبدا...عطائی، ابراهیم غلامعلی پور علمداری، زینب اورسجی، علی راحمی کاریزکی.....۷۶
- اثر تیمارهای مقاوم سازی بر تحمل تنش سرما در نشا خیار  
 فردین قنبری، سجاد کردی.....۹۷
- اثر تیمار نانو نقره بر میزان عناصر موجود در بنه زعفران تحت شرایط شوری  
 آزاده کریمی جعفری، منیر حسین زاده نمین.....۱۱۴

مقایسه ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و خاصیت پاداکسایشی عصاره های *Mentha* و *Mentha spicata* L.

*longifolia* L. با روش های مختلف استخراج

نیر محمدخانی، ژیلا عباس زاده.....۱۲۹

تأثیر کاربرد کود مرغی حاوی انروفلوکسازین بر تنفس، بیوماس میکروبی و جمعیت برخی باکتری های

مفید خاک

مهسا محمدزاده، فروزان قاسمیان رودسری، اکبر حسنی، عباسعلی زمانی.....۱۴۴

بررسی کیفیت آب رودخانه زاینده رود با استفاده از شاخص های بی مهرگان کفزی در فاصله پائیز ۹۶ تا

بهار ۹۷

الهه نیکنام ، عاطفه چمنی، محسن نوروزی.....۱۶۴



# جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی ایجاد کننده ورم پستان در گاوهای شیری شهر اصفهان

سارا امیری فهلیانی<sup>۱</sup>، کیوان بهشتی مآل<sup>۲\*</sup>، فرشته قندهاری<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۸

## چکیده

ورم پستان نوعی التهاب غدد پستانی و یکی از شایع ترین بیماری های موجود در صنعت دامپروری است که از نظر بالینی و اقتصادی اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش از شیر ۴۰ راس گاو موجود در گاوداری های شهر اصفهان نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و به منظور شناسایی گونه های باکتریایی با استفاده از روش های شناسایی ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی های صورت گرفته، آلودگی تعداد ۳۰ نمونه از ۴۰ نمونه را به باکتری های *Klebsiella oxytoca*، *Enterobacter cloacae* و *Kocuria marina* نشان داد که بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Klebsiella oxytoca* به میزان ۵۶/۶ درصد و *Kocuria marina* به میزان ۲۰ درصد بود. با توجه به تعداد زیاد نمونه های آلوده، ورم پستان هم چنان یکی از مخرب ترین بیماری های صنعت دامپروری به شمار می آید.

**واژه های کلیدی:** انتروباکتر کلوآکه، کلبسیلا اکسی توکا، کوکوریا مارینا، گاوهای شیری، ورم پستان

## مقدمه

صنایع لبنی یکی از مهم ترین صنایع در بسیاری از کشورها می باشد و نقش بسیار مهمی در تغذیه انسان و همچنین تولیدات دامی یک کشور ایفا می کند. با این حال بیماری های عفونی و غیرعفونی ایجاد شده در دام ها، یکی از چالش های پیش روی دامداران می باشد (Kvis, 2016, Sanotharan et al., 2016, El-Hamid, 2016). یکی از بیماری های بسیار شایع و مخرب صنعت دامپروری که علاوه بر تاثیر بر روی کیفیت و تولید شیر و همچنین سلامت انسان، می تواند منجر به از بین رفتن گاو آلوده نیز شود، بیماری ورم پستان می باشد (Shaheen et al., 2016, Gomes et al., 2016, Vlieghe et al., 2012). ورم پستان یک واکنش التهابی غده پستانی است که در نتیجه ورود میکروارگانیسم های بیماری زا به پستان و سپس تکثیر و تولید توکسین

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

\* (نویسنده مسئول beheshtimaal@iaufala.ac.ir)

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

توسط آن‌ها، بروز پیدا می‌کند (Basdew & Laing, 2011). از مهم ترین تغییراتی که سندرم ورم پستان بر روی شیر ایجاد می‌کند می‌توان به تغییر در رنگ و طعم شیر، ایجاد لخته، افزایش بار میکروبی، کاهش ویتامین‌های B1 و B2، کاهش مواد معدنی (کلسیم، سدیم و فسفر)، کاهش چربی کازئین و افزایش لاکتوفرین و اسیدپتئ شیر اشاره نمود. عوامل ایجاد کننده ورم پستان به دو گروه عوامل واگیردار (*Corynebacterium*، *Mycoplasma bovis*، *Streptococcus agalactiae*، *Staphylococcus aureus*) و محیطی (*Escherichia coli*، *Klebsiella*، *Streptococcus uberis* و *Streptococcus disagalactiae*) تقسیم می‌شوند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱؛ عزت پناه و همکاران، ۱۳۸۷؛ Basdew & Laing, 2011).

بر اساس وجود یا عدم وجود علائم بالینی، این بیماری به دو صورت بالینی و تحت بالینی بروز پیدا می‌کند. در فرم بالینی ورم پستان، به دلیل آشکار بودن علائم بالینی شامل ناهنجاری‌های پستان، تب و تغییر در ظاهر شیر، به راحتی توسط دامپزشک تشخیص داده می‌شوند و تحت درمان قرار می‌گیرند (Vlieghe *et al.*, 2012, Kulkarni & Kaliwal, 2013) اما در ورم پستان تحت بالینی که شکل مخفی و پنهان این بیماری است، به دلیل عدم وجود علائم بالینی، تشخیص بسیار دشوار می‌باشد و به همین دلیل این نوع از ورم پستان بسیار حائز اهمیت است. در این نوع ورم پستان تولید و کیفیت شیر کاهش یافته و به دلیل ظاهر سالم گاو، امکان انتقال بیماری از گاوهای آلوده به گاوهای سالم نیز وجود دارد (Sanotheran *et al.*, 2016, Shaheen *et al.*, 2016, Vlieghe *et al.*, 2012, Kulkarni & Kaliwal, 2013). امروزه به منظور درمان عفونت ورم پستان از آنتی بیوتیک‌های متعددی استفاده می‌شود. کارایی بالینی آنتی بیوتیک‌ها، بسته به نوع ورم پستان ایجاد شده، محل و وسعت عفونت، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و سنتتیک داروهای استفاده شده و الگوی حساسیت پاتوژن، تغییر می‌کند. معیارهای مهم برای شروع درمان ورم پستان شامل تشخیص نوع ورم پستان، میزان آسیب‌های پاتولوژیکی به پستان، نوع پاتوژن‌های درگیر، الگوی حساسیت دارویی و انتخاب داروی ضد میکروبی با خواص دارویی ایده‌آل می‌باشد (Shaheen *et al.*, 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013). لذا هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی عفونت ورم پستان در گاوهای شیری به منظور پیش‌گیری و درمان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

در این پژوهش، برای جداسازی باکتری‌های مورد نظر از ۵ گاوداری شهر اصفهان تعداد ۴۰ نمونه شیر در تابستان ۱۳۹۵ به مدت ۵ ماه، جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل ۳۰ نمونه شیر از گاوهای به ظاهر سالم و همچنین تعداد ۱۰ نمونه از گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان بودند. در این پژوهش علاوه بر گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان، از گاوهای

به ظاهر سالم هم نمونه گیری انجام گرفت زیرا بر اساس علائم مرتبط با عفونت، ورم پستان واگیردار به سه نوع بالینی، تحت بالینی و مزمن تقسیم بندی می شود.

ورم پستان تحت بالینی یک فرم پنهان و مخفی این بیماری است که در آن علائم بالینی و یا سیستمیک قابل مشاهده نمی باشد. این فرم از عفونت ورم پستان بیش از ۴۰ برابر نوع بالینی آن، در گاوهای شیری رخ می دهد و موجب خسارت های اقتصادی بسیار زیادی به صنعت دامپروری می شود (Sanotharan *et al.*, 2016, Shaheen *et al.*, 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013). تشخیص این بیماری به دلیل ظاهر سالم شیر، عدم وجود لخته، تب، تورم و درد پستان بسیار دشوار است. در این نوع ورم پستان، تولید و کیفیت شیر کاهش می یابد و به دلیل ظاهر سالم گاو، امکان انتقال بیماری از گاوهای آلوده به گاوهای سالم وجود دارد (Sanotharan *et al.*, 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013, Vlieghe *et al.*, 2012). نمونه گیری به این صورت بود که ابتدا سر پستانک گاو با پنبه آغشته به الکل ضدعفونی و سپس چند دوشش اولیه دور ریخته شد. از هر یک از گاوها مقدار ۱۰ میلی لیتر شیر در لوله های استریل جمع آوری و در مجاورت یخ به مرکز آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان منتقل شد (Pati & Mukherjee, 2016, Castaneda *et al.*, 2013). به منظور جداسازی باکتری ها از نمونه های شیر مورد مطالعه، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی محیط کشت عمومی و غنی برین هارت اینفیوژن آگار کشت داده شد. سپس کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. جهت خالص سازی نمونه های باکتریایی، کلنی های منفرد بر اساس شکل ظاهری انتخاب و هر کدام مجدداً به طور جداگانه و بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار کشت و درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از اطمینان از خالص بودن باکتری ها، شناسایی آن ها صورت گرفت. در روش شناسایی ماکروسکوپی، ابتدا کلنی های ایجاد شده بر اساس خصوصیات ظاهری همچون شکل، رنگ و اندازه مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی باکتری ها، رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. با رنگ آمیزی گرم، نوع واکنش باکتری، شکل ظاهری و آرایش آن در زیر میکروسکوپ نوری قابل تشخیص می باشد. پس از تایید نوع واکنش گرم باکتری های مورد نظر، برای شناسایی بیشتر، هر کدام بر روی محیط هایی همچون ائوزین متیلن بلو، مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند (Preethirani *et al.*, 2015, Hossein, 2008, Karima, 2007). در نهایت برای بررسی صفات بیوشیمیایی از تست IMViC و اوره، کاتالاز، کوآگولاز، اکسیداز و تخمیر قندهایی هم چون گلوکز، لاکتوز، آرابینوز، سوکروز و گزبلوز و هم چنین تست حساسیت نووبیوسین استفاده شد (Pati & Mukherjee, 2016).

### شناسایی مولکولی جدایه‌ها به روش مولکولی PCR

پس از شناسایی اولیه باکتری‌ها، با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و هم چنین استفاده از دو جفت پرایمر یونیورسال RW01 و DG74 و پرایمرهای CG28F و CG43R به شناسایی نهایی و دقیق آن‌ها پرداخته شد. ابتدا با توجه به دستورالعمل کیت استخراج DNA شرکت تالی ژن پارس، DNA ژنومی استخراج و سپس تا زمان انجام تکنیک PCR در فریزر ۲۰- ذخیره شد. با استفاده از پرایمرهای یونیورسال و پرایمرهای CG28F و CG43R (جدول ۱)، روش PCR برای تکثیر قطعه 16SrDNA برای جدایه‌های مورد نظر انجام شد. تمامی شرایط انجام واکنش PCR با توجه به روش‌های پیشین انجام شد (Amiri *et al.*, 2001, Khan *et al.*, 2003, Riffon *et al.*, 2018). در آخر محصول PCR در ولتاژ ۸۰ ولت بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ توسط نور UV مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای یونیورسال برای تشخیص جدایه‌های مورد نظر در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان

مشخصات/ نام پرایمر	G+C%	نوکلئوتید	طول پرایمر	طول محصول
RW01	۵۵٪	5'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3'	۲۰	bp۳۷۰
DG74	۵۵٪/۹	5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3'	۱۹	bp۳۷۰
CG28F	۵۰٪	5'TGTAAAACGACGGCCAGT3'	۱۸	bp۶۵۰
CG43R	۵۰٪	5'CAGGAAACAGCTATGACC3'	۱۸	bp۷۰۰

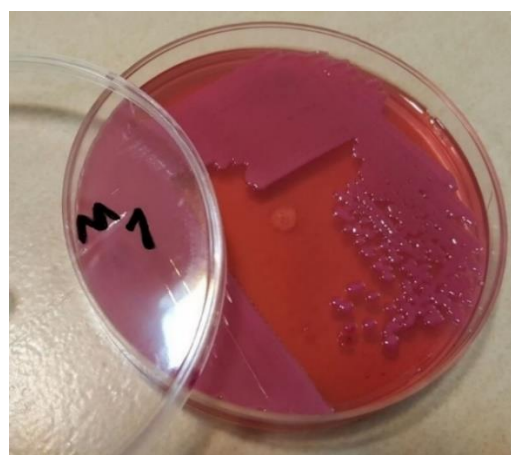
### یافته‌ها

در پژوهش حاضر پس از تطبیق توالی 16S-rDNA جدایه اول با کلیه توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن از طریق نرم افزار بلاست نوکلئوتید مشخص شد که توالی مورد نظر با باکتری کلبسیلا/کسی توکا سویه BR-37 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: KC593550) 97 درصد پوشش و ۹۸/۷۹ درصد مشابهت و همچنین با باکتری کلبسیلا/کسی توکا سویه Z-30 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: GU586149) ۹۷ درصد پوشش و ۹۸/۷۹ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه اول کلبسیلا/کسی توکا سویه ABG-IAUF-1 نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175803 در بانک جهانی ژن، NCBI به ثبت رسید. پس از مطابقت دادن توالی 16S-rDNA جدایه دوم با استفاده از نرم افزار بلاست نوکلئوتید با سایر توالی‌های ژنی موجود در بانک جهانی ژن مشخص شد که توالی جدایه دوم با باکتری *انتروباکترکلوآکه* سویه A2014-212 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: LC089714) ۹۶ درصد پوشش و ۹۵/۷۱ درصد مشابهت و همچنین با باکتری *انتروباکترکلوآکه* سویه ۱۷۴ (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: CP020528) ۹۶ درصد پوشش و ۹۵/۷۱ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه دوم

انتروباکترکلوآکه سویه 2-ABG-IAUF نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175804 در بانک جهانی ژن، پایگاه NCBI ثبت گردید. پس از خوانش توالی‌های تکثیر شده از ژن 16S-rDNA جدایه سوم با استفاده از نرم افزار بلاست نوکلئوتید در بانک جهانی ژن مشخص شد که توالی جدایه سوم با باکتری کوکوریآ مارینا سویه Y213 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: KF306369) ۹۸ درصد پوشش و ۹۷/۵۷ درصد مشابهت و همچنین با باکتری کوکوریآ مارینا سویه S48 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: JX007973) ۹۸ درصد پوشش و ۹۷/۵۷ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه سوم کوکوریآ مارینا سویه 3-ABG-IAUF نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175805 در بانک جهانی ژن، پایگاه NCBI ثبت گردید. از ۴۰ نمونه مورد بررسی در این پژوهش، تعداد ۳۰ نمونه معادل ۷۵ درصد آلوده به *Klebsiella oxytoca*، *Kocuria marina* و *Enterobacter cloacae* بودند. علاوه بر این، در تعداد ۱۰ نمونه معادل ۲۵ درصد هیچ گونه آلودگی باکتریایی مشاهده نشد (جدول ۲). طبق بررسی های صورت گرفته از ۱۷ نمونه فقط باکتری *Klebsiella oxytoca*، از ۵ نمونه فقط *Kocuria marina*، از ۶ نمونه فقط *Enterobacter cloacae* و از ۲ نمونه هر دو باکتری *Kocuria marina* و *Enterobacter cloacae* جداسازی و شناسایی شدند. بنابر نتایج به دست آمده میزان آلودگی باکتری‌های جداسازی شده به صورت *Klebsiella oxytoca* ۵۶/۶ درصد، *Enterobacter cloacae* ۲۳/۳ درصد، *Kocuria marina* ۲۰ درصد گزارش گردید. بنابراین بیشترین آلودگی با ۵۶/۶ درصد مربوط به *Klebsiella oxytoca* و کمترین آلودگی با ۲۰ درصد مربوط به باکتری *Kocuria marina* بود. تصاویر مربوط به خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها در شکل ۱ (۱-۱، ۲-۱، ۳-۱ و ۴-۱) نشان داده شده است. علاوه بر این، نتایج حاصل از مطالعات و خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و همچنین بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول ۳ و ۴ و نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در سه جدایه مورد مطالعه در شکل ۲ آورده شده است.

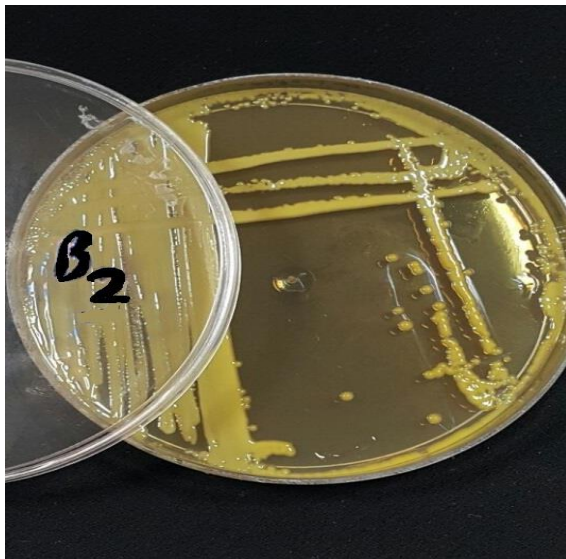


ب

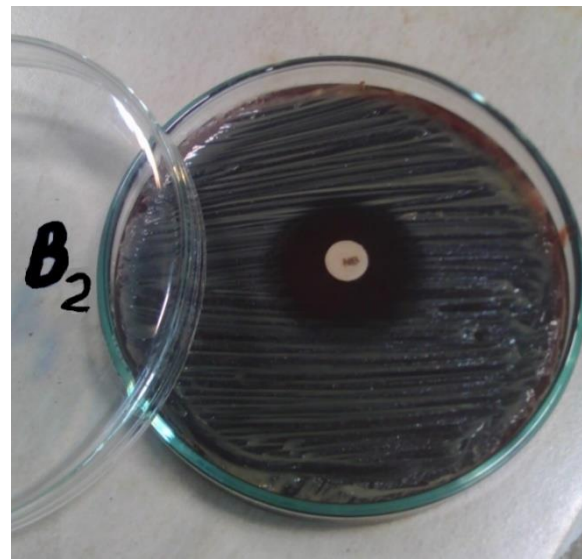


الف

شکل ۱-۱: رشد جدایه ۱ جداسازی شده از نمونه شیر بر روی محیط کشت‌های (الف) مک کانکی آگار و (ب) EMB پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C

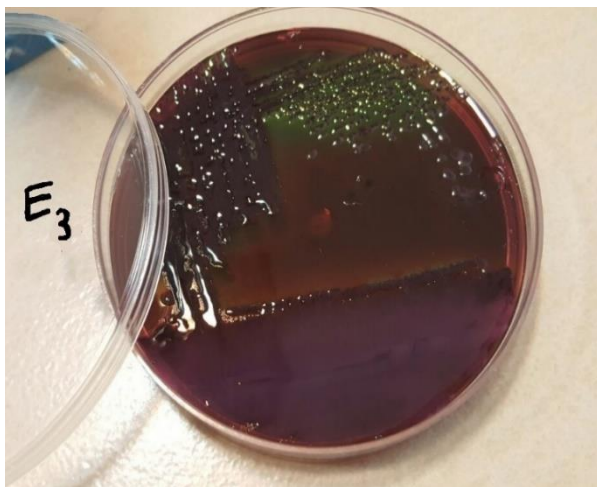


ب

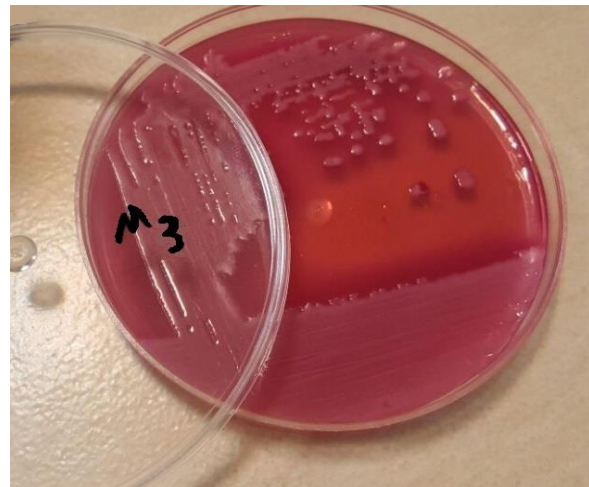


الف

شکل ۲-۱: الف) تست حساسیت به آنتی بیوتیک نوویوسین جدایه ۲  
 ب) رشد جدایه ۲ بر روی محیط کشت BHI آگار پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$

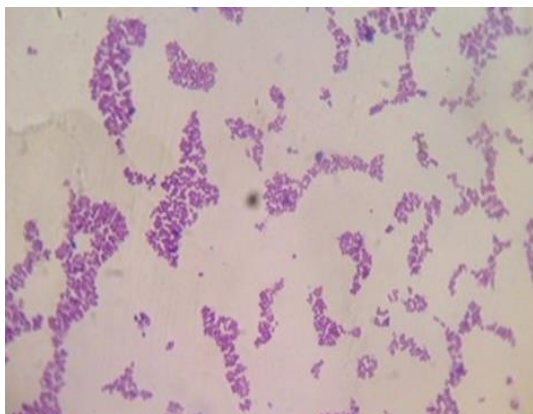


ب

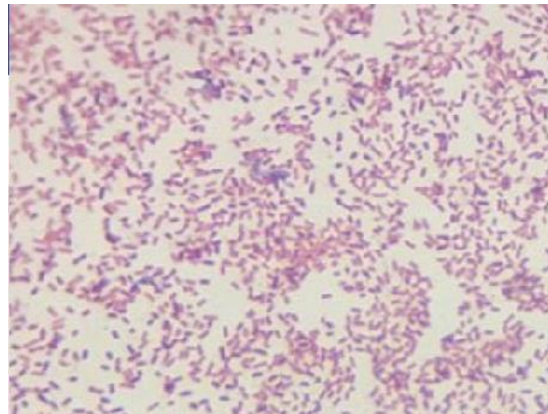


الف

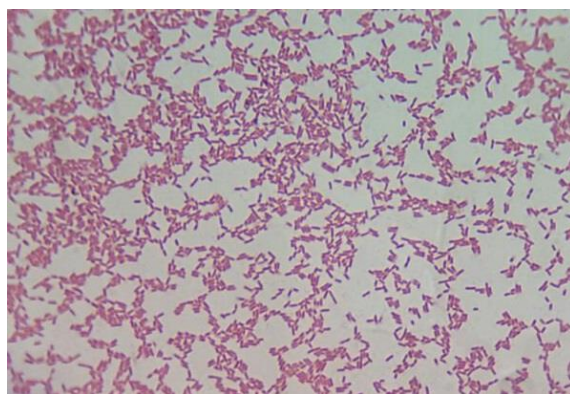
شکل ۳-۱: رشد جدایه ۳ بر روی محیط کشت های  
 الف) مک کانکی آگار و ب) EMB پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$



ب

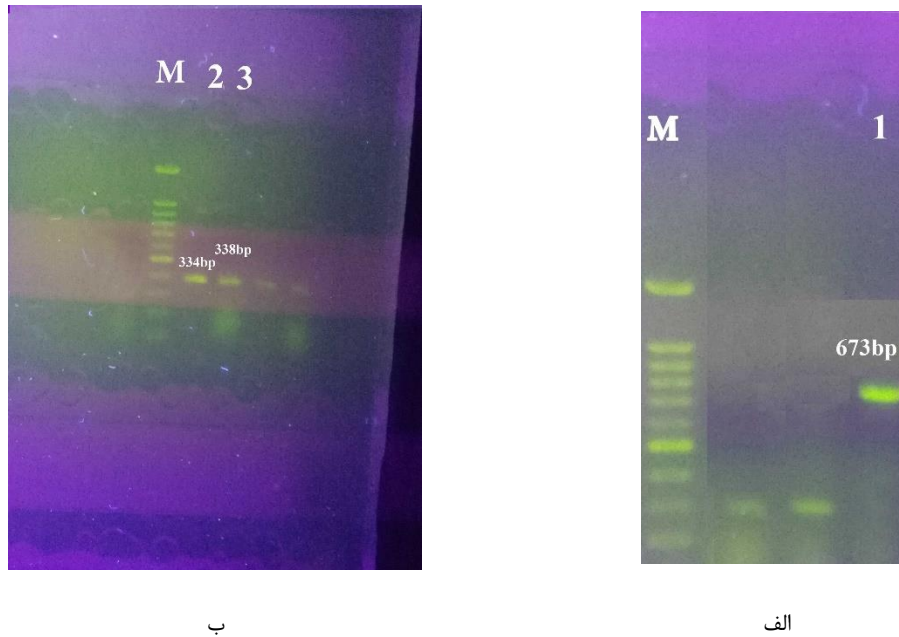


الف



ج

شکل ۴-۱: تصویر میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی گرم جدایه‌ها  
الف) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۱، ب) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۲، ج) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۳



شکل ۲: نتایج حاصل از الکتروفورز قطعه 16S rDNA جدایه‌های

الف) ۱ با پرایمرهای CG43R و CG28F و ب) ۲ و ۳ با پرایمرهای عمومی RW01 و DG74 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

جدول ۲: باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های شیر به تفکیک گاوداری‌ها

ردیف	گاوداری‌های مورد بررسی	تعداد نمونه شیر آلوده	تعداد نمونه شیر غیر آلوده	باکتری‌های جداسازی شده
۱	۱	۴	-	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
۲	۲	۸	-	<i>Kocuria marina</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
۳	۳	۴	۲	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
۴	۴	۵	۳	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Kocuria marina</i>
۵	۵	۹	۵	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Kocuria marina</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>

جدول ۳: محل نمونه برداری، خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها

جدایه	منبع جداسازی	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
۱	نمونه شیر	کلنی‌های بنفش رنگ، صاف و براق، به قطر ۲-۱ میلی متر	کوکوباسیل گرم منفی
۲	نمونه شیر	کلنی‌های زرد رنگ بر روی محیط آگار خون دار و BHI آگار، به قطر ۴-۱ میلی متر، صاف و محدب	کوکسی گرم مثبت
۳	نمونه شیر	کلنی‌های بنفش رنگ، به قطر ۲-۱ میلی متر، نیمه موکوتیدی، صاف و براق	باسیل گرم منفی

با جلای سبز فلزی بر روی محیط EMB



جدول ۴: نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه	اندول	MR	VP	سیترات	اوره	گلوکز	لاکتوز	آرابینوز	گزیلوز	سوکروز	اکسیداز	کانالاز	کواگولاز
۱	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
۲										+	-	+	-
۳	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			

## بحث و نتیجه گیری

شیر و فرآورده‌های حاصل از آن سرشار از مواد مغذی همچون مواد معدنی، ویتامین، پروتئین و غیره می‌باشد به همین دلیل به عنوان یکی از کامل‌ترین غذاها برای تمام افراد به شمار می‌آید. شیر دوشی نامناسب و تماس پستان گاو با بستر آلوده منجر به آلوده شدن بافت پستان می‌شود (Sordelli *et al.*, 2000). سندرم ورم پستان یکی از عفونت‌های اندمیکی است که در پستان گاو ایجاد می‌شود و بر روی کیفیت شیر بسیار تاثیر گذار است (Basdew & Laing., 2011). سندرم ورم پستان یک نوع التهاب عفونی پستان است که علاوه بر تغییراتی که در بافت پستان ایجاد می‌کند، منجر به تغییر در طعم و مزه شیر و کاهش در تولید شیر می‌شود (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). با وجود اقدامات کنترلی بسیاری که تاکنون صورت گرفته، متأسفانه این بیماری هنوز یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین دلایل خسارات اقتصادی در صنایع لبنی به شمار می‌آید. در این تحقیق ۷۵ درصد نمونه‌های مورد بررسی آلوده به پاتوژن‌های محیطی عفونت ورم پستان و ۲۵ درصد فاقد هرگونه آلودگی باکتریایی بودند که بر این اساس بیشترین آلودگی مربوط به باکتری *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و کمترین آلودگی مربوط به *Kocuria marina* با ۲۰ درصد بود. این پژوهش نشان می‌دهد فقط پاتوژن‌های محیطی از عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان در واحدهای شیری اطراف اصفهان می‌باشند. در پژوهش حاضر، ۶۶/۶ درصد از گاوهای به ظاهر سالم مورد مطالعه، مبتلا به آلودگی باکتریایی بودند که نشان می‌دهد همچنان این بیماری یکی از مهم‌ترین چالش‌های موجود در دامداری‌ها است که به طور مستقیم و غیر مستقیم اقتصاد کشاورزان و در نهایت اقتصاد کشور را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین بررسی‌های دقیق‌تر توسط دامپزشکان و همچنین اقدامات لازم به منظور پیشگیری، کنترل و کاهش این عفونت نیز توصیه می‌شود. با توجه به داده‌های به دست آمده بین هر دو گروه مورد مطالعه یعنی گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان و گاوهای به ظاهر سالم از نظر تعداد و تنوع باکتری‌های جداسازی شده تفاوت معناداری وجود دارد. از ۴۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۱۰ نمونه آلوده به عفونت ورم پستان و ۳۰ نمونه از گاوهای به ظاهر سالم بودند. از تمامی ۱۰ نمونه آلوده با فراوانی ۱۰۰ درصد باکتری‌های ایجاد کننده ماستیت جداسازی شدند. از ۳۰ نمونه فاقد علائم، ۶۶/۶ درصد آلوده به باکتری‌های عامل ماستیت بودند و تفاوت معنادار داشتند. از بین سه باکتری جداسازی شده، دو مورد باکتری گرم منفی و تنها یک مورد باکتری گرم مثبت مشاهده شد و این بیانگر آن است که در این مطالعه بیشترین آلودگی مربوط به باکتری‌های گرم منفی بوده است. نتیجه دیگر حاصل از این پژوهش، اولین گزارش از جداسازی و شناسایی

*Kocuria marina* به عنوان مولد ایجاد ورم پستان در گاوهای شیری در ایران و جهان می باشد. امروزه در سراسر جهان، به دلیل اهمیت بسیار چشم گیری که این بیماری دارد مطالعات بسیار گسترده ای در این باره صورت گرفته است. El-Bagory و Zayda (۲۰۱۵) طی مطالعه ای بر روی عفونت ورم پستان، شایع ترین میکروارگانیسم های ایجاد کننده این نوع عفونت را به صورت استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی ۳۴/۴ درصد، *Staphylococcus aureus* ۲۳/۳ درصد، *Escherichia coli* ۱۵/۲ درصد، *Streptococcus uberis* ۹/۴ درصد، *Streptococcus agalactiae* ۷/۴ درصد، *Streptococcus faecalis* ۴/۲ درصد، *Streptococcus disagalactiae* ۳/۲ درصد و *Enterobacter cloacae* ۰/۲ درصد گزارش نمودند که از هر دو نوع پاتوژن های محیطی و واگیردار در ورم پستان محسوب می شوند (El-Bagory & Zayda., 2015). در این مطالعه بیشترین آلودگی مربوط به استافیلوکوکوس ها و کمترین آلودگی مربوط به *Enterobacter cloacae* گزارش شده است. در تحقیق حاضر بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و *Kocuria marina* با ۲۰ درصد گزارش شد که نتایج تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت نداشت. در سال ۲۰۱۴ Saidi و همکاران طی مطالعه بر روی عفونت ورم پستان، موفق به جداسازی ۳۵ گونه *Enterobacteriaceae* شدند که نتایج حاصل از آن به صورت *Escherichia coli* ۱۴/۳ درصد، *Klebsiella oxytoca* ۱۴/۳ درصد، *Enterobacter cloacae* ۱۱/۴ درصد و *Klebsiella ornithinolytica* ۱۱/۴ درصد گزارش شد (Saidi et al., 2014). در این مطالعه تمامی باکتری های جداسازی شده مربوط به باکتری های گرم منفی می باشد و همچنین بیشترین آلودگی مربوط به *Escherichia coli* و *Klebsiella oxytoca* و کمترین آلودگی مربوط به *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella ornithinolytica* گزارش شد که بر خلاف میزان شیوع هر یک از باکتری ها در هر دو مطالعه مورد بررسی، تحقیق حاضر با مطالعه Saidi و همکاران از نظر جداسازی و شناسایی *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* مشابهت نشان داد به طوری که بیشترین آلودگی مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و کمترین آلودگی با ۲۰ درصد مربوط به *Kocuria marina* مشاهده شد. هم چنین در تحقیق حاضر علاوه بر باکتری های گرم منفی، باکتری گرم مثبت هم جداسازی و شناسایی شد که از این نظر با مطالعه Saidi و همکاران مطابقت نداشت. در مطالعه ای توسط Nam و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۸۴۱ نمونه باکتری گرم منفی از عفونت ورم پستان جداسازی شد که شامل *Escherichia coli* ۱۹/۱ درصد، *Pseudomonas fluorescens* ۷ درصد، *Klebsiella pneumoniae* ۶/۷ درصد، *Enterobacter cloacae* ۶/۴ درصد، *Acinetobacter lwoffii* ۶ درصد، *Pseudomonas aeruginosa* ۵/۴ درصد، *Serratia marcescens* ۴/۵ درصد بودند (Nam et al., 2009). در این مطالعه بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Escherichia coli* و *Serratia marcescens* بود که نتایج تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت نداشت به طوری که بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و *Kocuria marina* با ۲۰ درصد گزارش شد. بنهاسن (Benhasen) و همکاران (۲۰۰۳)، اتیابی (Atyabi) و همکاران (۲۰۰۶)، پیپرس (Piepers) و همکاران (۲۰۰۷) و آلمو (Almaw) و همکاران (۲۰۰۸)، استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی را به عنوان شایع ترین

باکتری‌ها در نمونه‌های شیر مورد آزمایش، گزارش نمودند (El-Bagory & Zayda., 2015). نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق حاضر مطابقت نداشت چرا که بیشترین آلودگی در تحقیق حاضر مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد گزارش شد. در مطالعه ای که توسط Burvenich و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت، نشان داده شده است که میزان شیوع ورم پستان ناشی از *Staphylococcus aureus* کاهش پیدا کرده است اما شیوع موارد محیطی از جمله کلی فرم‌ها و *Streptococcus uberis* در حال افزایش است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۱). با توجه به بررسی ۴۰ نمونه شیر در تحقیق حاضر و عدم جداسازی *Staphylococcus aureus* از میان عوامل ایجاد کننده ورم پستان، این احتمال وجود دارد که میزان شیوع این باکتری رو به کاهش می‌باشد و از این لحاظ تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت دارد. Salaki و همکاران در سال ۱۳۹۱، عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان ایلام را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیشتر گاوهای مبتلا، آلوده به *Klebsiella pneumonia* و *Escherichia coli* بودند هم چنین در یکی از گاوداری‌ها، گاو‌ها علاوه بر این باکتری‌ها، به *Streptococcus agalactiae* نیز آلوده بودند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). به طور کلی در این مطالعه بیشترین آلودگی را باکتری‌های کلی فرم باعث شدند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد چرا که در تحقیق حاضر هم بیشترین آلودگی مربوط به *Klebsiella oxytoca* (۵۶/۶) گزارش شد. در مطالعه ای توسط Firouzi و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده شده که همچنان هر دو نوع پاتوژن‌های واگیردار (*Staphylococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae*) و محیطی (*Escherichia coli*) از دام‌های مبتلا به ورم پستان در گاوداری‌های اطراف شیراز جداسازی می‌شوند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق حاضر به دلیل جداسازی هر دو نوع پاتوژن‌های واگیردار و محیطی از دام‌های مبتلا به عفونت ورم پستان در اصفهان، مطابقت نداشت. پژوهش حاضر به علت مصرف بالای فرآورده‌های لبنی توسط انسان بسیار حائز اهمیت است و همچنین باتوجه به شیوع بالای این بیماری در بین گاوهای شیره در گاوداری‌های سراسر جهان و خسارت‌های بسیار زیادی که هم به صنعت دامپروری و هم به انسان به عنوان مصرف کننده وارد می‌شود، اهمیتی دوچندان می‌یابد. در پژوهش حاضر فقط پاتوژن‌های محیطی از نمونه‌های شیر مورد مطالعه جداسازی شدند که این امر نشان دهنده تداوم حضور پاتوژن‌های محیطی از عوامل ایجاد کننده عفونت ورم پستان و عدم درمان کامل و ریشه کن شدن آن‌ها به وسیله درمان‌های رایج از جمله آنتی بیوتیک درمانی است. به دلیل توجه بیش از حد محققان به پاتوژن‌های واگیردار ایجاد کننده ورم پستان و غافل شدن از شیوع پاتوژن‌های محیطی، در سال‌های اخیر شاهد کاهش میزان شیوع ورم پستان ناشی از پاتوژن‌های واگیردار به خصوص *Staphylococcus aureus* و متأسفانه افزایش شیوع موارد محیطی از جمله کلی فرم‌ها بوده ایم. (Burvenich et al., 2003). همچنین با توجه به اینکه شرایط آب و هوایی و اقلیمی هر منطقه ای متفاوت می‌باشد بنابراین نوع پاتوژن‌های جداسازی شده و همچنین میزان آلودگی آن‌ها کاملاً متفاوت است (Shaheen et al., 2016, Burvenich et al., 2003). تحقیق حاضر اولین گزارش از جداسازی *Enterobacter cloacae* به عنوان مولد ایجاد ورم پستان در ایران می‌باشد. هم چنین تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی و

شناسایی *Kocuria marina* از نمونه‌های شیر آلوده صورت نگرفته است و این پژوهش اولین گزارش از جداسازی و شناسایی این باکتری از نمونه‌های شیر آلوده در جهان می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش و هم چنین سایر محققین حاکی از آن است که هم چنان یکی از اصلی‌ترین و مخرب‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت ورم پستان گاوهای شیری در سراسر جهان، عوامل باکتریایی می‌باشند. امید است که با نتایج حاصل از این گونه مطالعات گامی موثر در راستای پیش‌گیری، کاهش خسارات اقتصادی و نیز سلامت انسان برداشته شود.

## سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به خاطر حمایت‌های علمی و تحقیقاتی قدردانی می‌شود.

## منابع

احمدی، م، ر، حق خواه، م، روزی طلب، ج، اشراقی، ح، ر. (۱۳۹۱) مقایسه اثر درمانی پمادهای پستانی سفکوینوم (Cefquinom) و کوباکتان (Cobactan) در درمان تورم پستان بالینی گاوهای شیری. نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، دوره ۶، شماره ۱: صفحه ۱۰-۳

سالکی، خ، مرادی، ح. (۱۳۹۱) بررسی عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان ایلام. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره بیستم، شماره ۴

عزت پناه، ح، مصلحی شاد، م، افشار، ا، وند یوسفی، ج، خدائی، م. (۱۳۸۷) تاثیر سلول‌های سوماتیک بر کیفیت شیر خام و فرآورده‌های شیری. مجله دانش و پژوهش علوم دامی، جلد ۳، صفحه ۹۸-۷۹

Amiri Fahliyani, S., Beheshti-Maal, K., Ghandehari, F. (2018) Novel lytic bacteriophages of *Klebsiella oxytoca* ABG-IAUF-1 as the potential agents for mastitis phage therapy. FEMS Microbiology Letters, 365: 1-8

Basdew, I.H and Laing, M.D. (2011) Mini-Review: Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances A. Méndez-Vilas (Ed.), 1: 368-393

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J. (2003) Severity of *E.coli* mastitis is mainly determined by cow factor. Veterinary Research, 34: 521-564

Castaneda Vazquez, H., Jager, S., Wolter, W., Zschock, M., Castaneda Vazquez, M.A., El-Sayed, A. (2013) Isolated and identification of main mastitis pathogens in Mexico. The journal Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 65: 377-382

El-Bagory, A.M and Zayda, M.G. (2015) Impact of subclinical mastitis on cow's and buffalo's milk quality. 2nd International Conference of Food Safety. Suez Canal University Faculty of Veterinary Medicine Food Hygiene Department. Agu 19 PP:64-72

El-Hamid, M.I.A. (2016) Bovine Mastitis: Current Concepts and Future Control Approaches. Austin Clinical Microbiology, 1: 1-2

- Gomes, F., Saavedra, M.J., Henriques, M. (2016) Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74: 1-7
- Hossein, S.A. (2008) Isolation and identification of bacterial causes of clinical mastitis in cattle in Sulaimania region. *Iraqi Journal of Veterinary Science*, 22: 35-41
- Karima, G.A.H., Grazyna, S., Agnieszka, K.K. (2007) Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*, 25: 58-73
- Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M. (2003) Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science*, 4: 213-224
- Kulkarni, A.G and Kaliwal, B.B. (2013) Bovine mastitis: a review. *International Journal of Recent Scientific Research*, 4: 543-548
- Kvist, L.J. (2016) Diagnostic methods for mastitis in cows are not appropriate for use in humans: commentary. *International Breastfeeding Journal*, 11: 1-3
- Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Kim, J.M., Joo, Y.S., Jung, S.C. (2009) prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of Dairy Science*, 92: 2020-2026.
- Pati, B.K and Mukherjee, R. (2016) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates of bovine mastitis origin and antibiotic sensitivity pattern from Northern Plains of India. *Journal of Veterinary Research and Animal Husbandry*, 1: 1-5
- Preethirani, P.L., Isloor, S., Sundareshaa, S., Nuthanalakshmi, V., Deepthikiran, K., Sinha, A.Y., Rathnamma, D., Nithin Prabhu, K., Sharada, R., Mukkur, T.K., Hegde, N.R. (2015) Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from Bubaline subclinical mastitis in South India. *Plos One*, 10: 1-15.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2584-2589.
- Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R. (2014) Antibiotic susceptibility of *enterobacteriaceae* species isolated from mastitic milk in Algeria. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3: 311-316
- Sanotheran, N., Pagthinathan, M., Nafees, M.S.M. (2016) Prevalence of Bovine Subclinical Mastitis and its Association with Bacteria and Risk Factors in Milking Cows of Batticaloa District in Sri Lanka. *International Journal of Scientific Research and Innovative Technology*, 3: 137-150
- Shaheen, M., Tantary, H.A., Nabi, S.U. (2016) A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. *Journal Advances in Dairy Research*, 4: 1-10
- Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Gomez, M.I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A.J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P., Lee, J.C. (2000) Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 846-850
- Vlieghe, S.D., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H.W. (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95: 1025-1040

---

## Isolation and identification of bovine mastitis bacteria in cow`s dairy in Isfahan

S.Fahliyani<sup>1</sup>, K.Beheshti Maal<sup>2\*</sup>, F.Ghandehari<sup>3</sup>

Received:2018.7.27

Accepted:2019.6.8

### Abstract

Mastitis syndrome is the inflammation of the mammary gland and one of the most common diseases in the livestock industries which is very important clinically and economically. In this study, 40 cows' milk were sampled at cow dairy farms in Isfahan city. The samples were transferred to the laboratory at 4 °C immediately. In order to identify bacterial species, samples were isolated using Brain Hart Infusion agar medium. Then the macroscopic, microscopic and biochemical characteristics were studied. Finally, the polymerase chain reaction was performed to determine the exact Spp.of isolates. This research showed that the contamination of the 30 samples out of 40 were *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* and *Kocuria marina*. The highest and lowest infections were respectively to *Klebsiella oxytoca* and *Kocuria marina* with the frequency of 56.6% and 20% respectively. Due to the large number of infected samples, mastitis is one of the most destructive diseases in livestock industry and its treatment costs high expense for humans.

**Keywords:** Bovine mastitis, Mastitis, Cow`s dairy, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Kocuria marina*

---

1- M.S.c of sciences, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2-Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

\*(corresponding author: beheshtimaal@iaufala.ac.ir )

3-Asistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

## مطالعه بیوسیستماتیک قورباغه مردابی (*Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)

### در زیستگاه‌های تالابی الشتر (استان لرستان)

اشرف جزایری<sup>۱</sup>، فروغ پاپهن<sup>۲</sup>، اسماء حاتمی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۸

## چکیده

قورباغه مردابی (*pelophylax ridibundus*) تنها گونه از جنس *Pelophylax* است که تقریباً در همه نواحی ایران پراکنش دارد. مطالعه حاضر در ۳ ایستگاه تالابی شهرستان الشتر در استان لرستان و با هدف مطالعه ریخت شناسی، ریخت سنجی ویژگی‌های تولید مثلی، کاربیلوژی و مطالعه بافتی پوست انجام شد و تعداد ۱۶۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۳ ریخت در سطح تالاب‌های مورد بررسی شناسایی گردید. در بخش تحلیل صفات کمی، دو جنس از نظر وزن و قطر ران تفاوت معنی داری نداشتند در حالیکه در صفت طول کل متفاوت بودند. بیشترین شاخص تولید مثلی در هر دو جنس در فصل بهار اندازه گیری شد بعلاوه وزن حداکثر رسیدگی برای نرها به میزان ۶۴/۱۲ و برای ماده ها ۸۳/۹ گرم محاسبه گردید. عدد کروموزومی گونه در مناطق مورد مطالعه  $2n=26$  بود بعلاوه کروموزوم‌های هترومورف جنسی مشاهده گردید. ساختار پوست در تمامی ایستگاه‌ها مشابه و شامل دو لایه اپیدرم و درم بود، در لایه اسفنجی درم در هر دو جنس غدد موکوسی و گرانولار مشاهده گردید و پوست سطح شکمی به علت نازکتر بودن رشته‌های کلاژنی از پوست سطح پشتی متمایز بود.

**واژه های کلیدی:** بیوسیستماتیک جانوری، دوزیستان بی دم، قورباغه مردابی، تالاب، لرستان

## مقدمه

دوزیستان بی دم بزرگ‌ترین نماینده دوزیستان امروزی هستند که پیشینه آن‌ها به دوران ژوراسیک در ۱۵۰ میلیون سال قبل می‌رسد (Morrison & Hero., 2003). در حال حاضر از ۷۶۴۸ گونه شناخته شده از دوزیستان، ۶۷۳۶ گونه از آن‌ها متعلق به دوزیستان بی دم می‌باشد. (ابراهیم نژاد، ۱۳۸۵). از بین خانواده Ranidae، جنس *Pelophylax* تنها یک گونه به نام *Pelophylax ridibundus* در ایران وجود دارد. این گونه برای اولین بار توسط پالاس در سال ۱۷۷۱ از سواحل شمالی دریای خزر و رودخانه ولگا ثبت شده است، اما به دلیل وضعیت تبارش نام آن از جنس *Rana* تغییر یافت و در جنس *Pelophylax* قرار گرفت، با این حال هردو نام همچنان استفاده می‌شود (Mohammadi et al., 2015)

۱ - استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
\* (نویسنده مسئول: jazayeriashraf@gmail.com)

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

۳ - دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

در این گونه پشت بدن سبز تا زیتونی و قهوه‌ای تیره همراه با تعداد کم و بیش لکه‌های تیره یا سبز تیره است، گاهی دارای یک نوار طولی روشن در طول پشت بدن می‌باشد، طی فصل تولیدمثل اولین انگشت اندام‌های جلویی در نرها دارای قسمت متورم خاکستری رنگ می‌باشد و معمولا در آب‌های آرام کناره رودهایی که بیش‌تر با درختان بید و جگن احاطه شده حضور دارد این گونه، حرکات زیگزاکی بسیار سریعی درون آب دارد و طی زمستان در زیر گل‌ولای مخفی می‌شود سپس سوخت‌وساز بدن را کاهش داده و بدین طریق از شرایط نامطلوب عبور می‌کند. (بلوچ و کمی، ۱۳۸۵) فصل تولیدمثل آن‌ها از اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت‌ماه شروع می‌شود، از آنجایی که فصل تولیدمثل دوزیستان بی‌دم با یکدیگر هم‌پوشانی دارد، بدیهی است تفاوت در رفتارهای جفت‌گیری منجر به جدایی تولیدمثلی بین گونه‌ها می‌شود، یکی از این رفتارها محرک‌های صوتی هستند. (نجیب زاده و همکاران، ۱۳۹۳)

در قورباغه مردابی عموماً نرها زودتر از ماده‌ها به آبگیرها می‌رسند و محدوده جفت‌گیری خود را مشخص می‌کنند، جفت‌گیری و تخم‌گذاری در آب راکد انجام می‌پذیرد و تخم‌ها پس از حداکثر سه هفته به‌صورت لاروهای دم‌دار با ۵ میلی‌متر طول و ظاهری مانند ماهی‌های کوچک ظاهر می‌شوند. (نجیب زاده و همکاران، ۱۳۹۳) طی دگردیسی تغییرات خاصی در زنجیره کربوهیدرات روده کوچک، کبد و دم رخ می‌دهد که می‌تواند نشانه‌هایی از برخی وقایع سلولی مانند تمایز آن‌ها باشد (میرزاجانی و همکاران، ۱۳۸۳). در لارو قورباغه مردابی دهان به‌صورت شکمی است، از این‌رو هرگونه تغییر در اندازه و شکل دیسک دهانی، شکل فک و تعداد ردیف دندان‌ها از ویژگی‌های مهم در شناسایی گونه هستند (مولوی و همکاران، ۱۳۹۲) بسیاری از گونه‌های در معرض خطر در چرخه حیاتی خود از تالاب‌ها بهره می‌جویند، این امر نقش ویژه تالاب‌ها را در بقا گونه‌های بی‌شمار از جمله دوزیستان مشخص می‌سازد. (ایافت و همکاران، ۱۳۸۹)

بدن مرطوب دوزیستان محل مناسبی برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌هاست ولی مواد مترشحه از پوست این جانور تا حد زیادی از رشد چنین میکروارگانیسم‌هایی جلوگیری می‌نمایند. اهمیت پوست به جهت انجام تنفس پوستی در دوزیستان قابل توجه است از این حیث ساختار پوست و لایه بندی آن، وجود شبکه مویرگی گسترده و نیز حضور غدد موکوسی و سروزی در پوست از ویژگی‌های این دوزیستان به‌شمار می‌رود. (بلوچ و کمی، ۱۳۸۵) شرایط اقلیمی، وضعیت زیستگاهی، و آلاینده‌های زیست محیطی می‌توانند به‌طور مستقیم بر ساختار پوست دوزیستان موثر باشند. مطالعه و بررسی ویژگی‌های پوست دوزیستان از مهم‌ترین صفات لازم جهت تشخیص و تعیین طبقات مختلف آن‌ها در علم طبقه‌بندی می‌باشد (Azevedo et al., 2006).



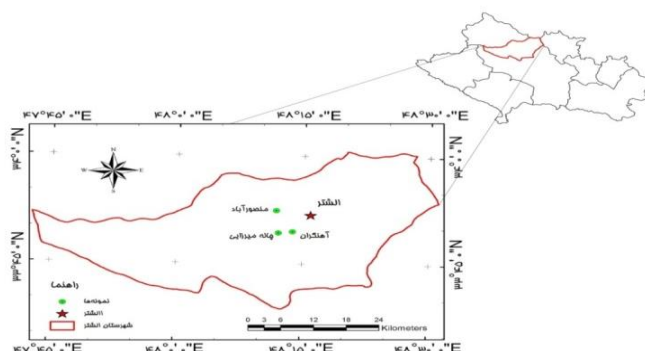
## مواد و روش‌ها

شهرستان الشتر از نظر جغرافیایی در ۴۸ درجه و ۱۵ دقیقه طول شرقی و ۳۱ درجه و ۵۱ دقیقه طول عرض شمالی قرار دارد، ارتفاع آن از سطح دریا ۱۶۰۰ متر بوده و دارای آب و هوای معتدل است. فاصله این شهرستان از مرکز استان یعنی خرم آباد ۴۵ کیلومتر است.

الشتر با دشتی سرسبز و خرم و زمین‌های حاصلخیز که به وسیله کوه‌های نسبتاً مرتفع در تمام جهات احاطه شده در شمالی‌ترین قسمت استان لرستان واقع گردیده است. دارای آب و هوای معتدل مرطوب با زمستان‌های سرد است شهرستان الشتر به لحاظ فون جانوری و فلور گیاهی منطقه‌ای بکر و دست نخورده است که مطالعات اکولوژیکی و زیست شناختی در بسیاری از جنبه‌های آن صورت نگرفته است. (پناهی و همکاران، ۱۳۹۱) این منطقه اکوسیستم‌های آبی متعددی از قبیل رودهای دائمی و فصلی، تالاب‌های آب شیرین، برکه و آبگیرهای فصلی متعدد دارد، بر این اساس اکوسیستم‌های بالقوه مناسبی جهت حضور دوزیستان فراهم دارد (محمودی و همکاران، ۱۳۹۲). در این مطالعه ۳ ایستگاه بر اساس شرایط اکولوژیکی، زیست‌گاهی و وفور نمونه‌ها انتخاب شدند. هر ۳ ایستگاه انتخاب شده از مناطق تالابی الشتر بودند. (جدول ۱ - شکل ۱)

جدول ۱: مختصات ایستگاه‌های مورد مطالعه

نام ایستگاه	مختصات	موقعیت جغرافیایی
تالاب آهنگران	عرض شمالی ۳۳° ۴۹' طول شرقی ۴۸° ۱۳'	جنوب غرب شهرستان الشتر
تالاب منصور آباد	عرض شمالی ۳۳° ۵۲' طول شرقی ۴۸° ۱۱'	شمال غرب شهرستان الشتر
تالاب چاله	عرض شمالی ۳۳° ۴۹' طول شرقی ۴۸° ۱۲'	جنوب غرب شهرستان الشتر



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه

نمونه برداری طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ انجام شد. تعداد ۱۶۰ نمونه از ۳ ایستگاه به وسیله تور دسته بلند صید و به صورت زنده، در ظروف پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند و در آزمایشگاه برای مطالعات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، تولیدمثلی و هیستولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی چند ریختی رنگی، کلیه نمونه‌های صید شده از نظر رنگ‌آمیزی بدن، نحوه آرایش لکه‌ها و نوارهای تیره، هم‌چنین نوار طولی روشن بررسی و ریخت‌های مختلف شناسایی و عکسبرداری شد، بعلاوه ویژگی‌های توصیفی هر نمونه به صورت مکتوب ثبت گردید. در بخش ریخت‌سنجی صفات شاخص که در شناسایی گونه مورد نظر حائز اهمیت هستند از جمله: وزن، طول کل، قطر و طول ران، فاصله نوستریلها، اندازه سر و طول بازو بوسیله کولیس دیجیتال و ترازوی حساس اندازه‌گیری شد (بلوچ، ۱۳۸۵).

به‌منظور بررسی ویژگی‌های تولیدمثلی، ابتدا نمونه‌های نر از ماده تفکیک شد، بدین منظور از کیسه تشدید صوت سیاه رنگ و نیز وجود زائده خاکستری رنگ بر روی اولین انگشت پاهای جلویی در نرهای بالغ استفاده شد، سپس نمونه‌ها به‌وسیله کلروفرم کشته و تشریح شد. در نرها پس از جداسازی و توزین بیضه‌ها شاخص گنادی و برای نمونه‌های ماده نیز پس از تخلیه کل بافت تخمدانی میزان، هم‌آوری بر اساس روشهای مرسوم محاسبه شد (ابراهیم نژاد، ۱۳۸۵). با توجه به اینکه سیگنالهای صوتی در فصل تولید مثل یکی از موارد جدایی تولیدمثلی و جفت‌گیری هستند (درویش، ۱۳۸۹)، بنابراین اصوات نرها طی فصل بهار از ۳ ایستگاه تالابی الشتر ثبت و سپس به‌وسیله دستگاه صوت‌سنج شدت اصوات اندازه‌گیری شد.

برای مطالعه ساختاری پوستی از تعداد ۱۰ نمونه بالغ نر و ماده استفاده شد بدین ترتیب که از پوست سطح پشتی و شکمی هر قورباغه، نمونه‌هایی به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر برداشته و به فیکساتور منتقل گردید (فرمالین ۱۰ درصد) سپس بر اساس روشهای متداول، بلوک‌های پارافینی بافتی تهیه و به‌وسیله میکروتوم برش‌های به ضخامت ۵ میکرون داده شدند از اسلایدهای مناسب پس از رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین-انوزین) به‌وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس‌برداری انجام شد سپس تحلیل کیفی بافت پوست به کمک تصاویر صورت گرفت (پاپهن و همکاران، ۱۳۹۵). در مطالعات کاربولوژیکی، از محلول کلشی سین با غلظت (۰.۲٪) با دوز تزریقی ۰/۱ ml به ازای هر گرم وزن بدن به صورت درون صفاقی استفاده شد. پس از ۷ ساعت، نمونه تشریح و بافت مغز استخوان ران به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار هیپوتونیک (کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار) قرار گرفت. سپس با افزودن فیکساتور تازه (اسید استیک / اتانول به نسبت ۳/۱) سانتریفوژ با شرایط ۱۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. رسوبات حاصل برای دو بار دیگر با فیکساتور شستشو و سانتریفوژ گردید. لام‌گیری به روش پرتابی روی لامهای تمیز و سرد و رنگ‌آمیزی با گیمسای ۵ درصد انجام شد. از پلاک‌های متافازی عکسبرداری شد و برای اندازه‌گیری کروموزوم‌ها از محیط نرم افزاری (image.g & karyo vision) استفاده گردید.

## نتایج

در تالاب‌های مورد بررسی در مجموع، سه ریخت مشاهده گردید، ریخت‌های ۲ و ۳ در هر سه تالاب تحت مطالعه حضور داشتند در حالیکه ریخت شماره ۱ صرفاً در ایستگاه تالاب آهنگران مشاهده شد. بعلاوه آزمون مستقل بودن جنسیت از ریخت نشان داد که ریخت سنخ و جنسیت قورباغه مستقل از هم هستند.

### ریخت ۱

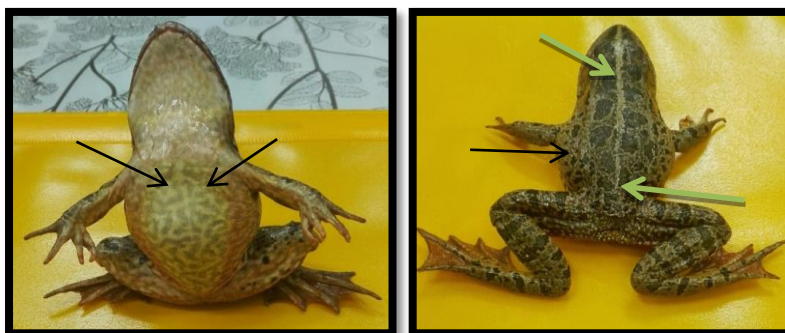
این ریخت دارای خال‌های زیادی با زمینه تیره مایل به قهوه‌ای می‌باشد که سطح پشتی و فضای بین چشم‌ها را نیز می‌پوشاند، در پهلوها نیز خال‌ها قابل مشاهده هستند، رنگ زمینه سطح پشتی سبز تا سبز زیتونی است. شکم شیری رنگ و تقریباً بدون خال بوده، پاها دارای نوارهای تیره و دست‌ها دارای لکه‌های تیره می‌باشد. (شکل ۲)



شکل ۲: نمایی از سطح پشتی ریخت ۱

### ریخت ۲

خال‌های زیتونی تیره در این ریخت به صورت تقریباً موازی در سطح پشتی بدن واقع شده‌اند که به وسیله یک نوار جداکننده نازک از هم جدا می‌شوند، نوار تا انتهای کمر (ناحیه لگنی) امتداد یافته و به مخرج نرسیده است. در این ریخت پهلوها دارای لکه‌های کوچک‌تر و رنگ زمینه روشن‌تر می‌باشند، سطح شکم به رنگ سفید کدر بوده و دارای لکه‌های سیاه می‌باشد. نوارهای تیره نیز در سراسر پاها و به مقدار کم‌تر در دست‌ها قابل رؤیت هستند. (شکل ۳)



شکل ۳: نمایی از سطح پشتی و شکمی ریخت ۲

## ریخت ۳

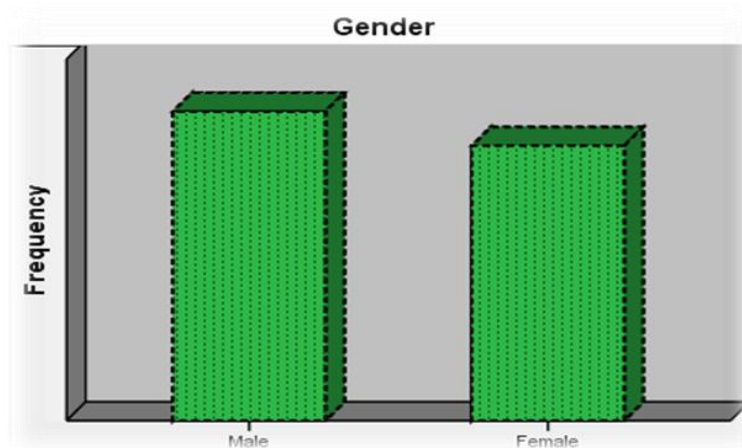
در این ریخت نوار روشن زرد رنگ بسیار مشخص از نوک پوزه تا مخرج امتداد می‌یابد. رنگ زمینه سطح پشتی زیتونی بوده و دارای لکه‌های بزرگ قهوه‌ای است که تقریباً موازی در دو سمت نوار طولی روشن می‌باشند. پاها از ابتدای اتصال به بدن (از کشاله ران) تا نوک انگشتان دارای نوارهای تیره می‌باشند و در دست‌ها (از بازوها تا مچ) نیز لکه‌های تیره قابل رؤیت می‌باشند. (شکل ۴)



شکل ۴: نمایی از سطح پشتی ریخت ۳

آزمون آماری بر روی صفات مورفومتریک (با کمک نرم‌افزار SPSS<sub>23</sub>) نتایج ذیل را نشان داد. در ابتدا فراوانی

بر اساس تعداد نمونه‌ها به تفکیک جنسی محاسبه گردید. (شکل ۵)



شکل ۵: نسبت فراوانی جنسی

بر اساس سطح معناداری آزمون لوین و سطح معناداری شاخص  $t$  ( $p < 0.05$ ) و باتوجه به اینکه میانگین نمره جنس ماده (۷۴/۵۷) از میانگین جنس نر (۶۶/۷۵) بیشتر بود، دو جنس فقط از نظر طول کل با هم متفاوت بودند. بررسی بیشتر در مورد تفاوت بین جنسیت طی فصول، نشان داد که این تفاوت فقط در فصل بهار معنی دار بود. بعلاوه در مقایسه‌ی، فاصله بین

نوستریل‌ها، برآمدگی داخلی، اندازه سر و طول بازو تفاوت معناداری وجود نداشت. هم‌چنین هر دو جنس در وزن کل یکسان بودند و یکسان بودن قطر ران در هر دو جنس نشان داد که هر دو جنس از توانایی یکسانی برای جهیدن برخوردار بودند. (جدول

(۲)

جدول ۲: نتایج آزمون مقایسه میانگین صفات

متغیر	شاخص لوین (F)	سطح معنی‌داری (P)	شاخص (T)	سطح معنی‌داری (P)
فصل	۰/۲۹	۰/۵۸	-۰/۲۷	۰/۷۸
وزن (W)	۸/۴۷	۰/۰۰۵	-۱/۳۸	۰/۱۷
طول کل (TL)	۰/۷۶	۰/۳۸	-۲/۱۶	۰/۰۳۵
طول ران (FL)	۰/۰۰۵	۰/۹۴	-۲/۴۰	۰/۰۲
قطر ران (F.th)	۰/۲۱	۰/۶۴	-۰/۵۴	۰/۵۸
فاصله نوستریل‌ها (D.n)	۰/۴۶	۰/۴۹	۰/۷۳	۰/۴۶
برآمدگی داخلی (C.int)	۰/۴۰	۰/۵۳	-۱/۳۹	۰/۱۷
اندازه سر (H.s)	۲/۵۱	۰/۱۱	۰/۱۶	۰/۸۷
طول بازو (L.a)	۳/۴۱	۰/۰۷	۱/۴۰	۰/۱۶

در مطالعه ویژگی‌های تولید مثلی، پس از محاسبه شاخص گنادی نرها و هم‌آوری در ماده‌ها، وزن حداکثر رسیدگی نمونه‌ها به تفکیک جنسیت تعیین شد (جدول ۳). از آنجایی که سطح معنی‌داری آزمون لوین کوچکتر از ۰/۰۵ می‌باشد، واریانس و پراکندگی داده‌ها در دو جنس مختلف متفاوت بود. بعلاوه سطح معنی‌داری شاخص  $t$  (۰/۰۵)  $p <$ ، نشان‌دهنده تفاوت بین متغیرها بود. به عبارت دیگر بین دو جنس از نظر شاخص‌های جنسی تفاوت وجود داشت، هم‌چنین بر مبنای میانگین به‌دست آمده پراکندگی داده‌ها در جنس ماده بیشتر بود. (جدول ۴)

جدول ۳: بیشترین توان تولید مثلی مطابق با وزن کل، به تفکیک جنسیت و فصل

جنسیت	وزن کل	شاخص گنادی / هم‌آوری	فصل
نر	۶۴/۱۲	۱/۴۳	بهار
ماده	۸۳/۹	۹۴۰۵	بهار

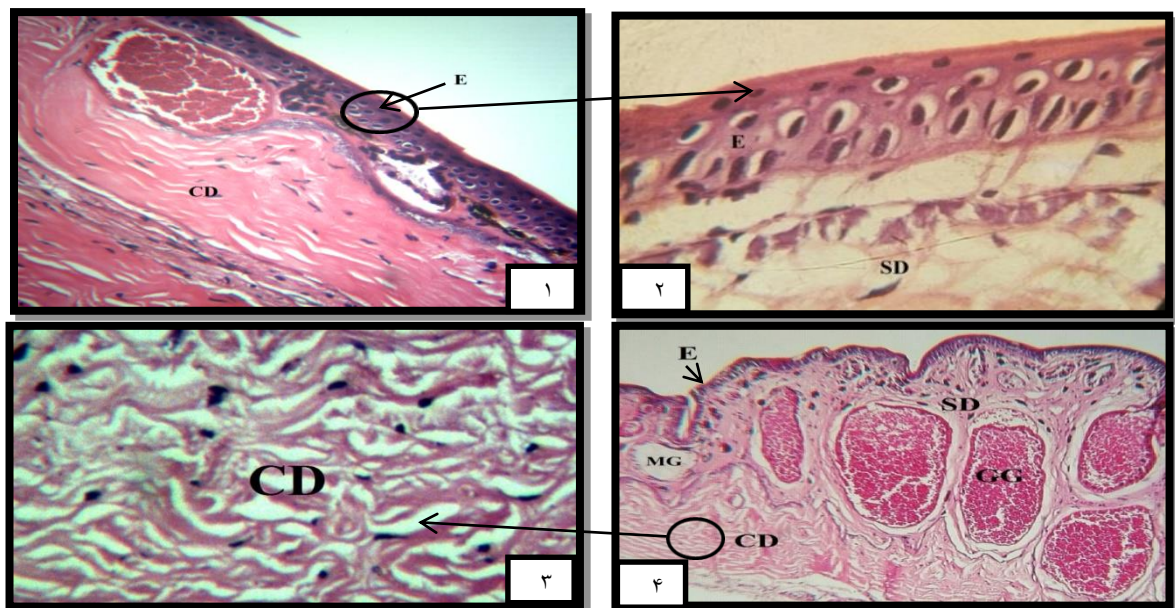
جدول ۴: تفاوت جنسیت در شاخص‌های جنسی

متغیر	شاخص لوین (F)	سطح معنی‌داری (P)	شاخص t	سطح معنی‌داری (P)
G.F	۲۹/۱۴	۰/۰۰	-۷/۸۸	۰/۰۰

تحلیل اصوات ضبط شده از جمعیت گونه‌ای در فصل تولید مثل نشان داد که، میانگین شدت اصوات تولیدی ۹۴ دسی بل و دامنه شدت اصوات بین حداقل ۴۸ تا حداکثر ۱۴۰ دسی بل بود. چون در زمان ضبط صدا امکان تشخیص جنسیت وجود نداشت از مقایسه شدت اصوات در دو جنس صرف نظر گردید. مطالعه پوست نواحی پشتی و شکمی قورباغه‌های نر و ماده در

هر سه ایستگاه نشان داد که پوست بدن آنها از دو طبقه اپیدرم و درم تشکیل شده است (شکل‌های ۶-۱ و ۶-۲). اپیدرم پوست در نواحی پشتی و شکمی یک اپی‌تلیوم سنگفرشی مطابق کراتینی است که از غشاء پایه به طرف سطح پوست از ۴ تا ۵ لایه سلولی تشکیل شده و توسط لایه نازک کراتینی پوشیده شده است. لایه درم پوست از نظر ساختار بافتی از دو قسمت تشکیل شده است: طبقه اسفنجی زیر اپیدرم که از یک بافت همبند سست حاوی عروق خونی و غدد پوستی تشکیل شده است و طبقه متراکم بلافاصله زیر طبقه اسفنجی که یک بافت همبند سخت حاوی دستجات ضخیم و متراکم رشته‌های کلاژنی می باشد (شکل ۶-۲).

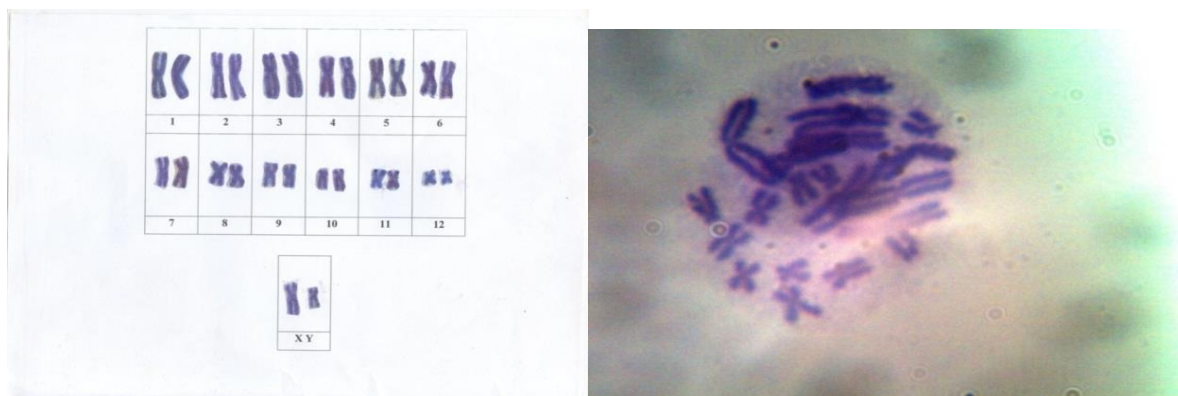
در طبقه اسفنجی درم دو نوع غده مشاهده شد، غدد کوچک موکوسی و دیگری غدد بزرگ گرانولار پوست، غدد موکوسی غددی حبابی شکل و در مقاطع میکروسکوپی عاری از ترشحات بودند در مجاورت اپیدرم پوست مشاهده شدند (شکل ۶-۳). غدد گرانولار حبابی شکل و حاوی ترشحات اسیدوفیل بودند و در فاصله دورتری از اپیدرم درون طبقه اسفنجی حضور داشتند (شکل ۶-۴). بعلاوه رشته‌های کلاژن در سطح شکمی نازک‌تر از سطح پشتی بود و هیچ تفاوتی در ساختار بافتی پوست قورباغه های ساکن زیستگاه‌های سه‌گانه مشاهده نشد.



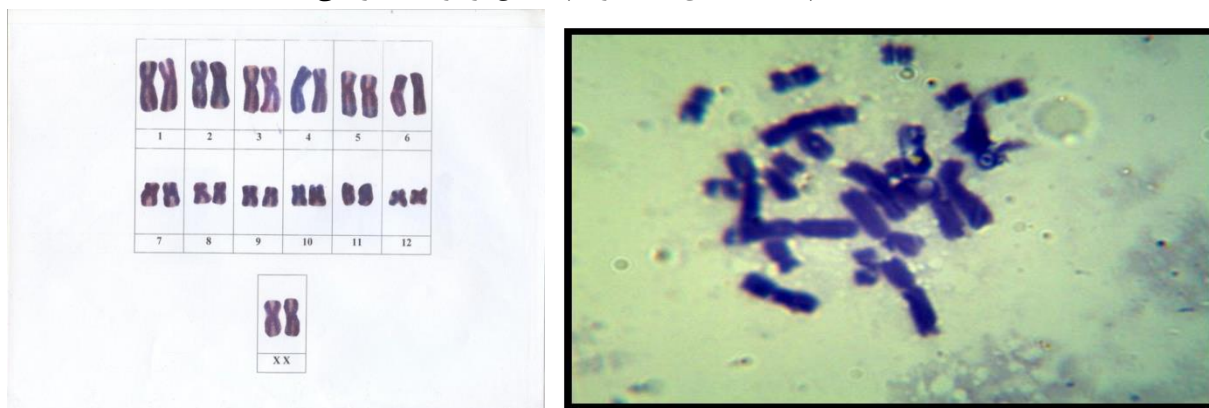
شکل ۶: تصاویر میکروسکوپی نواحی پشتی و شکمی بدن قورباغه‌های نر و ماده نواحی شمالی

۱، ۲- مقطع بافتی پوست شکمی قورباغه ماده، اپیدرم یک اپیتلیوم سنگفرشی شاخی است و توسط غشاء پایه (پیکان‌ها) به درم اسفنجی متصل شده است. رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی 40X-۳، ۴- مقطع بافتی پوست پشتی قورباغه نر، E: اپیدرم، SD: درم اسفنجی، GG: غده گرانولار، MG: غده موکوسی، D: درم متراکم. رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی 40X

بر اساس نتایج این تحقیق، عدد کروموزومی این گونه شناسایی شده قورباغه مردابی به صورت  $2n=26$  و عدد هاپلوئید  $n=13$  مشاهده شد. تعداد بازوهای کروموزومی  $NF=52$  بود، کروموزومها بر اساس محل استقرار سانترومر در دو گروه متاسانتریک و ساب متاسانتریک تقسیم بندی شدند به این ترتیب که ۵ جفت متاسانتریک و ۷ جفت ساب متاسانتریک بودند. جفت کروموزومهای شماره ۱، ۵، ۶، ۸، ۱۱ از نوع متاسانتریک و جفت کروموزومهای ۲، ۳، ۴، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ از نوع ساب متاسانتریک بودند. کروموزومهای جنسی در افراد نر به صورت XY و در افراد ماده به صورت XX مشاهده گردید. کروموزومهای جنسی X از نظر سایز و اندازه در گروه ۶ و کروموزوم جنسی Y از نظر سایز در گروه ۹ قرار داشت. به علاوه کروموزوم X و Y هر دو در گروه کروموزومهای ساب متاسانتریک طبقه بندی شدند. بزرگترین کروموزوم این گونه دارای طول کل  $15/88$  میکرومتر بود، طول نسبی کروموزومهای این گونه بین حداقل  $2/02$  میکرومتر و حداکثر  $13/57$  میکرومتر متغیر بود. حداکثر شاخص سانترومری مشاهده شده در کروموزومهای این گونه  $0/56$  محاسبه گردید. با توجه به اینکه در این مطالعه از بافت‌های مختلفی از جمله مغز استخوان و طحال در هر دو جنس و بیضه در نرها جهت تهیه کاریوتیپ استفاده شد، نتایج نشان داد که استفاده از مغز استخوان در هر دو جنس نتایج بهتری داشت. در اسلایدهای طحال و بیضه، پلاک متافازی مناسب به ندرت مشاهده شد. (شکل‌های ۷ و ۸)

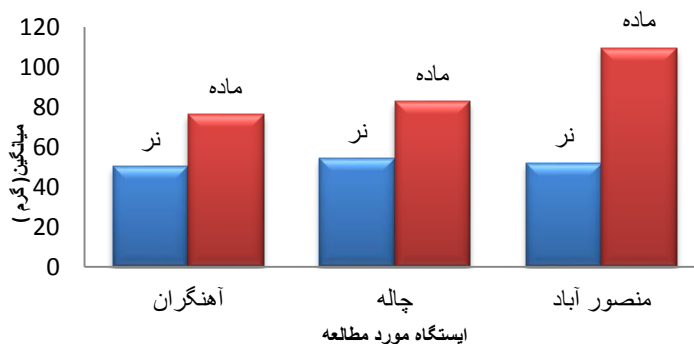


شکل ۷ - پلاک متافازی و کاریوتیپ جنس نر قورباغه مردابی



شکل ۸: پلاک متافازی و کاریوتیپ جنس ماده قورباغه مردابی

برای بررسی رابطه جنسیت با صفات شاخص مورفومتریک در هر ایستگاه از آزمون T-test استفاده شد. در دو ایستگاه آهنگران و چاله به جز صفت فاصله نوستریلها بین سایر صفات و جنسیت تفاوت معنی دار مشاهده شد در حالیکه در ایستگاه منصور آباد بین همه صفات و جنسیت تفاوت معنی دار وجود داشت. ( $p < 0.05$ ). (شکل ۹)



شکل ۹: مقایسه میانگین وزن در ۳ ایستگاه مورد مطالعه

## بحث

دوزیستان امروزی بخشی از نتایج پروسه تکاملی و تنوع زندگی بر روی زمین هستند (درویش، ۱۳۸۹). چنین موجوداتی طی قرن بیستم که جهان یک انفجار تکنولوژی و صنعتی بی سابقه را تجربه کرده است متحمل پیامدهای منفی متعددی شده‌اند. تخریب زیستگاهها، حضور گونه‌های غیربومی، بهره‌برداری بیش از حد از گونه‌ها، تغییرات اقلیمی، اثرات سمی سموم و آفت کشها اثرات چشمگیری بر میزان باروری و در نهایت بقای جمعیت‌های گونه ای می‌گذارد (Tennessen *et al.*, 2014). تغییرات موجود در بیوتوپها و تنش‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی که به اکوسیستم‌ها وارد می‌شود پاسخ دوزیستان به چنین شرایطی را دربر دارد که طی آن تغییراتی در خصوصیات فردی و جمعیت گونه‌ای مشاهده می‌شود. گونه‌های تخصص یافته به علت وابستگی شدید به زیستگاه اغلب آسیب پذیرتر هستند، ظرفیت‌های چنین زیستگاهی باید به گونه‌ای باشد که جواب‌گوی موقعیت حساس تولید مثل گونه به واسطه مرگومیر لاروی باتوجه به حساسیت زیستگاه باشد (Shaffer *et al.*, 2015).

در ارتباط با چندرخی رنگی با توجه به مطالعات صورت گرفته، در دوزیستان بی‌دم مواردی از تکامل همگرا و وجود پلی‌مورفیسم‌های یکسان در گونه‌های نزدیک مشاهده می‌شود که این مهم در مشاهدات غیر تصادفی قابل مشاهده است، این در حالی است که طی مشاهدات صورت گرفته دو قورباغه مردابی هم‌شکل را به سختی می‌توان در کنار هم یافت، بنابراین پلی‌مورفیسم‌های دوزیستان بی‌دم یک سیستم غنی اما عمدتاً بهره‌برداری نشده برای مطالعات تکامل تنوع فنوتیپی رنگی در طبیعت است (Hoffman & Blouin., 2000). در جمعیت قورباغه‌ها پلی‌مورفیسم رنگ به ارتباط برخی از



صفات جمعیت شناختی مانند طول عمر و مهاجرت وابسته است، هم‌چنین ثبات پلی‌مورفیسم درون جمعیت توسط مکانیسم‌های زیست‌محیطی از جمله ساختار فضایی و سنی جمعیت تعیین می‌شود (Ishchenko., 2014). از طرفی احتمال می‌رود بین فرکانس رنگ و رژیم غذایی، هم‌چنین میزان شوری آب روابطی موجود باشد، این درحالی است که اگرچه ممکن است چندریختی رنگی یک زمینه‌ی ژنتیکی داشته باشد، اما تنوع رنگ در مقیاس منطقه‌ای در ارتباط با عوامل کنترل‌کننده زیست‌محیطی می‌باشد (Harley *et al.*, 2006). به این ترتیب احتمال دارد که تغییرات رنگی مشاهده شده در جمعیت این گونه به دلیل تغییرات زیستگاهی و تأثیر محیط بر افراد جمعیت‌ها باشد. مطالعه چندریختی رنگی برای قورباغه‌مردابی در استان گلستان توسط (Pesarakloo *et al.*, 2017) نیز بیانگر وجود چند ریختی رنگی در این گونه بوده است.

فعالیت‌های تولیدمثلی در دوزیستان به شدت به تغییرات اقلیمی وابسته است این امر نشان از نقش شرایط اکولوژیکی در فرآیند تولیدمثل دوزیستان دارد. (نجیب زاده و همکاران، ۱۳۹۳) عادات و رفتارهای جفت‌گیری، به‌همراه زمان و مکان تخم‌ریزی در گونه‌های هم‌جا نقش مهم و تأثیرگذاری در یک تولیدمثل موفق دارد (درویش، ۱۳۸۹). مطالعات صورت گرفته در ارتباط با تولیدمثل قورباغه‌مردابی در تالاب انزلی نشان داد؛ جفت‌گیری و تخم‌ریزی این گونه در نقاط مختلف تالاب و بسته به شرایط اکولوژیکی از نیمه اسفند تا اواسط مرداد ادامه می‌یابد (میرزاجانی و همکاران، ۱۳۸۳) (در جمعیتی از قورباغه‌های تایوان که جنس نر دارای اندازه بدن و سر بزرگ‌تر نسبت به جنس ماده است، جفت‌گیری موفق به‌طور غیرمستقیم از طریق الگوی جنبش فضایی وابسته به اندازه رخ می‌دهد و این نشان از نقش انتخاب طبیعی در فعالیت‌های تولیدمثلی است) (Tsuji., 2004). قدرت جنسی زیاد نرها یا ماده‌ها معمولاً معرف قدرت زیستی عمومی زیاد، شرایط تغذیه‌ای خوب و کنش متعادل همه روندهای فیزیولوژیک است و به‌دنبال آن موفقیت‌های تولیدمثلی حاصل قدرت زیستی عمومی است. برعکس این روند، سایر موفقیت‌ها منوط به خواص ویژه‌ای است که ارتباط اندکی با قدرت زیستی عمومی دارد، در این صورت پراکندگی یک ژنوتیپ در جمعیت نه به‌خاطر برتری کلی آن بلکه بدان خاطر است که مولد بهتری نیز می‌تواند باشد (درویش، ۱۳۸۹).

پوست دوزیستان در معرض دگرگونی‌های سازشی مختلفی قرار گرفته است و از لحاظ تنفسی و حفاظت بدن دارای اهمیت زیادی است. پوست به‌وسیله غدد موکوسی فراوانی که دارد نرم و مرطوب نگه داشته می‌شود، در دوزیستان بی‌دم ترشح موکوس باعث لزجی پوست بدن می‌گردد. (Lind & Johanson., 2007). بیش‌تر دوزیستان علاوه بر غدد موکوسی دارای غدد دانه‌دار نیز هستند اگرچه هر دو نوع غده از بسیاری لحاظ کاملاً شبیه یکدیگرند، اما غدد دانه‌دار مواد مضر یا سمی ترشح می‌کنند که باعث حفاظت جانور در مقابل دشمن می‌گردد، غده‌های مزبور به‌صورت کیسه‌های کروی هستند که دیواره آن‌ها خاصیت ترش‌چی دارد. (ابراهیم نژاد، ۱۳۸۵) مقایسه نتایج بررسی پوست سطح پشتی و شکمی

پژوهش حاضر با مناطق دیگر کشور نشان داد، از نظر هیستولوژیکی اختلافی وجود نداشت. (پاپهن و همکاران، ۱۳۹۵) در حالیکه تفاوت‌های مشاهده شده مربوط به ویژگی‌های هیستومتریکی بود که بار دیگر اثرات عوامل محیطی و اکولوژیکی را نشان می‌دهد. باتوجه به پژوهش حاضر به نظر می‌رسد بر اساس تنوع شرایط محیطی، فنوتیپ‌های مختلف بتوانند با شرایط محیطی سازش یابند و به دنبال آن میزان ارزش‌گزینشی یک فنوتیپ توسط تعداد محیط‌های فیزیک و بیوتیک که فنوتیپ مفروض می‌تواند در آن زندگی کند، تعیین می‌شود. ژنی مفروض در بعضی شرایط باعث دخالت منفی در ارزش‌سازی می‌شود. هرگاه در شرایط دیگر، دخالت آن مثبت باشد نگهداری می‌شود همین ظرفیت چندگانه، شانس نگهداری یک ژن را در گنجینه ژنی افزایش می‌دهد یا حداقل، حذف آن را به تأخیر می‌اندازد (درویش، ۱۳۸۹).

مطالعات کروموزومی بر روی دوزیستان در سال ۱۹۳۲ بر روی گونه‌هایی از وزغ با استفاده از بافتهای میتوزی آغاز شد. در تحقیقات مشابه بر روی گونه *Pelophylax ridibundus* رایج‌ترین عدد کروموزومی گزارش شده  $2n=26$  بوده است به علاوه وجود کروموزوم‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در مطالعات مشابه تایید شده است. از جمله مطالعه‌ای که بر روی قورباغه مردابی اهواز و شهرکرد صورت گرفت (Jazayeri et al., 2012) و مطالعه‌ای که در عربستان سعودی انجام شد (Al-Shehri & Alsaleh., 2005).

مشاهده تنوع عدد کروموزومی در این گونه، در مناطق مختلف اکولوژیکی جهان نیز می‌تواند بیانگر تاثیر شرایط اکولوژیکی به ویژه اقلیم، رطوبت و دمای زیستگاه بر روی گامت‌ها و نیز تخم باشد که نتایجی از قبیل کاهش و افزایش کروموزوم‌ها، پلی پلوئیدی و موتاسیون را خواهد داشت. به طور کلی در جانورانی با لقاح خارجی شرایط اکولوژیکی زیستگاه عاملی بسیار مهم و تعیین کننده در وضعیت ژنتیکی گامت‌ها و تخم لقاح یافته خواهد بود. این امر به خوبی در جمعیت‌های گونه مشابه که ساکن عرض‌های جغرافیایی متفاوت هستند رویت می‌شود به طوری که در چنین گروههایی به وضوح شواهدی دال بر وقوع پدیده‌ی گونه زایی مشاهده می‌گردد. در این مطالعه در کمتر از ۳٪ از پلاک‌های متافازی، وضعیت پلی پلوئیدی مشاهده گردید. وقوع پدیده فوق در اغلب دوزیستان بی‌دم تایید شده است که می‌تواند موجب وقوع تنوع عدد کروموزومی در جمعیت گونه‌ای و نهایتاً بستر ساز وقوع گونه زایی شود. (بلوچ و کمی، ۱۳۸۵)

## منابع

- ابراهیم نژاد، م. (۱۳۸۵) زیست‌شناسی مهره‌داران. مرکز نشر دانشگاهی. چاپ دوم. صفحه ۱۷۳
- ایافت، ا.، دیویس، ج.، کلاریج، گ. (۱۳۸۹) فواید تالابها. انتشارات دایره سبز. چاپ دوم. صفحات ۹۱ و ۹۰
- بلوچ، م.، کمی، ح. (۱۳۸۵) دوزیستان ایران. انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۱۵۳ و ۱۵۵

پاپهن، ف.، اسمعیلیان، ا.، دژمان، م. (۱۳۹۵) بررسی مورفولوژیک، مورفومتریک، هیستولوژیک و هیستومتریک قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771. در شهر اهواز (منطقه گرم) و مقایسه آن با شهر شهرکرد (منطقه سرد).

فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال هشتم. شماره ۳

پناهی، ا.، جوادیان، ب.، غلامزاده، م.، کیانی، م. (۱۳۹۱) زمین گردشگری شهرستان الشتر (شمال لرستان). اولین همایش ملی گردشگری و طبیعت گردی ایران زمین

درویش، ج. (۱۳۸۹) جمعیت‌ها، گونه‌ها و تکامل. ویرایش جدید. مایر. ا.، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحات ۳۲۹ و ۳۳۴

محمودی، ش.، سرهنگ زاده، ج.، شیخی نیلانویی، ص.، نجفی جویباری، ع. (۱۳۹۲) بررسی غنای گونه ای خزندگان و دوزیستان منطقه حفاظت شده اشترانکوه. کنفرانس ملی مخاطرات محیط زیست. لرستان. خرم آباد

میرزاجانی، ع.، صیاد، ر.، حیدری، ع. (۱۳۸۳) بررسی تغذیه لارو و بالغین قورباغه *Rana ridibunda* و تولید مثل آن در تالاب انزلی. مجله زیست شناسی ایران. شماره ۲

مولوی، ف.، پاشایی راد، ش.، کمی، ح. ق.، یزدان پناهی، م. (۱۳۹۲) مطالعه فونستیکی قورباغه ها در ایران. مجله علمی- پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی. شماره دوم. صفحات ۱۷-۲۲

مینایی، ج.، بهروزی راد، ب. (۱۳۹۲) معرفی فون (خزندگان، دوزستان و ماهی ها) در منطقه کوه خان کماندار استان لرستان. کنفرانس ملی مخاطرات محیط زیست زاگرس. لرستان. خرم آباد

نجیب زاده، م.، درویش، ج.، کمی، ح.، قاسم زاده، ف. (۱۳۹۳) مقایسه زیستگاه، رفتار جفت گیری و تخم ریزی سه گونه از دوزیستان بی دم قورباغه مردابی *Rana*، قورباغه درختی *Hyla savignyi* و وزغ سبز *Bufo variabilis* در استان لرستان. مجله پژوهشی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۲۷. شماره ۲.

Al- Shehri, A. H., Al-Saleh, A. A. (2005). Karyotype of Amphibian in Saudi Arabia the karyotype of *Rana ridibunda*. Journal of biological sciences. 5(3): 335-338

Azevedo, R. A., DeJesus Santana, A. S., DeBrito-Gitirana, L. (2006). Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. Journal of Micron. 37(3): 223-228

Harley, C. D., Pankey, M. S., Wares, J. P., Grosberg, R. K., Wonham, M. J. (2006). Color polymorphism and genetic structure in the sea star *Pisaster ochraceus*. The Biological Bulletin. 211(3): 248-262

Hoffman, E. A., Blouin, M. S. (2000). A review of color and pattern polymorphisms in anurans. Biological Journal of the Linnaean Society. 70(4)

Ishchenko, V. G. (2014). Ecological mechanisms determining stability of color polymorphism in the population of more frogs, *Rana arvalis* Nilss. Russian Journal of Herpetology. 1(2): 117-120

Jazayeri, A., Papan, F., Ismaili, A. (2012). Karyological Study of Marsh Frogs (*Rana Ridibunda*). Life Science Journal: 3(9): 864-866

- Lind, M., Johansson, F. (2007). The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of evolutionary biology*. 20(4):128-97
- Lukanov, SP., Tzankov, N. D., Simeonovska-Nikolova, D. M. (2014). Effects of Environmental Factors on Mating Call Characteristics of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in Bulgaria. *Journal of Actazoologica Bulgarica*: 66(2): 209-16
- Morrison, C., Hero, J. M. (2003). Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*: 72(2): 270-9
- Mohammadi, Z., Khajeh, A., Ghorbani, F., Kami, H. G. (2015). A Biosystematic study of new records of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibian: Ranidae) from the southeast of Iran, *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*. 8(2): 178-182
- Pesarakloo, A., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani, N., Kami, H., Najibzadeh, M., Khosravani A. (2017), The first taxonomic reevaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome, *Mitochondrial DNA Part A*, 28(3): 392-8
- Pesarakloo, A., Rastegar-pouyani, N., Rastegar-pouyani, E., Najibzae, M., Gharzi, A., Shayestefar, A. (2015). Interactive effects of temperature and food availability on the Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) tadpoles in Western Iran. *Asian Journal of Conservation Biology*. 4(2): 130-135
- Shaffer, H. B., Gidis, M., McCartney-Melstad, E., Neal, K. M., Oyamaguchi, H. M., Tellez, M. (2015). Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. *Journal of Animal Biosciences*: 3(ch\_1): 113-38
- Tennessen, J. B., Parks, S. E., Langkilde, T. (2014). Traffic noise causes physiological stress and impairs breeding migration behaviour in frogs. *Journal of Conservation physiology*: 2(1): cou032.
- Tsuji, H. (2004). Reproductive ecology and mating success of male *Limnodynastes kuhlii*. A fanged frog from Taiwan. *Herpetological*, 60(2): 155-67

**Biosystematic study of marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) (Pallas, 1771)  
in wetland habitats of Aleshtar (Lorestan province of Iran)**

A. jazayeri<sup>1\*</sup>, f. Papahn<sup>2</sup>, A. Hatami<sup>3</sup>

Received:2016.8.15

Accepted:2018.6.8

**Abstract**

*Pelophylax ridibundus* is the only species of *Pelophylax*, distributed in almost all parts of Iran. The present study was carried out in 3 wetland stations of Aleshtar ( Lorestan province) with the aim of studying morphology, morphometric , characteristics of reproductive, karyology and histology of skin,in 160 samples. A total of 3 morph were identified. In the analysis of traits, the two sexes did not differ significantly in terms of weight and thigh diameter, while they differed in total length traits. The highest reproductive index was measured in both sexes in spring. In addition the maximal weight for males was 92.9 gr and for females. The chromosomal number of the species was  $2n= 26$  in the studied cases, with the sex heteromorphy chromosomes. The structure of the skin at all site was similar and consisted of two layers of epidermis and dermal. in the dermal sponge layer in both sexes, the mucus and granular glands were observe, and the abdominal skin was differed by the thinning of collagen fibers from the dorsal skin.

**Keywords:** Animal Biosystematics, Anura, marsh Frog, wetland, Lorestan

---

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

\*(corresponding Author: jazayeriashraf@ymail.com)

2-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Ahvaz, Iran

3-Msc, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

# اثر آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی روی رشد، رنگ پذیری، فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی آزاد خزر (*Salmo trutta*)

محمد کاسعلی پور<sup>۱</sup>، حسین خارا<sup>۲\*</sup>، علی صادق پور<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

## چکیده

رنگ قرمز گوشت بعضی از آزاد ماهیان به دلیل وجود رنگدانه محلول در چربی از گروه کاروتنوئیدها می باشد. به همین منظور اثر رنگدانه‌های آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز و فلفل دلمه ای نارنجی بر روند رشد، رنگ پذیری و فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی روی ۳۰۰ عدد ماهی و در ۱۰ تیمار با سه تکرار انجام شد. جیره های غذایی به ترتیب شامل ۳۵ ppt، ۴۰، ۴۵ (آستاگزانتین)، ۳۳ ppt، ۴۴، ۵۵ (فلفل دلمه ای قرمز) و، ۳۳ ppt، ۴۴، ۵۵ (فلفل دلمه ای قرمز) بود. در طول دوره ماهیان زیست سنجی شدند و در سه مرحله از ماهیان خونگیری بعمل آمد و گوشت آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. ماهیان تیمار ۴۵ ppt آستاگزانتین دارای بیشترین تغییر رنگ در گوشت بودند. براساس نتایج به دست آمده بیشترین وزن نهایی بدن، درصد افزایش وزن بدن، ضریب چاقی، سرعت رشد روزانه بدن، ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی مربوط به تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه‌ای قرمز بود ( $P < 0.05$ ). کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی مربوط به تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه‌ای قرمز و بیشترین مقدار مربوط به گروه شاهد بود که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ). بیشترین مقادیر گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل و لنفوسیت نیز مربوط به تیمار ۴۵ ppt آستاگزانتین بوده که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج بررسی فاکتورهای ایمنی نشان داد که بیشترین مقدار لیروزیم و ایمنوگلوبولین کل در تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه‌ای نارنجی و بیشترین Igm در تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه‌ای قرمز مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). لذا می‌توان نتیجه گرفت که منابع گیاهی باعث افزایش رشد و مقاومت سیستم ایمنی ماهیان شدند و با توجه به صرفه اقتصادی و اثرات مفید ذکر شده، می‌توانند جایگزین رنگدانه‌های مصنوعی شوند.

**واژه های کلیدی:** ماهی آزاد دریای خزر، آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز، فلفل دلمه ای نارنجی، فاکتورهای خونی و ایمنی، رشد، رنگ پذیری.

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۲- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

\* (نویسنده مسئول: h.khara1974@yahoo.com)

۳- مربی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

## مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta*) از جمله ماهیان با ارزش دریای خزر است و به طور عمده در سواحل غربی و جنوبی دریای خزر پراکنده است. با توجه به آلودگی آب دریاها و منابع آبی، از بین رفتن زیستگاه‌ها و مناطق تخم‌ریزیدر، موانع موجود بر سر راه مهاجرت ماهیان به هنگام تخم‌ریزی، ورود فاضلاب‌های شهری به آب رودخانه‌ها و همچنین حضور صیادان غیر مجاز، بقای نسل این گونه به خطر افتاده است (Bahrekazemi *et al.*, 2011) و طی سال‌های اخیر با کاهش شدید ذخایر و صید مواجه شده است (Parry, 1958; Krayushkina *et al.*, 1999; Hajirezaee *et al.*, 2010; Habibi *et al.*, 2013). از این رو تکثیر مصنوعی آن به منظور رهاسازی و بازسازی ذخایر طبیعی در مراکز نظیر مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت در دستور کار قرار گرفت. از آنجا که این ماهی قیمت بالاتری نسبت به گونه‌های نزدیک به خود مانند قزل‌آلای رنگین کمان دارد، رویکرد قابل توجهی به امر پرورش آن از سوی پرورش دهندگان مشاهده می‌شود (قبادی و خدابخش، ۱۳۹۲). این گونه اگرچه رشد کندتری نسبت به قزل‌آلای رنگین کمان دارد لیکن به لحاظ بازارپسندی، شکل ظاهری و همچنین طعم، گوشت نسبت به قزل‌آلای رنگین کمان ارجح است و با وجود گرانی قیمت، در بازار مشتریان خاص خود را دارا می‌باشد (صیاد بورانی و همکاران، ۱۳۹۱).

رنگ گوشت آزاد ماهیان یکی از مهم‌ترین پارامترهای کیفی است (Sigurgisladottir *et al.*, 1997). واضح است که رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در ماهی آزاد یک نشانه طبیعی مهم از نظر زیست‌شناسی می‌باشد. رنگ صورتی روشن در گوشت ماهی آزاد و قرمز روشن در تخم آن‌ها نشانه سلامتی در ماهیان پرورشی است (Gupta *et al.*, 2007). رنگ عضلات ماهی‌هایی که در محیط طبیعی و با غذای طبیعی تغذیه شده باشند به علت به دست آوردن کاروتنوئیدهای طبیعی و تجمع آن در ماهیچه‌ها نارنجی است و این ویژگی عامل مهمی در بازاریابی و فروش مناسب آن محسوب می‌شود (زمان پور و همکاران، ۱۳۸۴). کاروتنوئیدها دارای فواید زیادی هستند که می‌توان به محافظت از سلول‌ها و غشای میتوکندری در مقابل آسیب‌های اکسیدیه شدن، بالا بردن قدرت سیستم ایمنی از طریق افزایش تولید آنتی‌بادی‌ها توسط سلول‌ها، جلوگیری از اکسیدیه شدن چربی‌هایی که باعث تشکیل لخته می‌گردند، کاهش استرس، محافظت کردن چشم و پوست از آسیب‌های اشعه ماوراء بنفش بوسیله مهار کردن اکسیژن آزاد، افزایش رشد، بازماندگی و باروری و سلامت اشاره کرد (Martin *et al.*, 2008).

رنگدانه آستاگزانتین یک کاروتنوئید مهم در ایجاد طیف رنگی صورتی-قرمز، در ماهی و میگو (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹) و مؤثرترین کاروتنوئید برای رنگ‌پذیری آزاد ماهیان می‌باشد (Ando *et al.*, 1992). فلفل دلمه‌ای قرمز و نارنجی ارزان، فراوان و غنی از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی هستند. فلفل دلمه‌ای غنی از ویتامین‌های A و C است که سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی مانند کاروتن هستند. ماده شیمیایی کپسایسین موجود در فلفل، به خصوص در فلفل معمولی، ترکیب شیمیایی

دارد که موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شود و به این سیستم در حمله به عوامل عفونی کمک می‌کند (مبلی و پیراسته، ۱۳۷۳). رنگ پذیری گوشت ماهی قزل آلا به عواملی چون جیره غذایی، سرعت رشد، شرایط مدیریتی، میزان و مدت مصرف رنگدانه و غیره بستگی دارد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹).

به طور کلی اجزای سلولی و سرمی خون نشان دهنده تابلوی عمومی سلامت بدن می باشند و این فاکتورها وابستگی زیادی به شرایط محیطی، تغذیه ای، سن و غیره دارند (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۶).

تاکنون مطالعات گسترده ای روی اثر رنگدانه ها بر روی ویژگی های رشد، رنگ پذیری، فاکتورهای خونی و ایمنی آبزیان مختلف انجام شده است. ملایی و زرین فر (۱۳۸۴) اثرات آستاگزانتین را روی رشد و کیفیت ظاهری قزل آلائی رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند که افزودن آستاگزانتین در اواخر دوره پرورش قزل آلائی رنگین کمان باعث بهبود رنگ گوشت ماهی می شود. غیاثوند و شاپوری (۱۳۸۸) با بررسی تاثیر رنگدانه های طبیعی و مصنوعی و مقایسه اثر آن ها بر ماهی اسکار سفید (*Astronotus ocellatus* sp.) دریافتند که رنگدانه شیمیایی آستاگزانتین درصد بیشتر تجمع رنگدانه در بافت را از خود نشان داد ولی تیمارهای تغذیه شده با غذای حاوی رنگدانه طبیعی نیز تجمع رنگدانه در پوستشان دیده شده که دارای مقادیر کمتری بود. بازیار لاکه و همکاران (۱۳۸۴) به بررسی تاثیر آستاگزانتین جیره غذایی بر ذخیره آستاگزانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند. برای این کار مولدین ماده با سطوح مختلف آستاگزانتین در جیره غذایی، شامل تیمار کنترل، ۱۲/۴۶، ۳۳/۳۳، ۱/۶۵ و ۹۱/۹۲ میلی گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا تحت سیستم دوره نوری مصنوعی تا حصول رسیدگی جنسی نهایی مورد تغذیه قرار گرفتند. مولدین ماده تخم هایی با محتوای آستاگزانتینی ۲/۰۳ و ۲۹/۷۹ میلی گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم تخمک تولید کردند که تفاوت معنی داری در خصوص محتوای آستاگزانتینی تخمک در بین تیمارها مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) که بیانگر اثر مثبت آستاگزانتین موجود در تخم بر قابلیت لقاحی تخمک می باشد. رهولکا (۲۰۰۰) (*Rehulka*) با مطالعه تأثیر آستاگزانتین بر روی ضریب رشد و برخی اندیس های خونی در قزل آلائی رنگین کمان به این نتیجه رسید که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۴۹/۸ میلی گرم آستاگزانتین، تری اسیل گلیسرول کمتری داشتند. گوکر و همکاران (۲۰۰۶) (*Gocer*) در تحقیقی اثرات فلفل قرمز، گل همیشه بهار و آستاگزانتین مصنوعی را روی رنگ پذیری و رشد میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) بررسی و گزارش کردند که افزودن کاروتنوئیدهای طبیعی و مصنوعی روی رشد اثری نداشت، اما تاثیر مثبتی بر میزان بقا نشان داد. بایوک کاپار و همکاران (۲۰۰۷) (*Buyukcapar*) تحقیقاتی بر روی رنگ پذیری قزل آلائی رنگین کمان توسط گل همیشه بهار و فلفل قرمز انجام دادند که در آن رژیم غذایی مکمل شده با میزان ۶/۶ درصد یا بالاتر برای فلفل قرمز و ۲/۴ درصد برای گل همیشه بهار اثر منفی روی رشد ماهی داشت. در این مطالعه، آستاگزانتین مصنوعی رنگ بهتری نسبت به فلفل قرمز و گل همیشه بهار ایجاد کرد. اردم و همکاران (۲۰۰۹) (*Erdem*) با بررسی اثرات کاروتنوئیدهای مصنوعی و حیوانی روی کیفیت حسی و ترکیب شیمیایی قزل آلائی رنگین کمان گزارش کردند که مواد



رنگی که به غذای قزل آلاهی رنگین کمان اضافه شد تاثیر قابل توجهی روی تاثیر کیفیت حسی در نمونه های ماهی گذاشت. این تغییر رنگ فرآورده ها اثرات مثبتی روی طعم آن ها خصوصا هنگام استفاده از افزودنی های عصاره فلفل قرمز گذاشت و مشخصات رنگ و ظاهر در قیمت محصولات بسیار مهم است. طالبی و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر رنگدانه گیاهی لوتئین را بر رشد و فاکتورهای خونی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که استفاده از این رنگدانه در جیره غذایی، تاثیر مثبتی بر فاکتورهای ذکر شده خواهد داشت. طالبی و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر فلفل دلمه ای قرمز را بر رشد، رنگ پذیری بافت و فاکتورهای خونی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد استفاده از ترکیبات گیاهی در رژیم های غذایی برای قزل آلاهی رنگین کمان یک رژیم موثر و مقرون به صرفه است و رژیم غذایی فلفل قرمز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم نیز در دسترس است. با توجه به مطالعات انجام شده و خلأهای اطلاعاتی موجود، هدف از این مطالعه استفاده از منابع گیاهی (حاوی کاروتنوئیدهای موجود در کشور)، به دلیل گران بودن رنگدانه های کاروتنوئیدی سنتزی، دستیابی به یک جیره غذایی طبیعی مناسب از لحاظ سلامت و هزینه تولید در شرایط مختلف پرورشی، استفاده از سطوح مناسب کاروتنوئیدها در جیره مولدهای نر و ماده آبیان به منظور فراهم آوردن نسلی با کیفیت بهتر و بررسی اثر آستاگزانتین و فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی بر روند رشد، رنگ پذیری و فاکتورهای خونی در جیره غذایی است.

## مواد و روش ها

این تحقیق در تیر ماه سال ۱۳۹۲ به مدت دو ماه، در شرکت پرورش ماهی سل تی تی استان گیلان انجام شد و از سه استخر به ابعاد ۲۵×۳ متر (طول×عرض) با ارتفاع ۴۰ سانتی متر که هر کدام با استفاده از توری به حوضچه هایی به ابعاد ۳×۱ متر و حجم ۱۲ متر مکعب تقسیم گردیده بود استفاده شد. منبع تأمین آب این کارگاه رودخانه بود که سختی آن ۱۹۰ میلی گرم در لیتر و دبی آب ۲۵۰۰ لیتر بر ثانیه بود. همچنین در طول دوره میانگین دمای آب ۱۶/۹۶±۰/۶۴، اکسیژن محلول ۳۷/۱۲±۰/۱۲ و pH ۷/۱±۰/۲۹ بود. برای انجام این تحقیق ۳۰۰ عدد ماهی پس از یک هفته آداپتاسیون و تغذیه با غذاهای رایج تجاری (GFT2) در ۱۰ تیمار با سه تکرار (هر تیمار ۳۰ عدد ماهی) تحت شرایط محیطی یکسان توزیع شدند. جیره های غذایی به ترتیب شامل ppt ۳۵، ۴۰، ۴۵ (آستاگزانتین)، ppt ۳۳، ۴۴، ۵۵ (فلفل دلمه ای قرمز) و ppt ۳۳، ۴۴، ۵۵ (فلفل دلمه ای نارنجی) بودند که براساس منابع و تحقیقات مشابه انتخاب گردید. غذاهای به طور روزانه در سه نوبت در ساعت های مشخص و غذاسازی دستی هر سه روز یکبار انجام شد. غذای مورد نیاز با توجه به وزن توده زنده در مقاطع زمانی مختلف (معمولاً پس از هر بار زیست سنجی) و با توجه به تلفات محاسبه و با ترازوی دیجیتالی با دقت (g) ۰/۰۱ و (g) ۰/۰۰۱ توزین و بسته بندی شد. رنگدانه آستاگزانتین از شرکت بهپرور و فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی از میدان میوه و تره بار خریداری شدند. در طول این دوره، هر ۲۰ روز یکبار، طول ماهیان پس از بیهوشی توسط عصاره پودر گل میخک با دوز ۲۰۰ ppm (مهرابی، ۱۳۷۸) با خط کش

میلیمتری و وزن شان با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت (g) ۰/۰۱ اندازه گیری شد. به منظور کاهش استرس ماهیان هنگام زیست سنجی، ۱۲ ساعت قبل و بعد از زیست سنجی غذادهی قطع گردید. پس از هر بار زیست سنجی، تعیین درجه رنگی شدن گوشت با برش در ناحیه شکمی ماهی با استفاده از SalmoFan<sup>TM</sup> ارزیابی شد (Talebi *et al.*, 2013). این وسیله دارای ۱۵ نمونه رنگ می باشد که به ترتیب از اعداد ۲۰ تا ۳۴ شماره گذاری شده اند (شکل ۱). پایین ترین شماره این طیف دارای رنگ صورتی و بالاترین شماره این طیف دارای رنگ قرمز می باشد.



شکل ۱: SalmoFan<sup>TM</sup>

پس از آخرین زیست سنجی ماهیان (روز شصتم)، برای بررسی شاخص های خونی هموگلوبین، هماتوکریت، WBC، RBC، لنفوسیت، نوتروفیل و مونوسیت، فاکتورهای ایمنی لیزوزیم، IgM و ایمونوگلوبین کل از ماهیان خونگیری شد که این عمل با استفاده از سرنگ استریل از سیاهرگ دمی به میزان ۲ CC خون انجام شد. مقدار ۰/۵ CC خون به داخل تیوب های اپندروف هپارینه (جهت مطالعات فاکتورهای خونی) و ۱/۵ CC به داخل تیوب های اپندروف غیر هپارینه (جهت انجام مطالعات فاکتورهای ایمنی) ریخته شد. نمونه ها در یک کلمن حاوی یخ خشک به آزمایشگاه هماتولوژی ارسال گردید. لازم به ذکر است در هنگام خونگیری از مواد بیهوش کننده به علت احتمال تاثیر بر روی سطوح شاخص های خونی استفاده نگردید (Torrecillas *et al.*, 2011). جهت تهیه سرم، نمونه ها توسط سانتریفوژ (مدل Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatch آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردیدند.

شاخص های خونی WBC و RBC به وسیله یک پیپت ملانژور سفید برای گلبول سفید و یک پیپت ملانژور مخصوص شمارش گلبول های قرمز برای گلبول قرمز انجام شد و شمارش با استفاده از محلول رقیق کننده Rees و لام نفوبار پیشرفته صورت گرفت (عامری، ۱۳۷۸؛ Klontz, 1994).

$$۱۰۰۰۰ \times (\text{تعداد گلبول قرمز در } ۵ \text{ خانه مرکزی لام}) = X = \text{تعداد گلبول قرمز در میلی متر مکعب}$$

$$۵۰ \times (\text{تعداد گلبول سفید در } ۴ \text{ خانه مخصوص گلبول های سفید}) = X = \text{تعداد گلبول سفید در میلی متر مکعب}$$

اندازه گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) با طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد (عامری مهابادی، ۱۳۷۸؛ Klontz, 1994). برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله ها در داخل میکروسانتریفوژ (مدل D-78532 Tuttlingen ساخت شرکت Hettrich آلمان) قرار داده شد و به مدت زمان پنج دقیقه با دور ۷۰۰۰ سانتیفریوژ گردید (Klontz, 1994). تشخیص افتراقی گلبول های سفید به وسیله متانول ۹۶ درصد و محلول ۱۰ درصد گیمسا (ساخت شرکت Merck آلمان) جهت رنگ آمیزی و شمارش انواع گلبول های سفید نظیر لنفوسیت ها، نوتروفیل ها و مونوسیت ها با استفاده از دستگاه شمارنده دستی انجام شد (عامری مهابادی، ۱۳۸۷؛ Klontz, 1994). برای اندازه گیری ایمونوگلوبولین M (IgM) از روش ایمونوتوربیدی متری (Immuno turbidimetric) استفاده شد. در این روش IgM با آنتی بادی های پلی کلونال موجود در محلول های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد. برای اندازه گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، ۱/۷۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲) با ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف سنجی اندازه گیری شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر خوانده شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد (Ellis, 1977). غلظت ایمونوگلوبولین کل مطابق با روش شرح داده شده توسط سوویکی و اندرسون (۱۹۹۳) (Siwicki & Anderson) و آمار و همکاران (۲۰۰۰) (Amar) اندازه گیری شد. به اختصار، نمونه سرم مطابق با روش Biuret اندازه گیری شد: ۰/۱ میلی لیتر از هر نمونه سرم با ۰/۱ میلی لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول ۳۲ درصد مخلوط شد (PEG, 10 000 MW, Sigma chemical, St Louis, Mo, USA) و مخلوط برای مدت دو ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمونوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبولین توسط سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge 5415R, EppendorfAG, Hamburg, Germany) در ۵۰۰۰ دور و دمای چهار درجه سانتی گراد برداشته شد. پروتئین کل در مایع شناور اندازه گیری شد. مقدار ایمونوگلوبولین بصورت میلی گرم در هر میلی لیتر بیان و مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

پروتئین کل تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول - پروتئین کل در نمونه سرم = (میلی گرم در هر میلی لیتر) ایمونوگلوبولین کل

با توجه به مقادیر طول و وزن ماهیان در زیست سنجی های انجام شده برای بررسی روند رشد ماهیان در تیمارهای

مختلف از شاخص های رشد استفاده گردید که روش محاسبه آن ها در زیر آورده شده است:

• ضریب تبدیل غذایی<sup>۱</sup>

$$FCR = F / (wt - wo) \text{ (Ronyai et al., 1990)}$$

F = مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی

Wo = میانگین بیوماس اولیه (گرم)

Wt = میانگین بیوماس نهایی (گرم)

• ضریب رشد ویژه<sup>۲</sup> (درصد در روز)

$$S.G.R = (Lnwt - Lnwo) / t \times 100 \text{ (Ronyai et al., 1990)}$$

Wo = میانگین بیوماس اولیه (گرم)

Wt = میانگین بیوماس نهایی (گرم)

T = تعداد روزهای پرورش

• درصد افزایش وزن بدن<sup>۳</sup>

$$\%WG = (Bwf - Bwi) / Bwi \times 100 \text{ (Hung et al., 1989)}$$

Bwi = متوسط وزن اولیه در هر تانک

Bwf = متوسط وزن نهایی در هر تانک

• رشد روزانه<sup>۴</sup> (گرم / روز)

$$G.R = (Bwf - Bwi) / n \text{ (Hung et al., 1989)}$$

Bwi = متوسط وزن اولیه در هر تانک

Bwf = متوسط وزن نهایی در هر تانک

n = تعداد روزهای پرورش

• درصد بقاء<sup>۵</sup>

<sup>1</sup> Feed Conversion Rate

<sup>2</sup> Specific Growth Rate

<sup>3</sup> Weight gain percentage

<sup>4</sup> Growth Rate

<sup>5</sup> Survival Rate

تعداد ماهی های موجود در پایان آزمایش

$$\times 100 = \frac{\text{تعداد ماهی های موجود در شروع آزمایش}}{\text{تعداد ماهی های موجود در پایان آزمایش}} \text{ درصد بقاء}$$

تعداد ماهی های موجود در شروع آزمایش

جهت انجام آنالیزهای آماری و رسم نمودارها، نرم افزارهای SPSS 18 و Excel 2013 مورد استفاده قرار گرفتند. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون Shapiro-Wilk's استفاده گردید. در صورت نرمال بودن توزیع داده ها، مقایسه هر یک از فاکتورهای اندازه گیری شده بین تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway Anova) و در صورت غیر نرمال بودن، از آزمون ناپارامتریک کروسکال - والیس (Kruskal-Wallis) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. جهت مقایسه میانگین ها در حالت نرمال از آزمون دانکن (Duncan) و در حالت غیر نرمال از آزمون من - ویتنی استفاده گردید.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه گیری طول و وزن آزاد ماهیان هر تیمار در طی سه مرحله زیست سنجی در طول مدت پرورش در جداول ۱ و ۲ گزارش شده است. بر طبق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و تست جداساز دانکن اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها مشخص گردید ( $P < 0.05$ ). به این ترتیب در تمام مراحل زیست سنجی از لحاظ فاکتور وزن و طول بیشترین مقدار مرتبط با تیمار فلفل دلمه ای قرمز ppt ۵۵ و کمترین مقدار آن در گروه شاهد مشاهده گردید.

جدول ۱: طول بچه ماهیان پرورشی در طول دوره پرورش

تیمار	شاهد	آستاگزائین ۳۵ ppt	آستاگزائین ۴۰ ppt	آستاگزائین ۴۵ ppt	فلفل دلمه ای قرمز ppt ۳۳	فلفل دلمه ای قرمز ppt ۴۴	فلفل دلمه ای قرمز ppt ۵۵	فلفل دلمه ای نارنجی ppt ۳۳	فلفل دلمه ای نارنجی ppt ۴۴	فلفل دلمه ای نارنجی ppt ۵۵
۱) روز بیستم)	۳۳/۴	۳۵/۶	۳۴/۶ ± ۰/۷ <sup>a</sup>	۳۶ ± ۱/۳۳ <sup>bc</sup>	۳۴/۵ ± ۱/۰۵ <sup>a</sup>	۳۵/۸	۳۶/۵	۳۴/۲	۳۵/۷	۳۵/۸
۲) روز چهارم)	۳۶/۳	۳۷/۴۵	۳۷/۷ ± ۰/۹۵ <sup>b</sup>	۳۸/۸ ± ۰/۹۲ <sup>c</sup>	۳۷/۰۵	۳۷/۹	۳۹/۸	۳۷/۳	۳۷/۸	۳۹
۳) روز شصتم)	۳۸	۳۹/۱	۳۸/۷	۳۹/۳۵	۳۹/۱ ± ۰/۷ <sup>b</sup>	۳۹	۴۰/۳	۳۸/۷	۳۸/۷	۳۹/۳

**جدول ۲: وزن بچه ماهیان پرورشی در طول دوره پرورش**

شمار دفعات بیومتری	شاهد	آستاگزانتین ۳۵ ppt			آستاگزانتین ۴۰ ppt			آستاگزانتین ۴۵ ppt		
		فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt
۱ (روز بیستم)	۲۲۹/۷ ± ۵/۱۲ <sup>a</sup>	± ۶/۰۷ <sup>c</sup>	± ۵/۲۸ <sup>c</sup>	± ۳/۸۳ <sup>b</sup>	± ۳/۶۴ <sup>c</sup>	± ۷/۴۷ <sup>e</sup>	± ۳/۸۳ <sup>b</sup>	± ۳/۶۴ <sup>c</sup>	± ۷/۴۷ <sup>e</sup>	
۲ (روز چهارم)	۲۵۸/۸ ± ۴/۴۴ <sup>a</sup>	± ۶/۱۵ <sup>bc</sup>	± ۶/۵۷ <sup>c</sup>	± ۶/۵ <sup>bc</sup>	± ۴/۹۹ <sup>de</sup>	± ۱۰/۵۵ <sup>f</sup>	± ۶/۵ <sup>bc</sup>	± ۴/۹۹ <sup>de</sup>	± ۱۰/۵۵ <sup>f</sup>	
۳ (روز شصتم)	۲۸۶/۸ ± ۴/۰۵ <sup>a</sup>	± ۴/۹۶ <sup>b</sup>	± ۴/۳۸ <sup>b</sup>	± ۶/۱۸ <sup>bc</sup>	± ۸/۴۳ <sup>e</sup>	± ۶/۵۷ <sup>g</sup>	± ۶/۱۸ <sup>bc</sup>	± ۸/۴۳ <sup>e</sup>	± ۶/۵۷ <sup>g</sup>	

با توجه به مقادیر میانگین طول و وزن اولیه و نهایی اندازه گیری شده، نتایج حاصل از اثرات تغذیه آزاد ماهیان پرورشی

با جیره های غذایی مختلف بر شاخص های رشد و مصرف غذایی ارزیابی و در جدول ۳ ذکر گردیده است.

**جدول ۳: عملکرد رشد و مصرف غذایی در آزاد ماهیان پرورشی در طول دوره پرورش**

پارامترها	شاهد	آستاگزانتین ۳۵ ppt			آستاگزانتین ۴۰ ppt			آستاگزانتین ۴۵ ppt		
		فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه- ای قرمز ۵۵ ppt
وزن نهایی بدن (گرم)	۲۸۶/۸	± ۴/۰۵ <sup>a</sup>	± ۴/۹۶ <sup>b</sup>	± ۴/۳۸ <sup>b</sup>	± ۵/۱ <sup>c</sup>	± ۶/۱۸ <sup>bc</sup>	± ۳/۰۰/۷	± ۶/۱۸ <sup>bc</sup>	± ۳/۰۰/۷	
درصد افزایش وزن بدن (%)	۴۳/۵۳	± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۰۳ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	± ۰/۰۰۳ <sup>ab</sup>	
ضریب چاقی (%)	۰/۴۹	± ۰/۵۲	± ۰/۵۱	± ۰/۵۱	± ۰/۵۰	± ۰/۵۴	± ۰/۵۰	± ۰/۵۴	± ۰/۵۴	
سرعت رشد روزانه (گرم در روز)	۱/۴۵	± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	± ۰/۰۵ <sup>bc</sup>	± ۰/۰۸ <sup>ef</sup>	± ۰/۰۳ <sup>de</sup>	± ۰/۰۳ <sup>de</sup>	± ۰/۰۳ <sup>de</sup>	± ۰/۰۳ <sup>de</sup>	
ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	۰/۶	± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	± ۰/۰۲ <sup>b</sup>	± ۰/۰۲ <sup>bc</sup>	± ۰/۰۲ <sup>ef</sup>	± ۰/۰۱ <sup>de</sup>	± ۰/۰۱ <sup>de</sup>	± ۰/۰۱ <sup>de</sup>	± ۰/۰۱ <sup>de</sup>	
ضریب تبدیل غذایی	۴/۷۵	± ۰/۰۹ <sup>e</sup>	± ۰/۱۴ <sup>e</sup>	± ۰/۱۴ <sup>e</sup>	± ۰/۱۱ <sup>cd</sup>	± ۰/۲۲ <sup>b</sup>	± ۰/۱۱ <sup>cd</sup>	± ۰/۲۲ <sup>b</sup>	± ۰/۱۱ <sup>cd</sup>	
درصد بازماندگی (%)	۹۱/۱۱	± ۰/۹۶ <sup>a</sup>	± ۰/۹۶ <sup>ab</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	± ۰/۹۶ <sup>cd</sup>	

با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه و تست جداسازی دانکن وجود اختلاف معنی دار آماری در بین پارامترهای رشد و

مصرف غذایی شامل میانگین وزن نهایی بدن (FBW)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، ضریب رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش

وزن (WG%)، سرعت رشد روزانه (GR)، ضریب چاقی (CF) و درصد بازماندگی بین ماهیان تیمارهای مختلف تایید شد (P<0.05).

براساس داده های فوق میزان حداقل و حداکثر میانگین وزن نهایی بدن به ترتیب در تیمار گروه شاهد (۲۸۶/۸ ± ۴/۰۵) و فلفل

دلمه ای قرمز ۵۵ ppt (۳۶۵/۶ ± ۶/۵۷)، حداقل و حداکثر درصد افزایش وزن بدن به ترتیب در تیمار گروه شاهد (۱/۱۱ ±

۴۳/۵۳) و فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt (۸۳/۰۷ ± ۲/۴۵)، حداقل و حداکثر ضریب چاقی به ترتیب در تیمار گروه شاهد (۰/۰۳ ±

۰/۴۹) و فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt (۰/۵۶ ± ۰/۰۴)، حداقل و حداکثر سرعت رشد روزانه بدن به ترتیب در تیمار گروه شاهد

(۱/۴۵ ± ۰/۰۴) و فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt (۲/۷۷ ± ۰/۰۸)، حداقل و حداکثر ضریب رشد ویژه به ترتیب در تیمار گروه شاهد

(۰/۰۱ ± ۰/۰۱) و فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt (۱/۰۱ ± ۰/۰۲)، حداقل و حداکثر ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمار فلفل

دلمه‌ای قرمز ppt ۵۵ ( $0.09 \pm 2/76$ ) و گروه شاهد ( $0.09 \pm 4/75$ ) و حداقل و حداکثر درصد بازماندگی به ترتیب در تیمار گروه شاهد ( $0.96 \pm 91/11$ ) و فلفل دلمه‌ای قرمز ppt ۵۵ ( $1.92 \pm 99/89$ ) بود.

قبل از شروع آزمایش رنگ گوشت مورد ارزیابی قرار گرفت و تمامی تیمارها فاقد رنگ بودند. از لحاظ رنگ پذیری، نتایج نشان داد ماهیانی که از رنگدانه تغذیه کردند نسبت به تیمار شاهد، دارای تغییر رنگ بیشتری در گوشت شان بودند. با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین تغییر رنگ در پایان دوره مربوط به تیمار آستاگزائین ppt ۴۵ که درجه رنگین بودن آن با توجه به SalmoFan™ برابر با ۳۲ بود و تیمار آستاگزائین ppt ۴۰ با درجه رنگی شدن ۳۰ در رتبه دوم و تیمار آستاگزائین ppt ۳۵ و فلفل دلمه‌ای قرمز ppt ۵۵ با درجه رنگی شدن ۲۸ در رتبه سوم بودند. این درحالی است که تیمار شاهد تا پایان دوره آزمایش بدون تغییر رنگ بود. نتایج حاصل از اثرات تغذیه با جیره های غذایی مختلف بر رنگ پذیری گوشت آزاد ماهیان پرورشی در طول دوره پرورش در جدول ۴ ذکر گردیده است.

جدول ۴: درجه رنگی شدن گوشت آزاد ماهیان پرورشی در طول دوره پرورش با توجه به SalmoFan™

تیمار	شاهد	آستاگزائین ۳۵ ppt	آستاگزائین ۴۰ ppt	آستاگزائین ۴۵ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۲۳ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۳۳ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۴۴ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۵۵ ppt
مراحل تشریح	۲۰	۲۶	۲۷	۲۹	۲۴	۲۵	۲۶	۲۲	۲۲	۲۳
۱) روز بیستم)	۲۰	۲۷	۲۹	۳۰	۲۵	۲۶	۲۷	۲۳	۲۳	۲۴
۲) روز چهارم)	۲۰	۲۸	۳۰	۳۲	۲۷	۲۷	۲۸	۲۴	۲۳	۲۵
۳) روز شصتم)										

نتایج حاصل از اثرات تغذیه آزاد ماهیان پرورشی با جیره‌های غذایی مختلف بر شاخص‌های خونی در سه مرحله خونگیری در طی دوره پرورش در جدول ۵ ذکر گردیده است.

**جدول ۵: شاخص های خونی در مراحل مختلف خونگیری آزاد ماهیان پرورشی**

تیمار پارامترها	مراحل خونگیری	شاهد	آستاگزانتین ۳۵ ppt	آستاگزانتین ۴۰ ppt	آستاگزانتین ۴۵ ppt	فلفل دلمه ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه ای نارنجی ۲۳ ppt	فلفل دلمه ای نارنجی ۴۴ ppt	فلفل دلمه ای نارنجی ۵۵ ppt
تعداد گلبول قرمز (میلیون در مترمکعب)	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۰۰۰۰	± ۱۵۲۷/۵ b	± ۱۰۰۰۰ d	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۰۰۰۰ d	± ۱۰۰۰۰ d	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۰۰۰۰ d	± ۱۰۰۰۰ c
تعداد گلبول سفید (میلیون در مترمکعب)	± ۴۱۶/۳ cd	± ۱۵۳/۳ a	± ۵۹/۲ c	± ۱۰۰ de	± ۱۰۰ b	± ۳۲۱/۵ g	± ۵۷/۷ e	± ۲۵۱/۷ b	± ۴۵۰/۹ f	± ۴۱۶/۳ cd
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	± ۰/۵۵ de	± ۰/۵۱ a	± ۰/۷۹ b	± ۰/۵۵ de	± ۰/۴۷ c	± ۰/۳۲ e	± ۰/۸۵ d	± ۰/۴۲ bc	± ۰/۶۱ de	± ۰/۵۵ de
هماتوکریٹ (%)	± ۰/۵۵ e	± ۵/۷۴ a	± ۰/۵ c	± ۰/۳۵ d	± ۰/۵۱ c	± ۰/۳۸ d	± ۰/۶۸ e	± ۰/۴۷ b	± ۰/۴۹ e	± ۰/۵۵ e
نوتروفیل (%)	± ۰/۷۶ d	± ۱/۵۳ a	± ۰/۷۶ e	± ۰/۵ f	± ۰/۸۱ e	± ۰/۸۴ c	± ۰/۸۱ e	± ۲/۳۱ b	± ۱/۵۳ b	± ۰/۷۶ d
لنفوسیت (%)	± ۰/۷۶ d	± ۱/۵۳ a	± ۰/۷۶ e	± ۰/۵ f	± ۰/۸۱ e	± ۰/۸۴ c	± ۰/۸۱ e	± ۲/۳۱ b	± ۱/۵۳ b	± ۰/۷۶ d
مونوسیت (%)	± ۰/۷۶ d	± ۱/۵۳ a	± ۰/۷۶ e	± ۰/۵ f	± ۰/۸۱ e	± ۰/۸۴ c	± ۰/۸۱ e	± ۲/۳۱ b	± ۱/۵۳ b	± ۰/۷۶ d
تعداد گلبول قرمز (میلیون در مترمکعب)	± ۵۰۰۰ d	± ۱۰۰۰۰	± ۱۱۵۴۷ d	± ۱۰۰۰ e	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۰۰۰۰ c	± ۱۵۲۷/۵ c	± ۱۵۲۷/۵ c	± ۵۰۰۰ d
تعداد گلبول سفید (میلیون در مترمکعب)	± ۴۵۰/۹ e	± ۳۶/۲ a	± ۱۵۲۷/۵ c	± ۱۰۰ c	± ۲۶۴/۶ cd	± ۵۷/۷ b	± ۲۶۴/۶ cd	± ۵۱/۳ e	± ۵۰ c	± ۴۵۰/۹ e
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	± ۰/۵۵ de	± ۰/۳۲ a	± ۰/۶۴ c	± ۰/۴۷ d	± ۰/۲۱ bc	± ۰/۲۱ bc	± ۰/۳۸ ef	± ۰/۵۱ b	± ۰/۴۷ de	± ۰/۵۵ de
هماتوکریٹ (%)	± ۰/۵۵ f	± ۰/۷۶ a	± ۱/۰۴ d	± ۱/۲۶ f	± ۱/۰۱ c	± ۰/۷۶ g	± ۰/۳۵ e	± ۰/۷۶ f	± ۰/۵ e	± ۰/۵۵ f
نوتروفیل (%)	± ۱۶/۹۵ d	± ۲۸ ± ۱ a	± ۰/۳۵ abc	± ۱/۵۳ cd	± ۰/۵ cd	± ۰/۵ cd	± ۰/۵۸ abc	± ۰/۳۲ a	± ۰/۳۵ abc	± ۱۶/۹۵ d
لنفوسیت (%)	± ۱/۰۶ h	± ۹۵ ± ۱ a	± ۰/۸۱ e	± ۱۳۲ ± ۱ f	± ۱/۰۶ c	± ۱/۰۶ c	± ۰/۷۲ c	± ۱/۸۹ d	± ۱/۵۵ b	± ۱/۰۶ h
مونوسیت (%)	± ۰/۱۵ cd	± ۰/۵ b	± ۰/۲۹ f	± ۰/۲۹ f	± ۰/۶۱ de	± ۰/۶۱ de	± ۰/۲۶ c	± ۰/۳۵ b	± ۰/۳۵ e	± ۰/۱۵ cd
تعداد گلبول قرمز (میلیون در مترمکعب)	± ۲۵۱۶۶/۱ d	± ۱۰۰۰۰ a	± ۲۰۰۰ f	± ۱۰۰۰۰ g	± ۵۷۷۳/۵ c	± ۷۶۳۷/۶ g	± ۵۷۷۳/۵ c	± ۱۵۲۷/۵ b	± ۱۵۲۷/۵ c	± ۲۵۱۶۶/۱ d
تعداد گلبول سفید (میلیون در مترمکعب)	± ۵۰۰ h	± ۳۲/۱ a	± ۱۰۰ d	± ۲۰۸/۲ e	± ۵۰۰ c	± ۵۰۰ c	± ۲۸/۹ f	± ۲۶۴/۶ b	± ۴۰۴/۱ f	± ۵۰۰ h
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	± ۰/۵۳ e	± ۰/۵۳ a	± ۰/۶۴ c	± ۰/۵۱ d	± ۰/۳۵ c	± ۰/۴۵ f	± ۰/۳۵ c	± ۰/۴۷ b	± ۰/۷۶ d	± ۰/۵۳ e
هماتوکریٹ (%)	± ۱/۱۵ e	± ۰/۶ a	± ۰/۶۸ b	± ۰/۵۳ d	± ۰/۵ c	± ۰/۴۵ g	± ۰/۷۶ f	± ۱/۵۲ b	± ۱/۶۳ e	± ۱/۱۵ e
نوتروفیل (%)	± ۱/۱ d	± ۰/۷۶ b	± ۱/۱۵ f	± ۲/۰۸ g	± ۰/۵۸ a	± ۰/۵ h	± ۰/۵ e	± ۰/۱۲ d	± ۰/۵ c	± ۱/۱ d
لنفوسیت (%)	± ۰/۷۴ h	± ۱۲/۱۹ a	± ۰/۲۹ b	± ۰/۵ f	± ۱/۰۴ d	± ۱/۰۴ d	± ۱/۰۴ d	± ۱/۵۳ c	± ۱/۰۴ e	± ۰/۷۴ h
مونوسیت (%)	± ۰/۱۵ a	± ۰/۵۵ f	± ۰/۸۲ de	± ۰/۵ cd	± ۰/۵۱ a	± ۰/۵۱ a	± ۰/۵۱ a	± ۰/۳۵ b	± ۰/۳۱ de	± ۰/۱۵ a



با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه و تست جداسازی دانکن وجود اختلاف معنی دار آماری در خونگیری مرحله اول در بین تمام فاکتورهای خونی به جز مونوسیت و نوتروفیل اثبات گردید ( $P < 0.05$ ). با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه و تست جداسازی دانکن وجود اختلاف معنی دار آماری در دومین و سومین مرحله خونگیری در بین تمامی فاکتورهای خونی مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین بیشترین تعداد گلبول قرمز ( $1988333/3 \pm 7637/6$ )، تعداد گلبول سفید ( $17500 \pm 500$ )، هموگلوبین ( $25/83 \pm 0/45$ )، هماتوکریت ( $85/47 \pm 0/45$ )، نوتروفیل ( $75/5 \pm 0/5$ ) و لنفوسیت ( $20/17 \pm 1/22$ ) نیز مربوط به تیمار ۴۵ ppt آستاگزانتین بود که اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0.05$ ).

نتایج حاصل از اثرات تغذیه آزاد ماهیان پرورشی با جیره‌های غذایی مختلف بر فاکتورهای ایمنی خون در سه مرحله خونگیری در طی دوره پرورش در جدول ۶ ذکر گردیده است.

جدول ۶: فاکتورهای ایمنی خون در مراحل مختلف خونگیری آزاد ماهیان پرورشی

تیمار پارامترها	مراحل خونگیری	شاهد	آستاگزانتین ۳۵ ppt	آستاگزانتین ۴۰ ppt	آستاگزانتین ۴۵ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۳۳ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۴۴ ppt	فلفل دلمه‌ای قرمز ۵۵ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۳۳ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۴۴ ppt	فلفل دلمه‌ای نارنجی ۵۵ ppt
لیزوزیم (u/mg/min)		$24 \pm 1^a$	$41 \pm 1^b$	$52/67^c$	$70/33^f$	$55^d$	$75/33^g$	$90^h$	$60^e$	$95 \pm 1^i$	$95 \pm 1^i$
IgM (mg/dl)		$7/73^a$	$11/97^b$	$15/40^c$	$17/97^d$	$18/10^e$	$18/60^{de}$	$23/23^g$	$18/03^d$	$21/17^f$	$21/17^f$
ایمنوگلوبولین (mg/ml)		$13/67^a$	$24/67^b$	$30 \pm 1^c$	$40 \pm 1^d$	$80^g$	$44/67^e$	$95^h$	$75 \pm 1^f$	$84 \pm 1^h$	$84 \pm 1^h$
لیزوزیم (u/mg/min)		$24/67^a$	$44/67^b$	$61/67^c$	$86/67^e$	$80/33^d$	$105/67^g$	$115^h$	$105^b$	$120 \pm 1^i$	$120 \pm 1^i$
IgM (mg/dl)		$10/67^a$	$29/93^b$	$35/1^c$	$30/47^b$	$30/57^b$	$35/17^c$	$35^c$	$30/53^b$	$30 \pm 2^b$	$30 \pm 2^b$
ایمنوگلوبولین (mg/ml)		$13/67^a$	$32 \pm 1^b$	$35 \pm 1^c$	$53 \pm 1^d$	$64^e$	$110^g$	$130/67^h$	$101^f$	$131 \pm 1^h$	$131 \pm 1^h$
لیزوزیم (u/mg/min)		$25/67^a$	$57/33^b$	$75/33^c$	$92 \pm 1^d$	$94/67^e$	$120^g$	$160^h$	$125^h$	$170 \pm 1^j$	$170 \pm 1^j$
IgM (mg/dl)		$12/33^a$	$49/47^b$	$60/1^c$	$65/5^d$	$42/7^e$	$55/03^e$	$76/87^i$	$59/77^f$	$70/1^h$	$70/1^h$
ایمنوگلوبولین (mg/ml)		$19/67^a$	$37 \pm 1^b$	$42 \pm 1^c$	$60 \pm 1^d$	$85 \pm 1^f$	$123^g$	$154^h$	$124^g$	$154/67^h$	$154/67^h$

با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه و تست جداسازی دانکن وجود اختلاف معنی دار آماری در هر سه مرحله خونگیری در بین تمامی فاکتورهای ایمنی خون مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج بررسی فاکتورهای ایمنی نشان داد که بیشترین مقدار لیزوزیم ( $170 \pm 1$ ) و ایمنوگلوبولین کل ( $154/67 \pm 0/58$ ) در تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه‌ای نارنجی ثبت گردید که با

تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشت و بیشترین مقدار فاکتور IgM ( $0/81 \pm 76/87$ ) در تیمار ۵۵ ppt فلفل دلمه ای قرمز مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ).

امروزه نقش مثبت کاروتنوئیدها به عنوان عامل واسطه‌ای در متابولیسم ماهیان شناخته شده است (Segner *et al.*, 1989). نوع رنگ ماهیان بوسیله سیستم‌های عصبی آندوکرینی کنترل شده است اما منابع غذایی رنگدانه‌ها نیز نقش مهمی در تعیین رنگ ایفا می‌کنند. تاثیر منابع کاروتنوئیدی از دیدگاه رنگدانه و افزایش رشد مختص هر گونه می باشد. به علاوه تمام گونه های ماهیان راه های مشابه سوخت و ساز رنگدانه ای را نداشته و بنابراین نمی توان یک روش انتقالی کلی و سراسری کاروتنوئیدها را در بافت ماهیان در نظر گرفت (Chatzifoits *et al.*, 2004). ماهی مانند حیوانات دیگر قادر به تولید کاروتنوئیدها نیست و در شرایط طبیعی این دسته از مواد را به وسیله غذای مصرفی شامل جلبک، سخت پوستان و نرم‌تنان غنی از کاروتنوئیدها تأمین می‌کند. بنابراین کاروتنوئیدها در شرایط پرورشی باید به صورت مکمل غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Wozanik, 1996).

با توجه به نتایج به دست آمده، آزاد ماهیان نسبت به جیره های غذایی واکنش مناسبی از خود نشان دادند. رشد مناسب آزاد ماهیان و وجود اختلاف معنی دار آماری در بین پارامترها نشان می دهد که منابع گیاهی پیشنهادی تست شده با دوزهای مختلف اثرات مثبتی بر سلامتی و رشد ماهیان دارد. به طور کلی میزان رشد در تمامی تیمارها وضعیت مطلوبی داشت و اختلاف معنی داری در تمامی تیمارها نشان داده شد که بیشترین رشد مربوط به تیمار فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt بود که عکس الگوی فوق در تیمار شاهد می باشد. با افزایش میزان غلظت رنگدانه ها، وزن نیز سیر صعودی داشت و به علاوه ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن، سرعت رشد روزانه و بازماندگی افزایش یافت. این وضعیت احتمالاً به دلیل وجود موادی غیر از کاروتنوئیدها در فلفل دلمه ای قرمز است. از جمله علل احتمالی افزایش وزن می‌توان به اثر مثبت کاروتنوئیدها بر متابولیسم، تسریع هضم و جذب و افزایش بهره وری از مواد مغذی (Tacon, 1991., Amar *et al.*, 2001) و کافی بودن مدت زمان استفاده از رنگدانه (Supamattaya *et al.*, 2005) اشاره کرد. کمترین ضریب تبدیل غذایی مربوط به فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی ۵۵ ppt و بیشترین آن مربوط به گروه شاهد بود. در مطالعه اثر مخمر قرمز و آستاگزانتین سنتزی بر رشد قزل آلی رنگین کمان (Nakano *et al.*, 1995)، استفاده از رنگدانه های بتاکاروتن و آستاگزانتین در جیره میگوی ببری سیاه (Boonyaratpalin *et al.*, 2001) و تاثیر عصاره *Dunaliella* بر رشد میگوی ببری سیاه، تفاوت معنی داری در ضریب تبدیل غذایی در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (Supamattaya *et al.*, 2005). وجود این تناقض ها به این معنی نیست که کاروتنوئیدها بر ضریب تبدیل غذایی اثری ندارند. درصد بازماندگی ماهیان در تیمارهای مختلف طی دوره پرورش تفاوت معنی داری با یکدیگر داشت. میزان بقای بسیار بالا (مربوط به تیمار فلفل دلمه ای قرمز ۵۵ ppt) نشان داد که منابع گیاهی تست شده هیچ اثر منفی روی بقای ماهیان ندارند. تلفات بسیار کم ماهیان در جیره های آزمایشی نسبت به گروه شاهد را می‌توان به تاثیر جیره‌های غذایی و عوامل محیطی نسبت داد. نتایج

حاصل از این آزمایش با مطالعات انجام شده بر روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (Christiansen et al., 1995) و میگوی ببری سیاه تغذیه شده با رنگدانه های آستاگزانتین، بتاکاروتن و پودر جلبک (*Dunaliella salina*) (Boonyaratpalin et al., 2001) مطابقت دارد اما با مطالعه انجام شده بر روی خرچنگ آب شیرین *Cherax quadricarinatus* تغذیه شده با سه منبع کاروتنوئیدی (Harpez et al., 1998) مغایرت دارد. مهربایی و همکاران (۲۰۰۸) (Mehrabi et al.) بیان کردند که رنگدانه های گیاهی تاثیر مثبتی روی رشد، FCR، SGR و بقای قزل آلاهی رنگین کمان دارد که مشابه نتایج ما می باشد. در مطالعه حاضر رنگدانه های گیاهی بیشترین تاثیر را روی رشد و فاکتورهای رشد داشتند که بیشترین ضریب تبدیل غذایی و رشد ویژه مربوط به فلفل دلمه ای بود. براساس نتایج به دست آمده به ترتیب آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز و فلفل دلمه ای نارنجی باعث تغییر رنگ شدند که بیشترین تغییر رنگ مربوط به تیمار آستاگزانتین با غلظت ۴۵ ppt بود. در سایر تیمارها نیز رنگ گوشت ماهیان چشمگیر بود اما نسبت به تیمار آستاگزانتین ۴۵ ppt تغییر رنگ کمتری مشاهده شد. کمترین تغییر رنگ نیز مربوط به گروه شاهد بود. همچنین با افزایش غلظت آستاگزانتین، فلفل دلمه ای قرمز و فلفل نارنجی، میزان رنگ گوشت افزایش یافت. همان طور که مشهود است آستاگزانتین رنگ بهتری را در گوشت ماهیان نسبت به منابع گیاهی ایجاد کرد که با مطالعات انجام شده روی قزل آلاهی رنگین کمان و میگوی مونودون (Buyukcapar et al., 2007، Gocer et al., 2006) مطابقت دارد و دلایل این اختلاف ممکن است در منابع کاروتنوئیدی باشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که آستاگزانتین با دو منبع گیاهی قابل قیاس می باشد. قیمت پایین فلفل دلمه ای قرمز نسبت به آستاگزانتین باعث برتری آن می شود که جنبه اقتصادی نیز دارد و با نتایج اردم و همکاران (۲۰۰۹) (Erdem et al.) مطابق است. بازیار لاکه و همکاران (۱۳۸۴) با بررسی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به این نتیجه رسیدند که رنگدانه آستاگزانتین در افزایش قابلیت لقاح تخم قزل آلا موثر است و استفاده از این رنگدانه در جیره غذایی مولدین ماده قزل آلا پیشنهاد می شود. در مطالعه حاضر استفاده از آستاگزانتین باعث تغییر رنگ در گوشت ماهی می شود که البته بسته به سن ماهی فرق می کند. کاروتنوئیدها در ماهیان بالغ بیشتر به پوست و تخم ها و در ماهیان نابالغ بیشتر در گوشت منتقل می شود و باعث افزایش کیفیت ظاهری و طعم گوشت ماهی می شود و این امر احتمالاً به علت استفاده از رژیم گیاهی در تغذیه ماهیان می باشد (Erdem et al., 2009). ملایی و زرین فر (۱۳۸۴) بیان کردند که آستاگزانتین تاثیری روی رشد ندارد و رنگ ایجاد شده در گوشت ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با توجه به SalmoFan درجه ۳۲ بود. این اختلاف ممکن است به شرایط پرورشی و همچنین نحوه تهیه جیره برگردد.

بررسی پارامترهای بیوشیمیایی خون برای مدیریت گونه های در معرض خطر مهم است (Asadi et al., 2006). پارامترهای بیوشیمیایی خون طیف گسترده ای از اهداف مانند تشخیص آسیب سلولی ناشی از قرار گرفتن در معرض ماده سمی، آلودگی توسط عوامل بیماری زا، دستکاری، بررسی اثر رژیم غذایی بر عملکرد کبد، عملکرد تنظیم اسمزی و تنظیم یونی، اثرات جنس و چرخه بلوغ و پاسخ به عوامل تنش زا را نشان می دهند (Tavares-Dias & Moraes, 2010). مقادیر بیوشیمیایی ایجاد

شده ممکن است اجازه تصمیم گیری‌های بالینی مهم در مورد گونه‌های ماهیان را دهد (Tavares-Dias & Moraes, 2007). نتایج حاصل از بررسی پارامترهای هماتولوژیک نشان داد که بین تیمارهای مورد بررسی از نظر تعداد گلبول قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، نوتروفیل، لنفوسیت، Igm، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل با گروه شاهد اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). با توجه به نتایج، تیمارهای فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی مشابه تیمار آستاگزانتین وضعیت مطلوب‌تری نسبت به گروه شاهد داشتند و می توان از منابع گیاهی که به تیمار آستاگزانتین نزدیک بودند به عنوان منابع رنگدانه ای استفاده کرد. در این مطالعه فاکتورهای خونی در تیمارهایی که از رنگدانه تغذیه کرده بودند نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند و مشاهده شد که قدرت سیستم ایمنی در آن ها افزایش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده از فاکتورهای ایمنی می توان گفت که تیمارهای فلفل دلمه ای قرمز و نارنجی سیستم ایمنی را مقاوم می کنند و استفاده از آن ها در جیره غذایی ماهیان مفید است. افزایش گلبول سفید به معنی افزایش قدرت سیستم ایمنی ماهیان است و به نظر می رسد که عمل اصلی لنفوسیت های ماهی این است که به عنوان سلول های عمل کننده برای مکانیسم های ایمنی خاص از طریق تولید پادتن عمل می کنند (ستاری، ۱۳۸۱). از آنجا که گلبول های سفید خونی، به ویژه لنفوسیت های B و T نقش عمده ای در سیستم دفاعی ماهی دارند، تغییر تعداد این سلول ها تحت تأثیر محرک های ایمنی منطقی به نظر می رسد. از طرفی بسیاری از مواد هومورال غیراختصاصی سیستم ایمنی ماهی توسط گلبول های سفید خونی ترشح می شوند، که افزایش این فاکتورهای هومورال تحت تأثیر افزایش تعداد لکوسیت های خونی بوده است. افزایش تعداد گلبول های سفید خونی در عفونت های طبیعی و تجربی و در مواقع استفاده از واکسن ها و محرک های ایمنی گوناگون گزارش شده است (Marian, 2004). طبق نتایج مطالعه حاضر کاروتنوئیدها باعث افزایش بازماندگی و بقا و همچنین قدرت سیستم ایمنی می شود. به نظر می رسد که کاروتنوئیدهای گیاهی تولید پادتن را افزایش می دهند و همچنین با بالا رفتن قدرت سیستم ایمنی مقاومت ماهیان در مقابل عوامل بیماری زا زیاد شده و در نتیجه بازماندگی افزایش می یابد که با نتایج توریسن و همکاران (۱۹۹۶) (Torrissen *et al.*) مشابهت دارد. در مطالعه ما رنگدانه ها بخصوص رنگدانه گیاهی باعث افزایش رشد و رنگ پذیری و همچنین افزایش مقاومت سیستم ایمنی ماهیان در مقایسه با گروه شاهد شد که احتمالاً به دلیل وجود ویتامین ها در آن ها می باشد. همانطور که می دانیم ویتامین ها نقش بسزایی در رشد و سیستم ایمنی دارند (Bjerkeng *et al.*, 2000). امانی نژاد و همکاران (۱۳۸۸) اثر جلبک *Dunaliella* را بر روی فاکتورهای خونی این گونه گزارش کردند که جلبک سیستم ایمنی را تحریک می کند و اثر مثبتی بر افزایش مقاومت دارد که آن به دلیل وجود بتاکاروتن است و یافته های آن با نتایج این مطالعه مشابهت دارد.

## نتیجه گیری کلی

اگرچه بکارگیری آستاگزانتین در بسیاری از کشورها مجاز می باشد ولی تحقیقات زیادی در خصوص استفاده از رنگدانه های جایگزین با منبع طبیعی صورت می پذیرد که علت آن در قیمت بسیار بالای این مواد و همچنین اثرات بهداشتی شناخته شده آن می باشد. آستاگزانتین سنتتیک در شرکت های بزرگ شیمیایی به طور محدود، در محیط آزمایشگاهی از مواد پتروشیمی ساخته می شود. هر چند این ترکیب کاملاً منطبق با فرمول شیمیایی آستاگزانتین طبیعی ساخته می شود اما واقعا ساختار مولکولی متفاوتی با آستاگزانتین طبیعی دارد و انتهای آستاگزانتین طبیعی همیشه با اسیدهای چرب جفت شده است و این امر باعث استری شدن مولکول آستاگزانتین طبیعی می شود (علیزاده، ۱۳۹۰). بنابراین توصیه می شود که تا حد امکان از رنگدانه های گیاهی در جیره غذایی ماهیان استفاده شود (غیاثوند و شاپوری، ۱۳۸۸). این مطالعه نشان داد که منابع گیاهی هر کدام مقدار قابل توجهی از کاروتنوئیدها را به گوشت، پوست و فاکتورهای خونی ماهیان انتقال داد و باعث افزایش رشد، بازماندگی، رنگ پذیری و سیستم ایمنی بدن در تمام طول پرورش شدند. لذا کاروتنوئیدهای گیاهی به علت داشتن اثرات مفید ذکر شده و سهولت تهیه آن ها می تواند جایگزین کاروتنوئیدهای مصنوعی گردند و کاروتنوئیدهای مورد نیاز انسان را تامین نمایند.

## سپاسگزاری

بدینوسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مسئولین محترم آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر فدایی رشت ابراز می دارند.

## منابع

- امانی نژاد، پ.، عمادی، ح.، امتیاز جو، م. و حسین زاده صحافی، ه. (۱۳۸۸) بررسی اثر جلبک دونالی یلا (*Dunaliella salina*) بر تغییرات شاخص های ایمنی (کمپلمان و پراکسیداز) در ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی و پژوهشی بیولوژی دریا: ۲۱-۳.
- بازیار لاکه، ا.م.، احمدی، م.ر. و مجازی امیری، ب. (۱۳۸۴) بررسی تاثیر آستاگزانتین جیره غذایی بر ذخیره آستاگزانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران ۱: ۱۲۳-۱۱۳.
- زمان پور، م.، دارمی پوران، م.ر. و ایزدی، غ.ج. (۱۳۸۴) بررسی مناسب ترین روش برای تکثیر و پرورش گاماروس به عنوان غذای زنده در تغذیه ماهی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس: ۷-۱.
- ستاری، م. (۱۳۸۱) ماهی شناسی (۱)، تشریح و فیزیولوژی، انتشارات نقش مهر با همکاری دانشگاه گیلان، صفحه ۶۵۹.
- شاهسونی، د.، مهری، م. و تقوایی مقدم، ا. (۱۳۸۶) تعیین مقادیر برخی از سرم خون فیل ماهی خاویاری. مجله تحقیقات دامپزشکی ۳: ۱۲۹-۱۲۱.

- صیاد بورانی، م.، مقصودیه کهن، ح.، صیاد بورانی، م.، زحمتکش کومله، ع.، ولی پور، ع.، دقیق روحی، ج. و عموزاده عمرانی، م. (۱۳۹۱) بررسی امکان پرورش ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در تراکم های مختلف با استفاده از آب دریای خزر. مجله توسعه آبی پروری ۲: ۴۷-۵۵.
- عامری مهابادی، م. (۱۳۷۸) روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۲۶ صفحه.
- علیزاده، م. (۱۳۹۰) تاثیر کاربرد آستاگزانتین سنتتیک و طبیعی بر سلامت و بهداشت مولدین قزل آلالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - ایستگاه تحقیقات ماهیان آب های شور داخلی بافق، ۷۶ صفحه.
- غیاثوند، ز. و شاپوری، م. (۱۳۸۸) تاثیر رنگدانه های طبیعی و مصنوعی و مقایسه اثر آن ها بر ماهی اسکار سفید (*Astronotus ocellatus* sp.). مجله بیولوژی دریا: ۷۸-۸۵.
- قبادی، ش. و خدابخش، ا. (۱۳۹۲) اثر رنگدانه گیاهی لوتئین بر فاکتورهای رشد، تغذیه، بقا و رنگ پذیری گوشت ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). مجله علمی-پژوهشی زیست شناسی دریا ۱۸: ۶۱-۷۰.
- مبلی، م. و پیراسته، ب. (۱۳۷۳) تولید سبزی. دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۷۷ صفحه.
- ملایی، ز. و زرین فر، م. (۱۳۸۴) بررسی اثرات آستاگزانتین بر روی رشد و کیفیت ظاهری قزل آلالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه کارشناسی. دانشگاه آزاد اسلامی. لاهیجان.
- مهرابی، ی. (۱۳۷۸) مطالعه مقدماتی اثر بیهوشی گل درخت میخک روی ماهی قزل آلالی رنگین کمان. فصلنامه پژوهش و سازندگی: ۱۶۰-۱۶۲.
- وئوقی، غ. و مستجیر، ب. (۱۳۷۹) ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۱۳۸-۱۳۷.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. and Watanabe, T. (2000) Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Sciences* 66: 1068-1075.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2001) Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research* 32: 162-173.
- Ando, S., Osada, K., Hatano, M., and Saneyoshi, M. (1992) Metabolism of astaxanthin in muscle and ovary from brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Comparative Biochemistry and physiology* 96: 355-359.
- Asadi, F., Halajian, A., Pourkabir, M., Asadian, P. and Jadidizadeh, F. (2006) Serum biochemical parameters of *Huso huso*. *Comparative Clinical Pathology* 15: 245-248.
- Bahre kazemi, M., Soltani, M., Matinfar, A. and Abtahi, B. (2011) Biochemical and histological studies of over-ripened oocyte in the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*), *Iranian journal of fisheries sciences*: 33-48.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T. and Liaaen-Jensen, S. (2000) Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture* 91: 153-162.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. and Schlipalius, L.E. (2001) Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 32: 182-190.

- Buyukcapar, H.M., Yanar, M. and Yanar, Y. (2007) Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) with carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*) and red pepper (*Capsicum annum*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31(1): 7-12.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Donate Jimeno, C., Vardanis, P. and Divanach, P. (2004) The effect of carotenoid sources on skin coloration of red Porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Europe Conference, Biotechnology for Quality, Barcelona, Spain*.
- Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O.J. and Waagbo, R. (1995) Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed semipurified diets with and without astaxanthin supplementation. *Journal of Fish Diseases* 18: 317-328.
- Ellis, A.E. (1977) *The Leucocytes of fish: A review fish biology magazine*.
- Erdem, M.E., Yesilayer, N. and Kaba, N. (2009) Effects of Organic and Synthetic Carotenoids on the Sensory Quality and Chemical Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of animal and veterinary advances* 8(1): 33-38.
- Gocer, M., Yanar, M., Kumlu, M. and Yanar, Y. (2006) The effects of red pepper, Marigold flower, and Synthetic Astaxanehin on pigmentation, growth, and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30: 359-365.
- Gupta, S.K., Jha, A.K., Pal, A.K. and Venkateshwarlu, G. (2007) Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes. *Natural product Radiance* 6(1): 46-49.
- Habibi, E., Kalbassi, M.R., Hosseini, S.J. and Qasemi, S.A. (2013) Feasibility of Identification of Fall and Spring Migrating Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) by Using AFLP Molecular Marker. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 241-248.
- Hajirezaee, S., Mojazi Amiri, B. and Mirvaghefi, A.R. (2010) Relationships Between the Chemical Properties of Seminal Fluid and the Sperm Motility Characteristics of Caspian Brown Trout, *Salmo Trutta Caspius* (A Critically Endangered Salmonid Fish). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 5(1): 27-31.
- Harpaz, S., Rise, M., Arad, S. and Gur, N. (1998) The effect of three carotenoid sources on growth and pigmentation of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition* 4: 201-208.
- Hung, S.S.O., Lutes, P.B. and Storebakken, T. (1989) Growth and feed efficiency of whitesturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub yearling at different feeding rates. *Aquaculture* 80: 147-153.
- Klontz, G.W. (1994) *Fish Hematology*. Pages 121-132 in Stolen JS, Fletcher TC, Rowley AF, Kelikoff TC, Kaattari SL and Smith SA, ed. *Techniques in Fish Immunology: SOS Publications*.
- Krayushkkin, L.S., Panov, A.A., Gerasimov, A.A. and Potts, W.T.W. (1999) Changes in Sodium, Calcium and Magnesium Ion Concentrations in Sturgeon (*Huso huso*) Urine and in Kidney Morphology. *Journal of Comparative Physiology* 165: 527-533.
- Marian, M.P. (2004) Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture* 237: 9-20.
- Martine, J.F., Gudina, E. and Barredo, J.L. (2008) Conversion of  $\beta$ -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or abifunctional by droxylase-ketolase protein. *BioMed Central*: 1-10.
- Mehrabi, Y., Saad, C.R.B. and Alimon, A. (2008) The effects of plant pigments on the growth and survival on rainbow trout fry until fingerling stage. *Ulusal Alabalik Sempozyumu*: 24-30.
- Nakano, T., Tosa, M. and Takeuchi, M. (1995) Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 1570-1573.
- Parry, G. (1958) Size and osmoregulation in salmonid fishes. *Nature* 181: 1218-1219.

- Patriche, T., Patriche, N., Bocioc, E. and Coadă, M.T. (2011) Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation – International Journal of the Bioflux Society* 4: 137-140.
- Radu, D., Oprea, L., Bucur, C., Costache, M. and Oprea, D. (2009) Characteristics of haematological parameters for carp culture and Koi (*Cyprinus carpio* Linneaus, 1758) reared in an intensive system. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 66: 1-2.
- Rehulka, J. (2000) Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 190: 27-47.
- Ronyai, A., Peteri, A. and Radics, F. (1990) Cross breeding of starlet and lena river sturgeon. *Aquaculture* 6: 13-18.
- Segner, H., Arend, P., Von Poepplinghausen, K. and Schmidt, H. (1989) The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of the liver. *Aquaculture* 79: 381-390.
- Sigurgisladottir, S., Torrissen, O., Lie, Q., Thomassen, M. and Hafsteinsson, H. (1997) Salmon quality: methods to determine the quality parameters. *Reviews in Fisheries Science* 5: 233-52.
- Siwicki, A.K. and Anderson, D.P. (1993) Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (T-Ig) levels in serum. *Fish Diseases Diagnosis and Prevention's Methods*. FAO-Project GCP/INT/526/JPN, IFI Olsztyn: 105-112.
- Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L. (2005) Effect of *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248: 207-216.
- Tacon, A.G.J. (1991) Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Progressive Fish-Culturist* 43: 205-208.
- Talebi, M., Khara, H., Zoriehazhara, J., Ghobadi, Sh., Khodabandelo, A. and Mirrasooli, E. (2011) The Effects of Lutein on Growth and Blood Factors of Rainbow Trout. *International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences*, 17-18 December, Pattaya, Thailand.
- Talebi, M., Khara, H., Zoriehazhara, J., Ghobadi, Sh., Khodabandelo, A. and Mirrasooli, E. (2013) Study on Effect of Red Bell Pepper on Growth, Pigmentation and Blood Factors of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Journal of Zoology* 8 (1): 17-23.
- Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R. (2007). Hematological and biochemical reference intervals for farmed Channel catfish. *Journal of Fish Biology* 71: 383-388.
- Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R. (2010) Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid Tambacu (*P. mesopotamicus* × *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira Goiânia* 11(2): 363-368.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J. and Izquierdo, M.S. (2011) Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition* 17(2): 223-233.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D., Scott, T.M. and Stone, F.E. (1996) Effect of Dietary Lipid on Apparent Digestibility Coefficients for Canthaxanthin in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 88: 351-362.
- Wozniak, M. (1996) The Role of Carotenoids in Fish. *Protectio Aquarum ET Piscatoria* 22: 65-75.



---

**Effects of astaxanthin, red and orange pepper on growth, coloration, hematological and immunology factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*)**M .KasAlipour<sup>1</sup>, H. Khara<sup>2\*</sup>, A.Sadeghpour<sup>3</sup>

Received:2017.9.21

Accepted:2019.11.9

**Abstract**

Some salmonids have red meat because of the fat-soluble pigments placed in carotenoid groups. Therefore, the effect of astaxanthin pigment, red pepper and orange pepper on growth, coloration, hematological and immunology factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) were studied. This study carried on 300 fish 10 treatments and 3 replications. Diets consisted of 35, 40, 45 ppt (Astaxanthin), 33, 44, 55 ppt (red pepper) and), 33, 44, 55 ppt (orange pepper), respectively. During the period, biometric, bled and their meat was evaluated. 45 ppt astaxanthin treatment had the most change in the color of the meat. Based on the results, the most final weight of body, %BWI, obesity rates, GR, SGR and survival rate belonged to 55 ppt red pepper treatment ( $P<0.05$ ). The lowest and the most amount of FCR belonged to 55 ppt red pepper treatment and control group and the differences were significant ( $P<0.05$ ). The most number of red blood cells, number of white blood cells, hemoglobin, hematocrit, neutrophil and lymphocyte belonged to 45 ppt astaxanthin treatment and had significantly difference with control group ( $P<0.05$ ). The results of immunology factors showed that the most amount of lysozyme and total immunoglobulin belonged to 55 ppt orange pepper treatment and the most amount of IgM to 55 ppt red pepper treatment and they were significantly different with control group ( $P<0.05$ ). Therefore, it can be concluded that plant sources increased growth and immune system resistance in fish and due to the economical efficiency and beneficial effects of that, synthetic pigments can be replaced by plant sources..

**Keywords:** Caspian Sea salmon, astaxanthin, red pepper, orange pepper, hematological and immunology factors, growth, coloration.

---

1-M.Sc. Graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

2-Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

\* (Corresponding author: h.khara1974@yahoo.com )

3-Coach, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

# اثر زیره سیاه بر فاکتورهای آنتی اکسیدانی و پارامترهای استرس اکسیداتیو در رت‌های مواجه شده با ۱ و ۲- دی متیل هیدرازین

ابوالفضل دادخواه<sup>۱\*</sup>، فائزه فاطمی<sup>۲</sup>، سالومه دینی<sup>۳،۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

## چکیده

در این تحقیق، تاثیر کاربرد پودر و اسانس زیره سیاه با دوز ۰/۲ درصد (w/w) در مهار ایجاد سرطان کولون القاء شده با دی متیل هیدرازین (DMH) بر روی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکوتاتیون احیا (GSH)، پراکسیداسیون لیپید (LP) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) و همچنین تغییرات پاتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تزریق DMH باعث افزایش GSH و FRAP و کاهش SOD گردید. در حالیکه تیمار رت‌ها با اسانس و پودر زیره سیاه تاثیری بر روی بهبود پارامترهای بیوشیمیایی نداشته است، نتایج پاتولوژی تاثیر مثبت تیمارها را در روند سرطانزایی نشان دادند. لذا با توجه به نتایج به دست آمده، فعالیت ضد سرطانی اسانس و پودر زیره سیاه، احتمالاً مربوط به اثرات آن در مسیرهای دیگر متابولیکی (غیر از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو) می باشد.

## واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، دی متیل هیدرازین، زیره سیاه، سرطان کولون

## مقدمه

سرطان کولورکتال، گسترش سرطان در کولون یا رکتوم می باشد که هر ساله بیش از یک میلیون مورد جدید از آن در سراسر جهان تشخیص داده می شود (Tenesa & Dunlop, 2009). سرطان کولون چهارمین علت مرگ و میر سرطان در سراسر جهان و یک پنجم کل موارد سرطان را در ایران تشکیل می دهد. اگر چه شیوع این بیماری در سن بالای ۵۰ سال می باشد، ولی امروزه جمعیت جوان کشور درصد بالایی از افراد مبتلا به CRC (colorectal cancer) را تشکیل می دهند (Ansari et al., 2006). تنها ۲۰ درصد از علل سرطان کولون مربوط به اختلالات ژنتیکی یا ارثی می باشد (Rustgi, 2007). فاکتورها و عادات رژیمی کم

۱- دانشیار بیوشیمی، گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.  
\*(نویسنده مسئول : dadkhah\_bio@yahoo.com)

۲- دانشیار بیوشیمی، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

۳- پژوهشگر، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۴- کالج مهندسی بیوسیستم و صنایع غذایی، آزمایشگاه مهندسی مشترک ملی و محلی فن آوری و تجهیزات غذایی هوشمند، آزمایشگاه اصلی جاجیانگ برای فرآوری محصولات غذایی، مرکز تحقیق و توسعه جاجیانگ فن آوری و تجهیزات غذایی، دانشگاه جاجیانگ، هانگژو ۳۱۰۰۵۸، چین

فیبر و پرچربی و گوشت قرمز، مصرف الکل، چاقی و اضافه وزن، مصرف دخانیات و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی در بروز CRC از عوامل مهم غیر ارثی به حساب می آیند (Harriss *et al.*, 2009).

۲ و ۱-دی متیل هیدرازین (DMH) یکی از آلاینده‌های زیست محیطی سمی و یک پروکارسینوژن قوی می باشد (Bobek & Galbavy, 2001)، که پس از تزریق ابتدا در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه می شود و متابولیت فعالی به نام متیل دیازونیوم تولید می کند که مسئول متیلاسیون DNA و ایجاد جهش در ژن بتاکاتنین است (Druckrey, 1970). این متابولیت در فاز II متابولیسم سموم توسط آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (GST) با گلوکوتاتیون ترکیب می شود. این فرایند منجر به افزایش حلالیت و تسریع دفع آن در ادرار و صفرا می گردد (Manju & Nalini, 2005). در شرایط عادی، O<sup>6</sup>-متیل گوانین (O<sup>6</sup>-MeG) با کمک آنزیم خاصی به نام MGMT (O<sup>6</sup>-Methyl Guanine DNA Methyl Transferase) از DNA برداشته می شود ولی این آنزیم به مقدار بسیار کم در بافت وجود دارد. در صورت در معرض قرار گرفتن مزمن عوامل متیله کننده، O<sup>6</sup>-MeG در DNA تجمع پیدا می کند و باعث تبدیل باز گوانین به آدنین می شود (Colussi *et al.*, 2001). مطالعات نشان داده اند که در سرطان کولورکتال DMH با کاهش شدید فعالیت MGMT و تشکیل O<sup>6</sup> MeG در DNA سلول های کولون منجر به تغییر تکثیر و تمایز سلولی در کولون دیستال و پروگزیمال و در نهایت ایجاد تومور می شود (Jackson *et al.*, 2003). مطالعات دیگر نشان داده است که فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز همراه با دیگر آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در رت های سرطانی تیمار شده با ۲ و ۱-دی متیل هیدرازین (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) کاهش می یابد (Devasena *et al.*, 2002; Srihari *et al.*, 2008).

امروزه، استفاده از داروهای مختلف ضدالتهابی و نیز داروهای شیمی درمانی یکی از موثرترین راه های درمان برای تومورهای متاستاتیک می باشد. اگرچه، علاوه بر عوارض ایجاد شده در طی دوره درمان توسط این داروها، مقاوم شدن همزمان سلول های سرطانی نسبت به داروهای مختلف، هنوز یکی از موانع بزرگ بر سر راه یک درمان موفق به شمار می رود (Gottesman (2002). از این رو به نظر می رسد که پیشگیری از این بیماری با دیگر روش های درمانی رژیم غذایی و داروهای گیاهی مورد استفاده در طب سنتی می تواند تأثیر بسزایی در بروز یا کاهش شدت آن داشته باشد. میوه ها، سبزیجات و فیبرهای موجود در رژیم غذایی با تحت تأثیر قرار دادن فلور روده خطر ابتلا به CRC را کاهش می دهند (Smith *et al.*, 2002). گیاهان دارویی ایرانی چون گلپر (Roshanaei *et al.*, 2017a, 2017b; Dadkhah *et al.*, 2016)، مرزه (Attaran *et al.*, 2015; Fatemi *et al.*, 2015)، آویشن شیرازی (Attaran *et al.*, 2018)، زیره سیاه (Dadkhah *et al.*, 2018) و گل محمدی (Dadkhah *et al.*, 2020) خاصیت محافظت کنندگی قابل توجهی را در مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده است. مصرف مواد غذایی با خاصیت محافظت کنندگی از جمله گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی نیز در ممانعت، به تأخیر انداختن و یا معکوس کردن

روند سرطانزایی نقش مهمی ایفاء می کنند (Swan & Ford, 1997). گیاهان دارویی نیز به علت دارا بودن مزیت‌های زیادی از جمله ارزان و قابل دسترس بودن و پذیرش بهتر به وسیله بیماران، برای درمان بیماری‌ها از جمله سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان دارویی که مورد مطالعه واقع شده است، زیره سیاه (Caraway) می باشد. زیره سیاه به عنوان داروی گیاهی سنتی و همچنین بصورت چاشنی در غذاها مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه غنی از املاح معدنی همچون آهن، مس، کلسیم، پتاسیم، منگنز و منیزیم است. زیره سیاه دارای خواص مدر، بادشکن، مقوی، زیادکننده شیر، قاعده‌آور، نیرودهنده، ضدکرم، هضم کننده، ضدتشنج، قابض، معرق و مقوی معده است. زیره به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجهی از ریزمغذی‌ها، املاح و مواد معدنی و انواع ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها خواص تغذیه‌ای و درمانی فوق‌العاده‌ای دارد

(Eddouks *et al.*, 2004; Lemhadri *et al.*, 2006). به همین دلیل امید برآن است بتوان از آن در درمان سرطان

استفاده نمود.

نتایج مطالعات پیشین ما نیز نشان داد که مصرف اسانس و عصاره استخراج شده از گیاهان دارویی ایرانی همچون آنغوزه (*Ferula assa-foedita*) و زرشک (*Berberis integerrima*) به واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی، به صورت چشمگیری سبب محافظت بافت کولون رت‌ها در برابر آسیب ناشی از ۱ و ۲-دی متیل هیدرازین شده است (Torabi *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2016). با توجه به مطالعات فوق و همچنین با توجه به تولید و اهمیت بالای گیاه دارویی زیره سیاه در کشورمان، در این مطالعه سعی بر آن است تا اثرات ضد سرطانی پودر و اسانس دانه‌های زیره سیاه در تعدیل آثار این ماده سرطان‌زا خطرناک مورد بررسی قرار گیرد و در این راستا فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بررسی و در نهایت مقایسه شود. بدین ترتیب با روشن شدن مکانیسم اثرات ضد سرطانی دانه زیره سیاه، می توان در آینده از این گیاه و ترکیبات گیاهی و طبیعی دیگر در پیشگیری از ایجاد سرطان توسط DMH و ترکیبات سرطان‌زا مشابه استفاده کرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه پودر و اسانس زیره سیاه

دانه زیره سیاه تازه محصول کرمان از بازار خریداری شد و مطابق با روش زیر، اسانس آن به وسیله دستگاه کلونجر تهیه گردید. در این روش، ۵۰ گرم از دانه‌ها توسط دستگاه میکسر تبدیل به پودر می شوند. سپس، دانه‌های پودر شده در بالن یک لیتری دستگاه ریخته شد و با افزودن ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۹۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس در قسمت نزولی دستگاه کلونجر، فاز روغنی جدا گردید. اسانس حاصل در یخچال یا فریزر پایدار است.

**۲-۲- تیمار حیوانات**

در این آزمایش حیوانات به صورت اتفاقی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل: EDTA ۱ میلی مولار به صورت S.C به مدت ۵ هفته، هفته‌ای ۱ بار هر بار ۰/۵ میلی لیتر، به حیوانات تزریق شد.

گروه DMH: DMH حل شده در EDTA به صورت S.C به مدت ۵ هفته، هفته‌ای ۱ بار هر بار در دوز mg/kg b.w ۲۰ و در حجم ۰/۵ میلی لیتر، به حیوانات تزریق گردید.

گروه تیمار با اسانس زیره و DMH: در این گروه DMH حل شده در EDTA در دوز ۲۰ mg/kg b.w همانند گروه DMH، به حیوانات تزریق شده و همزمان غذای حاوی ۲٪/درصد از اسانس زیره سیاه به مدت ۱۶ هفته به رت‌ها خوراندند شد.

گروه تیمار با پودر دانه زیره سیاه و DMH: در این گروه DMH حل شده در EDTA در دوز ۲۰ mg/kg b.w همانند گروه DMH، به حیوانات تزریق شده و همزمان غذای حاوی ۲٪/درصد (w/w) از پودر دانه زیره سیاه به مدت ۱۶ هفته به رت‌ها خوراندند شد.

بعد از ۱۶ هفته از رت‌های تیمار شده خون‌گیری و بافت کبد و کولون آنها جهت بررسی‌های هیستولوژیکی و بیوشیمیایی جدا گردید.

**۲-۳- بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت کولون**

۱۶ هفته بعد از شروع تیمار حیوانات، رت‌ها کشته شدند و بافت کولون آنها برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک جدا شد. تعداد کل aberrant crypt foci (ACF) در ۲ سانتی‌متر از انتهایی‌ترین بخش کولون (دیستال کولون) شمارش شدند. بدین منظور بلافاصله بعد از بیرون آوردن کولون، یک برش طولی از سکوم تا آنوس در روده زده شد و در محلول phosphate buffered saline (PBS) شسته شد. سپس، نمونه‌ها بین دو تکه کاغذ صافی ساندویچ شده و در محلول فرمالین بافر قرار داده شدند. بعد از آن نمونه‌ها در متیلن بلو (۰.۲ درصد در نرمال سالین) به مدت ۲ تا ۳ دقیقه رنگ آمیزی شدند و بر روی اسلاید میکروسکوپی قرار گرفتند (Bird, 1987). اسلایدهای تهیه شده به منظور مقایسه تغییرات بافتی در نمونه‌های مختلف توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند و عکس برداری شدند. تغییرات هیستوپاتولوژیکی توسط یک پاتولوژیست حیوانات آنالیز شد. تعداد ACF و AC (aberrant crypt) و نواحی هیپرپلازی مورد بررسی قرار گرفتند. AC‌ها از کریپت‌های نرمال اطرافشان توسط اندازه بزرگتر، دهانه شکاف خورده (Slit-like opening)، اپی‌تلیال ضخیم‌تر و تیره‌تر متمایز گردیدند. به منظور بررسی بیشتر موفولوژیکی ACF‌ها در مخاط کولون، پس از فیکس کردن بافت‌ها، و گذراندن مراحل آماده سازی بافتی و تهیه

بلوک‌های پارافینی، برش‌های نازکی به اندازه ۶ میکرومتر از آنها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی گردید. تغییرات هیپرپلاستیک از طریق شمارش تعداد سلول‌ها در هر ستون کریپتی (ارتفاع کریپت) ارزیابی شد. به منظور بررسی تغییرات دیسپلاستیک (dysplasia) و نئوپلاستیک (malignancy) در ACF، یک درجه بندی بر اساس تغییرات غیرطبیعی در هسته سلول‌ها (nuclear atypia) مورد توجه قرار گرفت که معیارهای این درجه‌بندی شامل طول، جهت قرارگیری و موقعیت هسته سلول‌ها نسبت به یکدیگر (stratification and elongation) و دست نخورده بودن غشاء پایه بود و به صورت خفیف، متوسط و شدید لحاظ گردید. تمام AC‌ها که درجات خفیفی از این تغییرات را نشان می‌دادند به عنوان ACF هیپرپلاستیک و AC‌هایی که تغییرات متوسط و شدید را نشان می‌دادند به عنوان ACF دیسپلاستیک تقسیم بندی شدند.

#### ۲-۴-۲- تست‌های بیوشیمی

۲-۴-۱- اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbitoric acid reactive substances) به عنوان محصول

##### پراکسیداسیون لیپیدها در هموژن بافت کبد

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman آمریکا و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. میزان TBARS به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها در هموژن بافت در ۵۳۰ نانومتر و با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری شد.

##### ۲-۴-۲- اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیاء (GSH) توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. در این کیت از روش آنزیمی، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز جهت تعیین GSH استفاده شده است. گروه سولفیدریل GSH با DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) واکنش و محصول زرد رنگ TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) تولید می‌شود. اندازه‌گیری میزان جذب TNB در ۴۰۵ نانومتر جهت تخمین میزان GSH در نمونه انجام می‌گیرد.

##### ۲-۴-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD) در کبد

فعالیت این آنزیم توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. در این کیت از نمک تترازولیوم برای اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپر اکسید استفاده شده است که توسط آنزیم گزانتین اکسیداز و هیپوگزانتین تولید می‌شود. قرائت جذب چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر انجام گردید.

#### ۴-۴-۲- اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت کبد

فعالیت این آنزیم توسط کیت اندازه گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می شود. در این کیت برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز از فعالیت پراکسیدازی آن استفاده شده است. در این روش، آنزیم کاتالاز در حضور مقادیر کافی از  $H_2O_2$  با متانل واکنش می دهد و فرمالدهید تولید شده توسط یک ترکیب کروموزن اندازه گیری می شود. جذب چاهکها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

#### ۴-۵-۲- اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP) (Benzie & Strain, 1996)

در این روش غلظت های مختلف از محلول استاندارد یون آهن  $Fe^{+2}$  با استفاده از محلول ذخیره آهن ۱۰۰۰ میکرو مولار تهیه می شود، سپس ۱۰ میلی لیتر از محلول کار FRAP در یک لوله آزمایش ریخته و ۵۰ میکرو لیتر از نمونه استاندارد و نمونه مجهول به آن افزوده می شود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}C$ ، جذب نوری کلیه نمونه ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت می گردد و میزان FRAP در نمونه های مجهول براساس منحنی استاندارد محاسبه می شود.

#### ۵-۲- آنالیز آماری

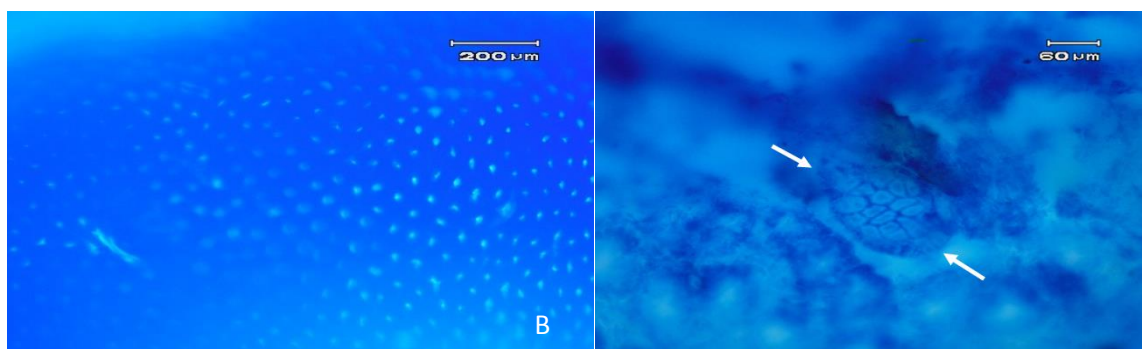
برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵ استفاده گردید. نتایج به دست آمده از این تحقیق توسط آزمون واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و به دنبال آن با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (برای هر تست بیوشیمیایی ۳ تکرار در نظر گرفته شد) گزارش شدند و مقایسه میانگین داده ها در سطح آماری  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد. علامت a بیانگر تفاوت معنی دار گروه DMH با گروه کنترل می باشد و علامت b بیانگر تفاوت معنی دار گروه های مختلف تیمار شده با اسانس و پودر زیره سیاه با گروه DMH می باشد.

#### ۳- نتایج

##### ۳-۱- تایید ایجاد سرطان کولون توسط دی متیل هیدرازین

مشاهده کریپت های (غدد روده ای) نابجا (AC) و تجمع کانونی آنها (ACF) در بررسی های هیستوپاتولوژیک، نشان دهنده القاء سرطان کولون می باشد. بررسی مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد که در گروه تیمار شده با DMH، کریپت های نابجا (AC) ۲ تا ۳ برابر بزرگتر از کریپت های نرمال اطرافشان هستند و دهانه شکاف خورده دارند (شکل ۱- A و B). در این گروه، بافت اپیتلیال کولون ضخیم ترند و نسبت به گروه کنترل (گروه ۱) رنگ متیلن بلو را بیشتر به خود می گیرند و نواحی اطراف

کریپت نیز در این گروه بزرگتر می‌شوند. در گروه تیمار شده با DMH به طور میانگین حدود ۸ عدد ACF مشاهده می‌شود که هر یک شامل ۴ عدد AC یا بیشتر در هر کانون می‌باشند (جدول ۱).



شکل ۱: ایجاد ACF در اثر تیمار با DMH (A: نمای توپوگرافیک از یک کریپت نرمال کولون (متیلن بلو×۱۰۰) (B) نمای توپوگرافیک از یک ACF (فلش‌ها) (متیلن بلو×۲۰۰) (Dadkhah et al., 2014)

پس از تیمار حیوانات با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه (گروه ۳ و ۴)، اندازه کانون‌های کریپت‌های نابجا (ACF) کوچکتر شده و هر کانون (ACF) شامل ۲ تا ۳ کریپت نابجا (AC) در مرکز خود می‌باشد. این نکته قابل ذکر است که تغییر شکل بافتی که نشانگر ضایعات پیش سرطانی در ضایعات مذکور است (دیسپلازی)، آدنوم و یا آدنوکارسینوم در بافت کولون رت‌های تحت تیمار در هیچکدام از گروه‌ها دیده نمی‌شود.

آنالیز کمی تعداد ACF و AC، نسبت AC/ACF و درصد مهار ACF در تمام گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمار حیوانات با اسانس زیره سیاه (۰.۲ درصد) منجر به کاهش معنی دار ( $P < 0.05$ ) تعداد ACF در بافت کولون می‌گردد (جدول ۱). درصد مهار ACF توسط اسانس و پودر زیره به ترتیب ۶۵٪ و ۸۰٪ می‌باشد. تعداد AC و نسبت AC/ACF نیز در هر دو گروه تیمار کاهش می‌یابد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۱: اثر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی ایجاد ACF (Dadkhah et al., 2014)

گروه‌ها	تعداد ACF	تعداد AC	نسبت AC/ACF	درصد مهار ACF
کنترل	۰	۰	۰	-
DMH	$8 \pm 2.2^a$	$6 \pm 2^a$	$0.84 \pm 0.1^a$	-
DMH + ۰.۲٪ اسانس	$2.8 \pm 0.5^b$	$0 \pm 0^b$	$0^b$	۶۵ <sup>b</sup>
DMH + ۰.۲٪ پودر	$1 \pm 0.4^b$	$1 \pm 0^b$	$1 \pm 1^b$	۸۰ <sup>b</sup>

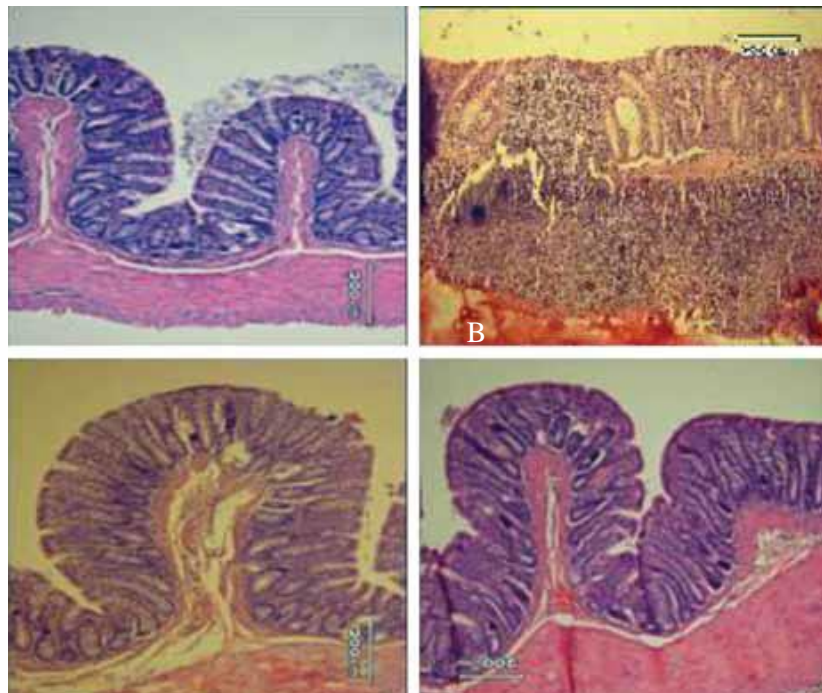
مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار ( $M \pm SEM$ ) گزارش شده‌اند. علامت a نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه DMH با گروه کنترل می‌باشد ( $P < 0.05$ ). علامت b نشان دهنده

تفاوت معنی دار گروه‌های مختلف تیمار با گروه DMH می‌باشد.



## ۲-۳- مشاهدات هیستوپاتولوژی تومورهای کولون القاء شده توسط دی متیل هیدرازین

در بافت کولون رت‌ها در گروه کنترل (گروه ۱)، غدد لیبرکون نرمال همراه با لایه‌های مخاطی و زیر مخاطی طبیعی مشاهده می‌شود (شکل ۲-ا). در این گروه، از لحاظ میکروسکوپی هیچ نوع نشانه‌ای از تشکیل ACF مشاهده نگردید. همچنین تغییرات نئوپلاستیک در این حیوانات به چشم نمی‌خورد. مطالعات هیستوپاتولوژی نشان داد که ACF فقط در بافت کولون در گروه تیمار شده با عامل سرطانزا (DMH) ایجاد گردیده‌است. همچنین ساختار غیر طبیعی و دیسپلازی در غدد لیبرکون نیز قابل مشاهده‌است. در این گروه، تهاجم سلول‌های سرطانی به لایه‌های عضلانی مشاهده می‌شود و ساختارهای شبیه به غدد سازمان یافته قابل ردیابی است. این گروه بافت اپیتلیال کولون ضخیم‌تری دارد به طوری که رنگ متیلن بلو را بیشتر به خود می‌گیرند (شکل ۲-ب). در گروه‌های تیمار (گروه‌های ۴ و ۳)، بافت کولون دارای مخاط طبیعی همراه با تجمع لنفوسیت‌ها می‌باشد. در این گروه‌ها غشای پایه و ماهیچه مخاطی تغییر قابل توجهی نداشته‌است. اندازه و شکل سلول‌ها نیز یکسان می‌باشد. بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داده‌اند که در این گروه‌ها تغییراتی در شکل و اندازه هسته‌ها و جهت و نحوه استقرار آنها نسبت به سلول‌ها و نسبت به یکدیگر ایجاد نشده بود (شکل ۲-ب و د). در مقایسه با گروه تیمار شده با DMH (گروه ۲) تعداد سلول‌ها در کریپت‌های نرمال (ارتفاع کریپت) کاهش یافته‌است. از نظر آسیب شناسی، این گروه‌ها تقریباً همه AC ها دارای مورفولوژی هسته‌ای نسبتاً نرمال هستند و فاقد تغییرات غیرطبیعی در هسته می‌باشند که به عنوان ACF هیپرپلاستیک قلمداد می‌شوند. در این گروه‌ها، آثاری از تشکیل AC ها مشاهده نمی‌شود که دارای تغییرات غیرطبیعی در هسته خود می‌باشند (ACF دیسپلاستیک) و غشای پایه نیز در هیچکدام از گروه‌ها آسیب ندیده‌است. مناطق محدودی از لایه مخاطی، ضخیم شده‌اند که همراه با نفوذ پراکنده از سلول‌های التهابی در لایه مخاطی می‌باشند. ذکر این نکته ضروری است که در تمام گروه‌های مورد مطالعه، سلول‌های paneth در اپیتلیوم AC ها به ندرت یافت می‌شوند. در هیچکدام از گروه‌ها، اثری از تهاجم و دست‌اندازی سلول‌های اپی‌تلیال به غشای پایه و لایه ماهیچه مخاطی وجود ندارد. در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشخص شد که هیچ توموری در هیچکدام از گروه‌های مورد مطالعه در طول دوره تیمار (۱۶ هفته) ایجاد نشده‌است.

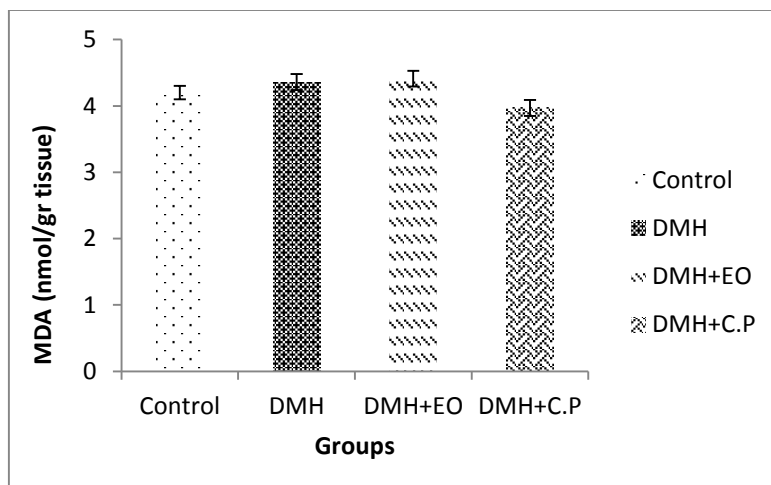


شکل ۲: (A) نمای میکروسکوپی از کولون نرمال (B) نمایی از کولون گروه تیمار شده با DMH (C) سیمای میکروسکوپی از بافت کولون رت‌های تیمار شده با اسانس زیره سیاه (D) سیمای میکروسکوپی از بافت کولون رت‌های تیمار شده با پودر زیره سیاه (Dadkhah *et al.*, 2014)

### ۳-۳- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی سطح پراکسیداسیون چربیها (LP)

نمودار ۳-۱ نشان می‌دهد که تزریق DMH بر روی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها تاثیری ندارد ( $P > 0.05$ ), و همچنین

استفاده از پودر و اسانس زیره سیاه تغییری در این پارامتر ایجاد نمی‌کند ( $P > 0.05$ ).

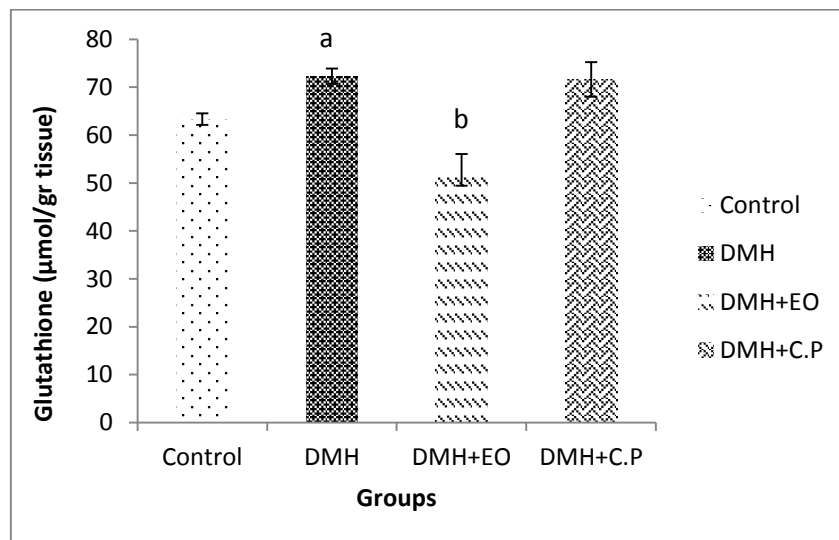


### نمودار ۳-۱: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی سطح MDA در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O (essential oil): دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، (caraway powder) DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه.

### ۳-۴- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه بر روی سطح گلوتاتیون احیاء (GSH)

نمودار زیر نشان می دهد که تزریق DMH به حیوانات باعث افزایش معنی دار در میزان GSH بافت کبد می گردد ( $P < 0.05$ ) و تیمار رت‌ها با اسانس زیره سیاه باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در سطح GSH بافت کبد گردیده است ( $P < 0.05$ ). حالیکه تیمار با پودر زیره سیاه هیچ تاثیری بر روی سطح GSH ندارد ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۲-۳).

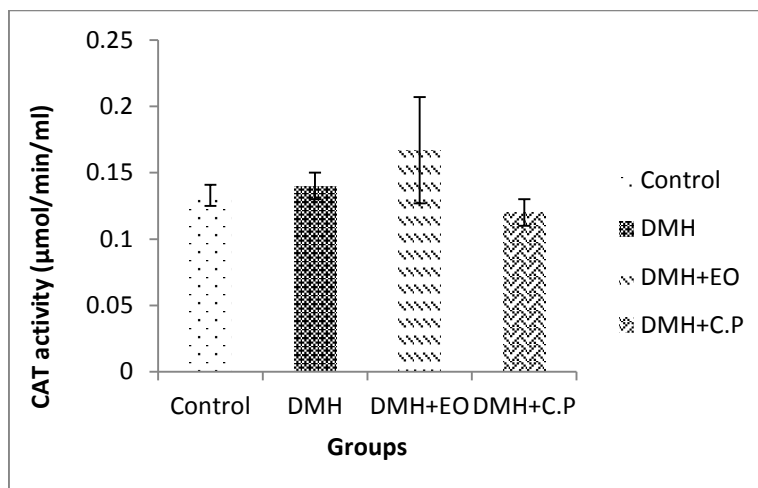


#### نمودار ۲-۳: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی مقدار GSH در کبد رت‌ها تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین + اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین + پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ). علامت b نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه های تیمار نسبت به گروه DMH می باشد ( $P < 0.05$ ).

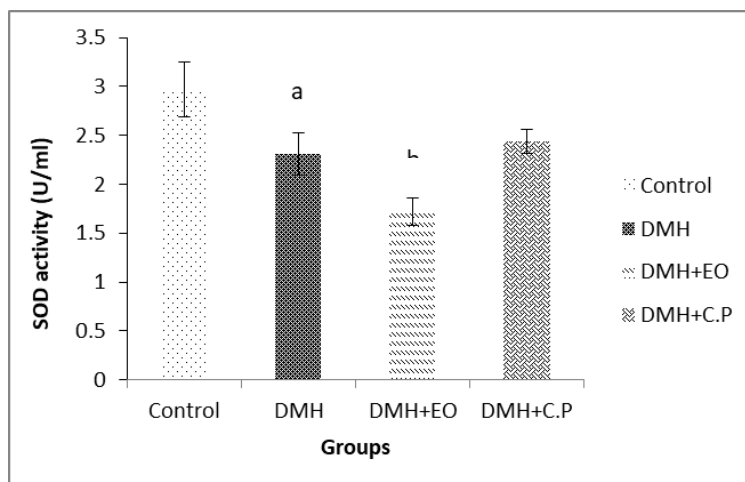
### ۳-۵- تاثیر پودر و اسانس زیره روی فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)

نمودار ۳-۳ نشان می دهد که تزریق دی متیل هیدرازین تغییری در میزان فعالیت آنزیم CAT ایجاد نکرد و تغذیه رت‌ها با غذای حاوی پودر و اسانس زیره سیاه نیز اثری بر روی فعالیت آنزیم مذکور در بافت کبد نداشته است ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۳-۳). همچنین، میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD بافت کبد در گروه تیمار شده با DMH به تنهایی کاهش معنی داری دارد ( $P < 0.05$ ) و تیمار رت‌ها با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه هیچ گونه تغییری معنی داری بر فعالیت SOD نشان نداد (نمودار ۳-۴).



### نمودار ۳-۳: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی فعالیت CAT در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه)



### نمودار ۳-۴: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی فعالیت SOD در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

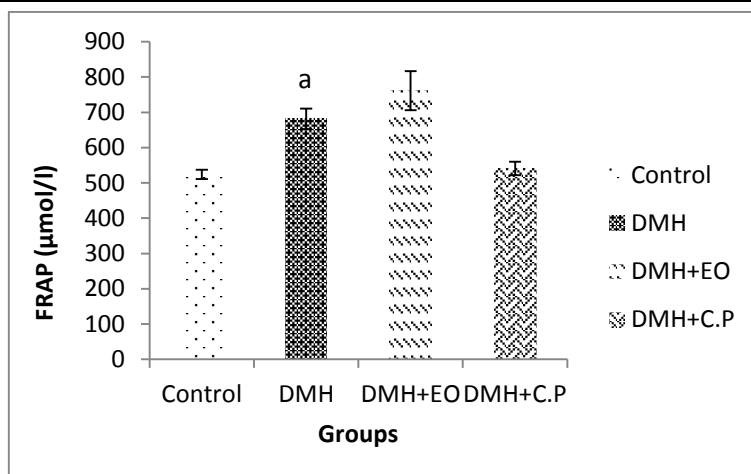
مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ). علامت b نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه های تیمار نسبت به گروه DMH می باشد ( $P < 0.05$ ).

### ۳-۶- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه بر روی سطح آنتی اکسیدانی توتال پلاسما (FRAP)

میزان آنتی اکسیدانی توتال پلاسما، در گروهی از رت‌ها که تنها ماده سرطان زای DMH دریافت کردند، افزایش معنی

داری داشته است ( $P < 0.05$ ). ولی تیمار رت‌ها با پودر و اسانس زیره سیاه هیچ‌گونه تغییری را در سطح FRAP پلاسما ایجاد

نکرده است ( $P > 0.05$ ) (نمودار ۳-۵).



#### نمودار ۳-۵: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی مقدار FRAP در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ).

#### ۴- بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعات *in vivo* نشان می دهد که تغذیه رت‌ها با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه به طور موثری باعث کاهش تعداد ACFها می‌شود که آسیب های پیش سرطانی بافت کولون، طی فرایند سرطانزایی القاء شده توسط DMH هستند. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که زیره سیاه یکی از گیاهان دارویی سنتی می باشد که دارای اثرات درمانی مختلف از جمله اثرات ضد سرطانی است (Kamaleeswari *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006). برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ اثرات ضد سرطانی زیره در موش تغذیه شده با دانه‌های زیره پودر شده به طور همزمان با تزریق DMH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه حیوانات با پودر زیره منجر به کاهش تعداد ACF ایجاد شده توسط DMH در بافت کولون می‌شود (Kamaleeswari *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006). با وجود این تحقیقات، در مورد مقایسه اثرات ضدسرطانی اسانس و پودر به دست آمده از دانه‌های زیره سیاه و به ویژه مکانیسم احتمالی خواص ضدسرطانی آن \_ از طریق تغییرات در سیستم دفاع استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدانی \_ مطالعه ای صورت نگرفته‌است. به همین دلیل در این تحقیق، نقش اسانس و پودر به دست آمده از دانه‌های زیره سیاه در تعادل سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در مدل سرطان کولون القاء شده توسط DMH در رت مورد بررسی قرار گرفته‌است.

DMH یک ماده سرطان زای محیطی است که پس از تزریق ابتدا در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه می شود و متابولیت فعالی به نام متیل دیازونیوم تولید می‌کند (Rijnkels & Alink, 1998; Fiala *et al.*, 1987)، این متابولیت فعال همانند دیگر رادیکال‌های آزاد دارای اثرات القاءکننده استرس اکسیداتیو هستند به گونه‌ای که باعث افزایش پارامتر دخیل در استرس اکسیداتیو و کاهش عوامل آنتی اکسیدانی می‌شود. دیگر مطالعات نیز اختلال آنتی اکسیدانی در حیوانات تیمار شده با

DMH را نشان می‌دهد، به عنوان مثال مطالعه ای نشان داده‌است که تزریق DMH به رت با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۵ هفته باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD)، در بافت کبد حیوانات شده‌است (Devasena *et al.*, 2002). همچنین مطالعه ای نشان داده است که تیمار رت‌ها با DMH در دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۵ هفته باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) در پلاسمای رت‌ها می‌گردد (Sengottuvelan *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006; Manju & Nalini, 2005). داده‌های این تحقیق، وجود ACF و در نتیجه الفاء سرطان کولون در رت‌های مورد مطالعه را تایید می‌کند. همچنین، نتایج تحقیقات ما نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با DMH با تغییر در پارامترهای دخیل در فرآیند استرس اکسیداتیو همراه می‌باشند (نمودارهای 2-3، 3-4، 3-5)، به گونه ای که همزمان با تغییر در میزان تشکیل ACF، تعادل سطح فاکتورهای دخیل در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در بافت کبد از جمله سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون (GSH) و ظرفیت آنتی اکسیدانی توتال پلاسما (FRAP) به هم می‌خورد، این امر به هم خوردن هموستاز سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهد. عدم تغییر در میزان TBARS (به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء) در بافت کبد رت‌های تیمار شده با DMH نشان‌دهنده عدم دخالت مستقیم فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها در تشکیل ACF/AC در بافت کولون می‌باشند. از سوی دیگر افزایش سطح گلوتاتیون همراه با FRAP در رت‌های تیمار شده با DMH نشان‌دهنده الفاء پذیری این فاکتورها است، بدین صورت که افزایش سطح آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی (GSH در کبد و FRAP در پلاسما) در پاسخ به DMH منجر به افزایش مقاومت و یا کاهش آسیب‌پذیری بافت کبد به حمله رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Manju & Nalini, 2005). بنابراین، نقش دو عامل آنتی اکسیدانی GSH و FRAP\_ در مهار افزایش LP را نمی‌توان نادیده گرفت. از سوی دیگر صرف نظر از قدرت آنتی اکسیدانی GSH، افزایش میزان گلوتاتیون سلولی در بافت کبد رت‌های حامل ACF دلالت بر نقش موثر آن به عنوان یک فاکتور انتخابی رشد سلول‌های سرطانی است که منجر به تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد (Manju & Nalini, 2005).

عوامل مهارکننده طبیعی سرطان از جمله گیاهان دارویی، دارای اثرات درمانی قابل توجهی بر روند ایجاد سرطان هستند. تاثیر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی تشکیل AC و ACF در سرطان کولون الفاء شده توسط DMH پس از ۱۶ هفته قابل توجه می‌باشد. نتایج این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد در میزان تشکیل ACF و AC در گروه‌های تیمار شده با DMH به تنهایی و گروه‌های تیمار شده با DMH و پودر و اسانس زیره سیاه، تفاوت معنی داری وجود دارد (جدول ۱) که نشان دهنده تاثیر اسانس و پودر در کاهش تعداد ACF و AC می‌باشد. مکانیسمی که اسانس و پودر زیره باعث مهار تشکیل ACF می‌شود، احتمالاً بخشی از آن به دلیل برگشت تعدادی از ACF‌ها به حالت نرمال و یا کاهش تکثیر سلولی در گروه‌های تیمار شده با زیره می‌باشد (شکل ۲-c). مطالعات دیگران نیز نتایج ما را مورد تایید قرار می‌دهد، برای مثال مصرف خوراکی (۸ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) ترکیبی به نام resveratrol (نوعی پلی فنل که از انگور استخراج شده است)، روزانه به مدت ۱۵ هفته،

باعث کاهش معنی دار تعداد ACF القاء شده توسط DMH در بافت کولون رت‌ها شده‌است. در این مطالعه، القاء سرطان همراه با کاهش سطح گلوکوتاتیون و مهار فعالیت آنتی اکسیدان کاتالاز، SOD، GST تحت تاثیر DMH در روده کوچک و بزرگ بوده و مصرف خوراکی resveratrol منجر به برگشت سطح پارامترهای فوق به حد گروه کنترل شده‌است (Sengottuvelan *et al.*, 2006). همچنین مصرف زنجبیل به صورت خوراکی (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) روزانه به مدت ۱۵ هفته توسط رت‌ها باعث کاهش تعداد و اندازه تومورهای القاء شده توسط DMH در کولون گردیده‌است. در این تحقیق مشخص شده‌است که تزریق DMH به صورت زیر پوستی (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۱۵ هفته منجر به افزایش سطح فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو نظیر لیپید هیدروپراکسید و پراکسیداسیون لیپیدها و مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالاز، SOD، گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون ردوکتاز) و همچنین کاهش سطح آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر GSH و ویتامین‌های A و C و E شده‌است. مصرف خوراکی زنجبیل علاوه بر کاهش اندازه و تعداد تومورها منجر به برگشت سطح پارامترهای فوق‌الذکر به سطح آنها در گروه کنترل شده‌است (Manju & Nalini, 2005). همچنین تیمار رت‌ها با اسانس سیاه دانه (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی روزانه به مدت ۱۴ هفته باعث مهار روند ایجاد سرطان کولون توسط DMH و کاهش معنی دار تعداد ACF در این حیوانات می‌گردد (Salim & Fukushima, 2003).

در تحقیق حاضر، نحوه تاثیر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی اکسیدانی در رت‌های تیمار شده نشان می‌دهد که این دو تیمار تأثیری در سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو و نیز سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نظیر SOD، CAT، LP، FRAP در بافت کبد و پلاسما ندارد (نمودارهای 1-3، 3-3، 3-4، 3-5). البته اسانس زیره قادر است افزایش سطح GSH توسط DMH را جبران کند (نمودار 2-3) که این امر احتمالاً نشان دهنده اثر زیره در کاهش و یا توقف تکثیر سلولی می‌باشد (Manju & Nalini, 2005). همچنین کاهش میزان GSH توسط اسانس می‌تواند نشان دهنده سم زدایی فعال متابولیت فعال DMH توسط آنزیم GST از طریق اتصال آن با GSH باشد. در پایان این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس و پودر دانه زیره سیاه دارای اثرات ضد سرطانی در مقابل آسیب‌های اولیه سرطان ناشی از DMH در بافت کولون می‌باشد. عدم تغییر در پارامترهای آنتی اکسیدانی، نشان می‌دهد این اثرات از طریق تعدیل سیستم دفاع استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیدانی نبوده و احتمالاً سیستم متابولیزه کننده DMH در این امر موثر می‌باشند که با نتایج مطالعات پیشین کاملاً مطابقت دارد (Dadkhah *et al.*, 2014). البته مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مکانیسم دقیق اثرات ضدسرطانی اسانس زیره در جلوگیری از روند ایجاد سرطان توسط DMH در بافت کولون مشخص گردد. بدین ترتیب با روشن تر شدن مکانیسم دقیق اثرات ضد سرطانی اسانس زیره سیاه، می‌توان در آینده از این ترکیب و ترکیبات گیاهی و طبیعی دیگر در پیشگیری و درمان سرطان استفاده کرد.

## منابع

- Ansari, R., Mahdavinia, M., Sadjadi, A., Nouraie, M., Kamangar, F., Bishehsari, F., Fakheri, H., Semnani, S., Arshi, S., Zahedi, M.J., Darvish-Moghadam, S., Mansour-Ghanaei, F., Mosavi, A., Malekzadeh, R. (2006). Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: Results of a population-based cancer registry. *Cancer Lett*, 18; 240 (1):143-7.
- Attaran, H.R., Fatemi, F., Rasooli, A., Dadkhah, A., Mohammadi Malayeri, M.R., Dini, S. (2018). Zataria multiflora essential oil prevent iron oxide nanoparticles-induced. Liver Toxicity in Rat Model. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1: 15-24.
- Attaran, H.R., Dini, S., Fatemi, F., Hesaraki, S., Parhizkarie, M., Dadkhaha, A. (2015). Hepatoprotective Evaluation of Iranian Satureja Rechingeri Essential Oils against Oxidative Injuries Induced by Acetaminophen in Wistar Rats. *Int. J. Rev. Life. Sci.*, 5: 204-210.
- Benzie, I.F.F and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.
- Bird, R.P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*, 37: 147-151.
- Bobek, P. and Galbavy, S. (2001). Influence of insulin on dimethylhydrazine induced carcinogenesis and antioxidant enzymatic system in rat. *Biologia*, 56: 287-291.
- Colussi, C., Fiumicino, S., Giuliani, A., Rosini, S., Musiani, P., Macrí, C., et al. (2001). 1, 2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2 (-/-) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1534-40.
- Dadkhah A, Fooladvand M, Fatemi F, Ashrafi-Helan J. (2014). Chemopreventive effects of caraway powder and oils to suppress 1, 2- dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Turk J Biochem*, 39(3): 260-269.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., Mohammadi Malayeri, M.R., Torabi, F., Sarbazi, M., Dini, S. (2018). Potential protective effect of pretreatment with caraway essential oil in vivo model of iron nanoparticle-induced liver injury. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 145-152.
- Dadkhah, A., Khalaj, Gh., Fatemi, F., Dini, S., Najj, S. Fadaee Monfared, M. (2016). Considering the effect of Golpar (*Heracleum Persicum*) essential oils on the acute hepatotoxicity induced by acetaminophen in Wistar rats. *Journal of animal research*, 29: 292-306.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., Mohammadi Malayeri, M. R., Karvin Ashtiani, M. H., Mosavi, Z., Najj, S., Dini, S., Ghorbani, N. (2020). The Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Rosa damascena* Mill. Essential Oil on the Lung Injury in the CLP Model. *Journal of Medicinal Plants*, in press.
- Deeptha, K., Kamaleeswari, M., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2006). Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. *Invest New Drugs*, 24: 479-488.
- Devasena, T., Rajasekaranb, K.N., Menona, V.P. (2002). Bis-1,7-(2-Hydroxyphenyl)-Hepta-1,6-Diene- 3,5-dione (A Curcumin Analog) ameliorates DMH-Induced hepatic oxidative stress during colon carcinogenesis. *Pharmacol Res*, 46: 39-45.
- Druckrey, H. (1970). Production of colonic carcinomas by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. In: Burdette WJ, ed. *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*. Springfield, IL: Charles C. Thomas 267-279.
- Eddouks, M., Lemhadri, A., Michel, J.B. (2004). Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 94: 143-148.
- Fatemi, F., Dadkhah, A., Akbarzadeh, K., Dini, S., Hatami, S., Rasooli, A. (2015). Hepatoprotective Effects of Deuterium Depleted Water (DDW) Adjuvant with Satureja rechingeri Essential Oils. *Electronic Journal of Biology*, 11(2):23-32.



- Fiala, E.S., Sohn, O.S., Hamilton, S.R. (1987). Effects of chronic dietary ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and methylazoxymethanol induced DNA methylation in the rat colon and liver. *Cancer Res*, 47: 5939-43.
- Gottesman, M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2: 48-58.
- Harriss, D.J., Atkinson, G., Batterham, A., George, K., Cable, N.T., Reilly T., Haboubi, N., Renehan, A.G. (2009). Colorectal Cancer, Lifestyle, Exercise and Research, Group. "Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity". *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 11: 689-701.
- Jackson, P.E., O'Connor, P.J., Cooper, D.P., Margison, G.P., Povey, A.C. (2003). Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, 24: 527-33.
- Kamaleeswari, M., Deeptha, K., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2006). Effect of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 214: 290-96.
- Lemhadri, A., Hajji, L., Michel, J.B., Eddouks, M. (2006). Cholesterol and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 106: 321-326.
- Manju, V and Nalini, N. (2005). Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine induced colon cancer. *Clin Chim Acta*, 358: 60-67.
- Mohammadi Malayeri, MR., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini, S., Torabi, F., Tavajjoh, MM., Rabiei, J. (2016). Chemotherapeutic effect of *Berberis integerrima* hydroalcoholic extract on colon cancer development in the 1,2-dimethyl hydrazine rat model. *Z Naturforsch C J Biosci*, 71: 225-32.
- Rijnkels, J.M and Alink, G.M. (1998). Effects of a vegetables-fruit mixture on liver and colonic 1,2-dimethylhydrazine-metabolizing enzyme activities in rats fed low- or high-fat diets. *Cancer Lett*, 128: 171-5.
- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21: 2525-2538.
- Roshanaei, K., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini S. (2017a). The Protective Effects of Iranian Golpar (*Heracleum persicum*) Essential Oil in Liver Damages Induced by CCl<sub>4</sub> in Wistar Rats. *Journal of Medicinal Plants*.1:110-122.
- Roshanaei, K., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini, S. (2017b). *Heracleum persicum* Essential oil administration in CCL<sub>4</sub> treated Rat sustains antioxidant / oxidative stress statue. *Advances in Bioresearch*. 8: 93-101.
- Salim, E.I and Fukushima, S. (2003). Chemopreventive potential of volatile oil from black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 45: 195-202.
- Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., Nalini, N. (2006). Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760: 1175-1183.
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., et al. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS*, 99: 9433-9438.
- Srihari, T., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2008). Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J Pharm Pharmacol*, 60: 787-94.
- Swan, D.K and Ford, B. (1997). Chemoprevention of cancer. Review of the literature. *Oncology Nursing Forum*, 24: 719-727.

- 
- Tenesa, A., Dunlop, M.G. (2009). New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, 10: 353-358.
- Torabi, F., Dadkhah A., Fatemi, F., Dini, S., Taghizadeh, M., Mohammadi Malayeri, MR. (2015). Prevention and therapy of 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis by *Ferula assa-foetida* hydroalcoholic extract. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40: 390-400.

---

## Effects of *Carum carvi* L. on Antioxidant status and oxidative stress parameters in rats exposed to 1, 2-dimethyl hydrazine

A. Dadkhah<sup>1\*</sup>, F. Fatemi<sup>2</sup>, S. Dini<sup>3,4</sup>

Received: 2017.05. 8

Accepted: 2018.11.11

### Abstract

In the current study, the effect of usage of caraway powder and its essential oils at the dose of 0.2% (w/w) were studied on colon cancer prevention induced by dimethyl hydrazine (DMH) through the estimation of biochemical parameters including catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes, glutathione (GSH), lipid peroxidation (LP) and ferric reducing ability of plasma (FRAP) as well as histopathological changes. The results showed that the levels of GSH and FRAP were increased and SOD activity was decreased by DMH. Even though caraway powder and its essential oils failed to alter the tested biochemical parameters, histopathological analysis indicated improved effects in carcinogenesis. Therefore, the results demonstrated that the chemopreventive effects of the treatments were due to the other metabolic pathways than oxidative stress/antioxidant systems.

**Key words:** Colon cancer, *Carum carvi* L., Oxidative stress, Dimethyl hydrazine.

---

1 -Department of Medicine, Faculty of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

\*( Corresponding Author: dadkhah\_bio@yahoo.com)

2-Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

3-Young Researchers and Elite Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

4- College of Biosystems Engineering and Food Science, National-Local Joint Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang R & D Center for Food Technology and Equipment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

## بررسی محتوای برخی از متابولیت‌های ثانویه و اثر آللوپاتیک اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*) بر یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*)

عبدا... عطائی<sup>۱</sup>، ابراهیم غلامعلی پور علمداری\*<sup>۲</sup>، زینب اورسجی<sup>۲</sup>، علی راحمی کاریزکی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۰

### چکیده

معمولاً کاهش عملکرد در گیاهان زراعی ناشی از اثر رقابت و آللوپاتی علف‌های هرز است. هدف از این تحقیق، بررسی محتوای برخی از متابولیت‌های ثانویه و ارزیابی پتانسیل آللوپاتیک اندام‌های مختلف شاتره (*Fumaria parviflora*) بر صفات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌ای یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) بود. عصاره آبی اندام‌ها با استفاده از ۵ گرم نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و بر گیاهچه‌های ۷ روزه یولاف وحشی اعمال گردید. سنجش آکالوئیدها و فنل کل در اندام‌های مختلف شاتره نشان داد که برگ و گل از بیشترین میزان این ترکیبات نسبت به ریشه و ساقه برخوردار بودند. مطابق نتایج، ترکیبات آللوپاتیک اندام‌های شاتره اثر بازدارندگی متفاوتی را بر طول ریشه، طول گیاه، وزن تر و خشک بوته، سطح برگ، محتوای کلروفیل کل، کاروتنوئیدها و پروتئین یولاف وحشی داشتند. بیشترین اثر منفی بر صفات، به گل اختصاص داشت. به علاوه پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز یولاف وحشی تحت عصاره اندام‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت.

**واژه‌های کلیدی:** ترکیبات آللوپاتیک، سطح برگ، فعالیت کاتالاز، فنل کل، گایاکول پراکسیداز، وزن خشک بوته.

### مقدمه

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته شناسایی و مبارزه با علف‌های هرز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۲-استادیار ان گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

\* (نویسنده مسئول): eg.alamdari@gonbad.ac.ir

معمولاً کاهش عملکرد در گیاهان زراعی ناشی از اثر رقابت علف‌های هرز و آلودگای و یا هر دو است. رقابت به‌عنوان جزئی از دخالت، حاصل بر هم‌کنش افراد یک گونه گیاهی یا گونه‌های متفاوت در پاسخ به ذخیره محدود یک یا بیش از یک عامل محیطی است.

دگرآسیبی (آلودگای) نتیجه تولید مولکول‌های فعال زیستی (آلوشیمیایی‌ها) توسط گیاهان در حال رشد یا بقایای آن‌ها می‌باشد که ممکن است پس از تغییر شکل و ورود به محیط بر رشد و توسعه افراد همان گونه یا گونه‌های دیگر تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم بگذارد (Vyvyan, 2002; Machado, 2007). آلوشیمیایی‌ها به روش‌های مختلفی مانند شستشو از برگ‌ها (Leaching)، ترشح‌های ریشه‌ای (Exudation)، تجزیه توسط ریزجانداران (Decomposition) و تبخیر (Volatilization) از سطح تاج‌پوشش آزاد می‌شوند (Weir *et al.*, 2004). گزارش شده است که اگرچه ممکن است تمام اندام‌های گیاه حاوی مواد دگرآسیب باشند ولی برگ‌ها و ریشه‌ها از مهمترین منابع تولیدکننده ترکیبات دگرآسیب هستند (Justin *et al.*, 2012). اثر گذاری آلوشیمیایی‌ها بر رشد گیاهان می‌تواند شامل هر دو حالت تحریک کننده یا بازدارنده باشد (Ma *et al.*, 2011; Makoi & Ndakidemi, 2012). با این وجود در اغلب این تحقیقات به تأثیر آلوشیمیایی‌ها توجه بیشتری شده است. این ترکیبات آزاد شده توسط گیاهان دگرآسیب بر روی جوانه‌زنی، رشد، نمو و استقرار گیاهان پذیرنده (گیاهان هدف) اثر گذاشته و نقش مهمی در الگوی پوشش گیاهی و تولید محصولات زراعی ایفا می‌کنند (Gniazdowska & Bogatek, 2005; Elisante *et al.*, 2013). کروژ-ارتیگا و همکاران (Cruz-Ortega *et al.*, 2007) گزارش نمودند که آلوشیمیایی‌های آزاد شده از گیاهان دگرآسیب باعث افزایش انواع اکسیژن واکنش‌گر در گیاهان پذیرنده و در نتیجه فعال شدن یا تغییر در نحوه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند. رویش علف‌های هرز یکی از عوامل مهم محدود کننده محصول گیاهان زراعی می‌باشد. با این وجود، استفاده از علف‌کش‌های سنتزی صدمات جبران‌ناپذیری بر محیط زیست و سلامت انسان‌ها وارد می‌نماید. تاکنون تحقیقات مختلفی در مورد مدیریت علف‌های هرز با منشاء گیاهی انجام شده است. یکی از روش‌های پیشنهادی استفاده از توان بالقوه علف‌های هرز دگرآسیب با توانایی حذف علف‌های هرز و عدم اثر سوء بر محصولات زراعی می‌باشد. گزارش‌ها نشان داده است که تحقیقات در مورد اثر دگرآسیب علف‌هرز شاتره بر گیاهان به‌ویژه علف هرز یولاف وحشی بسیار اندک می‌باشد. آلا و همکاران (Ullah *et al.*, 2013) با بررسی اثر عصاره آبی اندام‌های ریشه، ساقه، برگ، میوه و کل اندام‌های علف‌هرز شاتره هندی (*Fumaria indica* L.) بر خصوصیات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای گندم، نخود، عدس و کلزا گزارش نمودند که عصاره آبی اندام برگ شاتره هندی بیشترین اثر بازدارندگی را بر خصوصیات جوانه‌زنی و رشدی گیاهان مورد بررسی به‌ویژه کلزا داشتند، به‌طوری‌که هیچ جوانه‌زنی در کلزا مشاهده نشد. این محققین علت این امر را به دلیل مقادیر بالای ترکیبات فنولیک اسیدها در عصاره برگ شاتره بیان نمودند.

جوبین و احمد ( Jabeen & Ahmed, 2009 ) گزارش نمودند که بقایای علف‌هرز شاتره هندی (*Fumaria indica*) دارای پتانسیل دگرآسیبی بر ظهور و رشد گیاهچه‌ای ذرت می‌باشند. محققان گزارش نمودند که شاتره هندی حاوی آلكالوئیدهایی از نوع فومیتوری، فنلیک اسیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، آنتراکینون‌ها، گلیکوزیدها، استروئیدها و تری ترپنوئیدها در اندام‌های مختلف خود می‌باشد ( Rao et al., 2007; Gupta et al., 2012 ). کوبایاشی (Kobayashi, 2004) اظهار داشت که مقدار مواد آلوپاتیک بسته به گونه گیاهی، اندام گیاهی و مرحله رشدی متفاوت است. علف‌هرز شاتره (*Fumaria*) گیاهی متعلق به خانواده Papaveraceae بوده که ۷ گونه آن در ایران موجود می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۵).

از مهمترین مواد مؤثر گیاه شاتره می‌توان از آلكالوئیدهای آن (فومارین، پروتروپین، آدولومیدیسین، پارفیومین، فوماریلین، کریپتوپین، استیلوپین، ۸-اکسوکوپتیسین، سانگوئینارین، کریپتوکاوین، اسکولرین تترایدرو کوپتیسین و مقدار اندکی از آلكالوئیدهای دیگر)، املاح پتاسیم (سیترات پتاسیم، سولفات پتاسیم و غیره)، اسید فوماریک، فومارامیدین، فوماریسین، فوماریفلورین، پارفومین و بیوکولین را نام برد (Suau et al., 2002). یولاف وحشی با نام علمی *Avena ludoviciana* Durieu که در ایران انتشار این گونه گسترده و دارای اهمیت زیادی است و در واقع گونه غالب این جنس در اکثر مناطق کشور به‌ویژه در مزارع غلات می‌باشد. همزمانی مراحل رشد، نیاز غذایی مشترک، پتانسیل تولید بذر بالا و بیوتیپ‌های مقاوم به علفکش‌ها از دلایل اصلی خسارت بالای این علف‌هرز به محصول گندم گزارش شده است (Kazzazi et al., 2005). شاتره یکی از علف‌های هرز سمج و مهم مزارع استان گلستان به‌ویژه غلات و کلزا بوده که از زیست توده تولیدی بالایی برخوردار می‌باشد، با توجه به مسئله مقاومت علف‌های هرز به علفکش‌های سنتزی و آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف این علفکش‌ها، شناسایی علف‌های هرز با خاصیت دگرآسیبی و میزان تاثیر آن بر علف‌های هرز دیگر لازم و ضروری است که این امر در توسعه علفکش‌ها با منشاء طبیعی با رویکرد عدم اثر سوء احتمالی بر گیاهان زراعی امری مهم به نظر می‌رسد. بررسی منابع نشان می‌دهد که تاکنون تحقیق چندانی پیرامون اثر دگرآسیبی علف‌هرز شاتره انجام نشده است، بنابراین هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی محتوای برخی از متابولیت‌های موجود در شاتره (*Fumaria parviflora*) و اثر دگرآسیبی اندام‌های مختلف آن بر مولفه‌های مورفولوژیکی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، اسمولیت‌سازی پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) در مرحله شروع پنجه‌زنی (۲۱ زادوکس) بود.

## مواد و روش‌ها

### موقعیت جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و آماده‌سازی آن‌ها

برای آزمایش، نمونه‌های علف‌هرز شاتره در مرحله گل‌دهی از سطح مزارع کلزا بخش مرکزی دهستان فجر روستای ایگدر سفلی شهرستان گنبدکاووس، با مختصات جغرافیایی ۵۵ درجه و ۱۵ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه عرض

شمالی و ۴۵ متر ارتفاع از سطح دریا، متوسط بارندگی ده ساله در حدود ۴۱۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالانه ۲۰ درجه سلسیوس، جمع‌آوری شد. در ابتدا نمونه‌های گیاهی مورد بررسی با کمک فلور رنگی ایران (قهرمان، ۱۳۷۳ و ۱۳۷۵) مورد شناسایی قرار گرفت. سپس اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره شامل ریشه، ساقه، برگ و گل به تفکیک از یکدیگر جدا گردید. جهت برداشتن گرد و غبار، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفتند. ابتدا نمونه‌های علف‌هرز شاتره در شرایط سایه، نیمه پژمرده و سپس تا رسیدن به وزن ثابت (Caceres, 2000)، در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شدند (Martinov *et al.*, 2007). نمونه‌ها توسط آسیاب با مش ۸ (تعداد مربع و یا ذرات الک در یک اینچ) پودر و تا قبل از استفاده در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند. ابتدا محتوای برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر آلکالوئیدها و فنل کل به روش استاندارد شیمیایی ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

### روش اندازه‌گیری محتوای آلکالوئیدها

مقدار ۰/۱ گرم از بافت خشک اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل شاتره تهیه شد. سپس دو میلی‌لیتر محلول اتانول اسید استیک (ترکیب ۹۰ به ۱۰ از اتانول به اسید استیک) همگن شدند. مخلوط همگن به فالكون منتقل، به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۴ ساعت روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. بعد از این مدت، مخلوط را از کاغذ صافی واتمن عبور و در حمام آب جوش با دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا محلول تبخیر شود و به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر برسد. سپس قطره قطره هیدروکسید آمونیوم (NH<sub>4</sub>OH) به محلول تغلیظ شده حاصل اضافه شد. پس از مشاهده رسوب، سانتریفیوژ (با سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) صورت گرفت. در مرحله بعدی فاز رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در اسید سولفوریک ۰/۱ مولار حل گردید. جذب نوری محلول در طول موج ۳۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S22 خوانده شد. در نهایت نتایج به صورت جذب در گرم وزن خشک نمونه (OD.g<sup>-1</sup>.DW) گزارش گردید (Harborne, 1973).

### روش اندازه‌گیری محتوای فنل کل

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت خشک اندام‌های مورد بررسی شاتره با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول داغ ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه)، مخلوط رویی در حمام آب جوش قرار گرفت تا نسبتاً غلیظ گردد. محلول غلیظ شده توسط آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول حاصل به حجم ۳ میلی‌لیتر رسید و در ادامه بر روی محلول به دست آمده، ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و پس از سرد شدن جذب نوری آن در طول موج ۶۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S22 قرائت شد. میزان فنل کل توسط منحنی

استاندارد گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد (Malick & Singh, 1980).

آزمایش اثر عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر صفات مورفولوژیکی (ریخت شناسی) و فیزیولوژیکی علف‌هرز یولاف‌وحشی در محیط کشت هیدروپونیک در آزمایشگاه علوم علف‌های هرز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۶ به شرح ذیل انجام شد.

### تهیه سوسپانسیون علف‌هرز شاتره

علف‌هرز شاتره حاوی آلکالوئیدها، فنل کل و فلاونوئیدها فراوان می‌باشد (Harries *et al.*, 2005)، لذا با توجه به حضور این آلوشیمیایی و دارا بودن عامل هیدروکسی (OH) و حلالیت آن‌ها در آب از عصاره آبی استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا سوسپانسیون ۵ درصد آبی [۵ گرم (وزنی): ۱۰۰ میلی‌لیتر (حجمی)] از اندام‌های علف‌هرز مورد بررسی تهیه (رجایی و همکاران، ۱۳۹۷) و بر روی دستگاه لرزاننده به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و در نهایت عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. عصاره حاصل از سوسپانسیون بر گیاهچه‌های ۷ روزه علف‌هرز یولاف‌وحشی (*Avena ludoviciana*) در محیط کشت هیدروپونیک در چهار لیتر محلول غذایی یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) که شامل ۹۱/۴ گرم نترات آمونیم، ۳۵/۶ گرم فسفات سدیم و ۷۱/۴ گرم سولفات پتاسیم، ۱۱۷/۳۵ گرم کلرید کلسیم و ۳۲۴ گرم سولفات منیزیم به عنوان عناصر درشت مغذی و ۱/۵ گرم کلرید منگنز، ۰/۰۷۴ گرم مولیدات آمونیم، ۰/۰۳۵ گرم سولفات روی، ۰/۹۳۴ گرم اسید بوریک، ۰/۰۳۱ گرم سولفات مس، ۷/۷ گرم کلرید آهن و ۱۱/۹ گرم اسید سیتریک به عنوان عناصر ریز مغذی به محیط کشت اضافه گردید.

### آماده سازی گیاهچه‌های یولاف وحشی تحت تاثیر عصاره آبی علف‌هرز شاتره در محیط کشت

#### هیدروپونیک

ابتدا بذور گواهی شده یولاف‌وحشی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و بذور توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد مورد شستشو قرار گرفت و سپس برای چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردید. بذورهای ضدعفونی شده این گیاهان در پتری جوانه زده و گیاهچه‌های ۷ روزه به ظروف حاوی محلول غذایی یوشیدا با pH=۵/۵ منتقل شدند. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. پس از اعمال تیمارها، گیاهچه‌ها به مدت دو هفته در این شرایط نگهداری شدند. گیاهچه‌های یولاف وحشی در دمای محیط  $25 \pm 3$  درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، اتاقت رشد با روشنایی ۱۴۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگهداری شدند (سلیمی و قربانلی، ۱۳۸۰؛ Cadho & Rajender, 1995). محلول یوشیدا به فاصله ۷ روز یکبار تعویض و تیمارها مجدداً با همان غلظت قبلی اعمال گردیدند (Enteshari &



(Ahrabi, 2011). میزان pH هر دو روز یکبار تنظیم شد. در انتهای آزمایش (شروع پنجه‌زنی: ۲۱ زادوکس)، برخی از پارامترهای رشد از قبیل طول ریشه، طول گیاه، سطح برگ (با دستگاه سطح برگ سنج Leaf area meter مدل Delta-t)، وزن تر و خشک اندام هوایی، اندازه‌گیری شد. برخی از صفات فیزیولوژیکی نظیر میزان کلروفیل a، b، کل، کارتنوئیدها، محتوای پروتئین اسمولیت سازشی پروتئین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز یولاف‌وحشی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

### روش اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل و کارتنوئیدها

مقدار ۰/۵ گرم از اندام‌های هوایی یولاف‌وحشی تازه در هاون چینی ریخته و با استفاده از نیتروژن مایع خرد گردید. سپس با ۲۰ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰ درصد کاملاً له گردید. در نهایت در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به بالن شیشه‌ای منتقل گردید. سپس مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت ریخته و نهایتاً به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئیدها مقدار جذب توسط اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S22 قرائت شد. محتوای رنگیزه کلروفیل a، b، کل (a+b) و کارتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه تازه به روش فرمول تغییر یافته آرنون برآورد شد (حسینی، ۱۳۸۶).

$$\text{Chlorophyll a} = [(19.3 \times A_{663}) - (0.86 \times A_{645})] V / 100W \quad (۱)$$

$$\text{Chlorophyll b} = [(19.3 \times A_{645}) - (3.6 \times A_{663})] V / 100W \quad (۲)$$

$$\text{Carotenoids} = [100 (A_{470}) - 3.27 (\text{mg chl a}) - 104 (\text{mg chl b})] / 227 \quad (۳)$$

$V$  = حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)،  $W$  = وزن تر نمونه بر حسب گرم،  $A$  = جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

### روش اندازه‌گیری محتوای پروتئین

۵۰۰ میلی‌گرم اندام تازه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد مخلوط و سپس مخلوط حاصل با سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه صاف گردید. ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل در لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۲ میلی‌لیتر اسید ناین هیدرین اضافه گردید. در ادامه ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه به‌خوبی تکان داده شد به‌طوری که لایه رویی زرد رنگ تولوئن نمایان گردید. سپس این لایه جدا و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S22 در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس مقدار پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تازه تعیین شد (Bates et al., 1973).

## اندازه‌گیری محتوای پروتئین

ابتدا سوسپانسیون ۱۰ درصد از نمونه خشک اندام‌ها با اتانول داغ ۸۰ درصد به‌طور جداگانه تهیه شد. پس از سانتریفیوژ، به فاز رسوب حاصل ۱۵ میلی‌لیتر معرف A (۴ میلی‌گرم کربنات سدیم + ۰/۸ گرم سود + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه و سپس سانتریفیوژ گردید. در ادامه ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره نمونه را برداشته و با آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر معرف C که از اختلاط معرف A و B (۱۲۵ میلی‌لیتر سولفات مس ۰/۵ درصد + ۲۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۱ درصد) اضافه شد. در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر معرف D (۱ میلی‌لیتر فولین + ۱ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه و در طول موج ۶۶۰ نانومتر قرائت شد میزان پروتئین اندام‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نمونه با استفاده از منحنی استاندارد (سرم آلبومین گاوی) تعیین شد (Lowry et al., 1951).

## تهیه عصاره آنزیمی

جهت رسیدن به حداکثر استخراج آنزیم در اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل یولاف وحشی، شرایط عصاره‌گیری با توجه به مولاریته و pH بافر، استاندارد گردید. بدین منظور، ابتدا یک گرم از هر یک از اندام‌های مورد بررسی جهت برداشتن گرد و غبار به مدت ۳۰ ثانیه مورد شستشو و سپس با کاغذ صافی خشک گردید. در ادامه ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سرد (حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر اتیلن دی‌امین تترا استیک اسید (EDTA)، ۱ درصد (W/V) پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، ۰/۵ درصد تریتون X-100 و ۲۰ درصد گلیسرول، که در pH=7/8 تنظیم شده است) به نمونه اندام‌ها اضافه و له گردید. مخلوط حاصل در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت تا محلول همگنی به‌دست آید. سپس محلول رویی با دقت جدا و به‌عنوان روشناور (حاوی تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌ها) استفاده گردید. تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد (جهت جلوگیری از شکست آنزیم‌ها) انجام شد (Kala, 2015).

## تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با توجه به اصلاح روش Aebi (۱۹۸۴) توسط علی سلطانی و همکاران (۱۳۹۱) انجام شد. مخلوط واکنش کاتالاز موجود شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=7)، ۱۰۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی می‌باشد. واکنش با افزودن  $H_2O_2$  آغاز شد و فعالیت آنزیم به‌وسیله میزان تخریب  $H_2O_2$  به کمک اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera- S22 در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه تعیین گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی  $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  برای  $H_2O_2$  محاسبه شد. یک واحد از فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای اکسیداسیون یک میکرومول  $H_2O_2$  در دقیقه در شرایط سنجش تعریف می‌شود.

$$25A = \epsilon bc$$

رابطه (۴)

در این معادله A: نقطه جذب، E: ضریب خاموشی، b: طول سل (1 cm)، c: غلظت کاتالاز، E: ۳۹/۴ میکرومول می‌باشد.

### تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۷۸۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH=۶/۶، ۹۰ میکرولیتر گایاکول ۱ درصد و ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد استفاده شد. مواد فوق را در بستر یخ در کووت ۱ میلی لیتری با یکدیگر مخلوط گردید و بلافاصله ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی استخراج شده از اندام های مورد بررسی که حاوی آنزیم های مورد بررسی است به طور جداگانه به کووت اضافه شد (Hemeda & Kelin, 1990). تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera-S22 در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین گردید. در محلول بلانک بجای عصاره آنزیمی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از قانون بیر- لامبرت و ضریب خاموشی محصول کاتالیز گایاکول پراکسیداز ( $26/6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه شد. سپس فعالیت آنزیمی بر حسب میکرو مول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد.

### تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول با pH=۷، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار،  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۰/۱۵ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به دنبال اکسیده شدن آسکوربیک اسید با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از آغاز واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربیک اسید ( $2/8 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) و رابطه  $A=εbc$ ، میزان آسکوربیک اسید بر جای مانده پس از ۲ دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آسکوربیک اسید را در یک دقیقه اکسید می نماید (Nakano & Asada, 1981). فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز به صورت تعداد میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2$  تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش گردید.

درصد تحریک کنندگی یا بازدارندگی (PLI) با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد (Amoo *et al.*, 2008).

$$\text{PLI} = [(R_2 - R_1) / R_1] \times 100 \quad \text{رابطه (۵)}$$

که در آن،  $R_1$  شاهد و  $R_2$  تیمار می‌باشد.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش‌های فیتوشیمیایی و کشت هیدروپونیک پس از آزمون نرمال سنجی، توسط نرم‌افزار SAS با نسخه ۹/۱ مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون کم‌ترین اختلاف معنی‌دار (Least Significant Difference) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

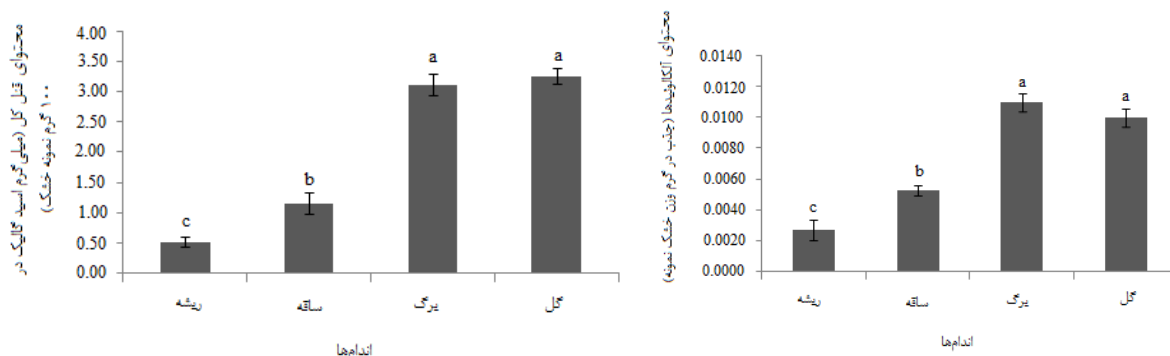
### ارزیابی محتوای آلکالوئیدها و فنل کل اندام‌های مختلف شاتره

نتایج نشان داد که اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل شاتره اختلاف معنی‌داری، در سطح احتمال یک درصد از لحاظ محتوای آلکالوئیدها و فنل کل داشتند (جدول ۱). بر اساس شکل‌های ۱ و ۲، بیشترین محتوای آلکالوئیدها و فنل کل به اندام برگ و گل شاتره به ترتیب به میزان ۰/۰۱۱۰ جذب در گرم وزن خشک نمونه و ۳/۲۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه تعلق داشت. این در حالی است که اندام ریشه شاتره از کمترین محتوای آلکالوئیدی و فنلی برخوردار بود. در تحقیقی گزارش شده است که اندام‌های مختلف شاتره به‌ویژه سرشاخه گل‌دار دارای حدود یک درصد آلکالوئیدها است که بیشتر این ترکیبات از مشتقات بنزیل ایزوکنیولین‌اند (زرگری، ۱۳۷۱). از دیگر ترکیبات شاتره می‌توان فنل‌ها، فلاونوئیدها و تانن‌ها را نام برد (McCalleu, 2002).

جدول ۱: تجزیه واریانس متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها و فنل کل اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

منبع تغییرات	درجه آزادی	محتوای آلکالوئیدها	محتوای فنل کل
تیمار	۳	۰/۰۰۰۰۵**	۵/۷۹**
خطا	۸	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۷
ضریب تغییرات	-	۱۳/۲۰	۱۲/۶۳

\*\* نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

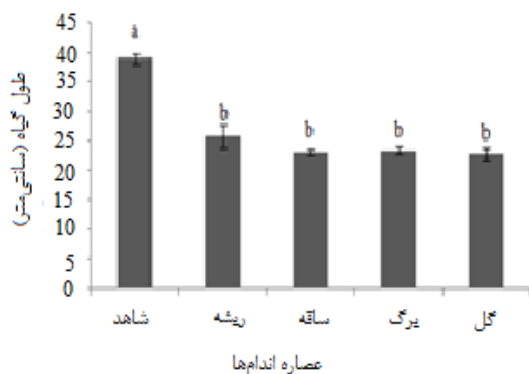


شکل ۱: مقایسه میانگین محتوای آلکالوئیدهای اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

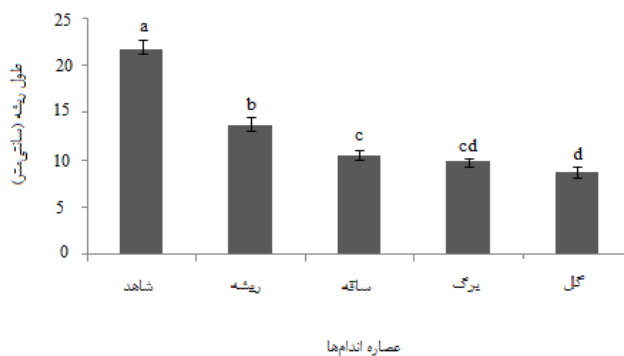
شکل ۲: مقایسه میانگین محتوای فنل کل اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

### اثر عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر صفات مورفولوژیکی یولاف وحشی

نتایج تجزیه واریانس بیانگر اختلاف معنی‌دار اثر عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر صفاتی نظیر طول ریشه، طول گیاه، وزن تر و خشک بوته و سطح برگ در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره اثر دگرآسیبی متفاوتی بر طول ریشه نشان دادند. بیشترین اثر دگرآسیبی به اندام گل (۵۹/۹۹ درصد) تعلق داشت که از لحاظ آماری با اندام برگ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در مقابل کمترین اثر منفی معنی‌دار تحت عصاره آبی اندام ریشه معادل ۳۳/۷۲ درصد به دست آمد (شکل ۳). مطابق شکل ۴، عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره، اثر دگرآسیبی معنی‌دار یکسانی بر طول گیاه یولاف وحشی نشان دادند. دلیل تاثیر یکسان ترکیبات آللوپاتیک ناشی از اندام‌ها بر طول گیاه احتمالاً می‌تواند به واسطه برهمکنش آلوشیمیایی‌های ناشی از اندام‌ها و یا تاثیرپذیری کم طول گیاه یولاف وحشی به مواد آللوپاتیک اندام‌های مختلف شاتره باشد. مهرپور و همکاران (۱۳۹۵) اظهار داشتند یکی از عوامل تاثیرگذار بر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، نوع اندام‌های گیاهی است به طوری که میزان متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است. در تحقیقی دیگر گزارش شده است که تفاوت در تأثیر بین اندام‌ها مربوط به حد آستانه غلظت آلوشیمیایی‌ها می‌باشد (Macias et al., 2007). کوهلی و همکاران (Kohli et al., 2001) بیان داشتند که واکنش‌های تحریکی یا بازدارندگی آلوشیمیایی‌ها به غلظت ماده شیمیایی دریافت شده توسط گیاه هدف بستگی دارد. این مطالعه هم‌چنین حاکی از تاثیرپذیری منفی بیشتر طول ریشه یولاف وحشی نسبت به طول اندام هوایی تحت مواد آللوپاتیک شاتره می‌باشد. چون ریشه اولین اندامی است که مواد آللوپاتیک را به طور مستقیم از محیط جذب می‌کند و ممکن است بیشتر تحت تأثیر ترکیبات آللوپاتیک قرار گیرند.



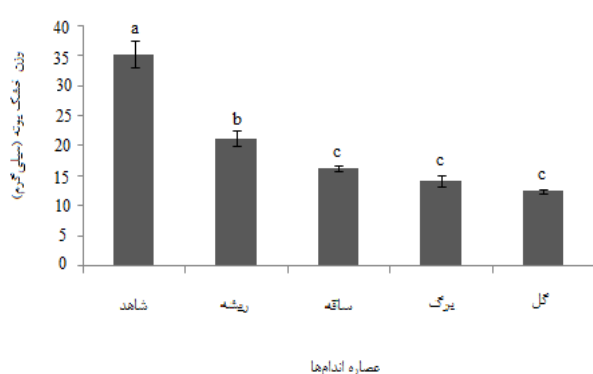
شکل ۴: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر طول گیاه یولاف وحشی.



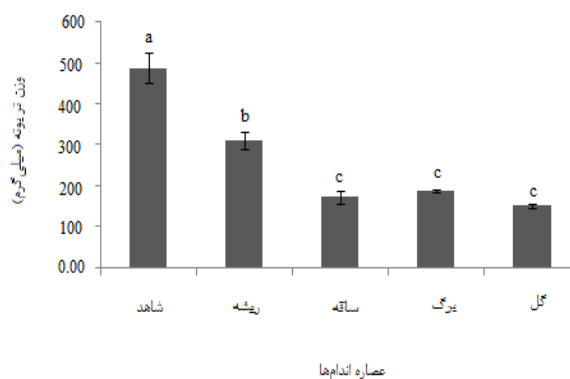
شکل ۳: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر طول ریشه گیاه یولاف وحشی.

بیشترین میزان وزن تر بوته یولافوحشی در تیمار شاهد (۴۸۸/۲۲ میلی گرم) به دست آمد و کاربرد عصاره آبی همه اندام‌ها موجب کاهش وزن تر بوته شد. بیشترین و کمترین اثر منفی به ترتیب مربوط به اندام گل و ریشه معادل ۶۸/۹۱ و ۳۶/۳۹ درصد بود (شکل ۵). نتایج در مورد وزن خشک بوته مشابه وزن تر بوته بود (شکل ۶). بازدارندگی بیشتر عصاره آبی گل و برگ بر وزن تر و خشک گیاهچه یولافوحشی می‌تواند به دلیل مقادیر بیشتر متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها و فنل کل و سمیت ناشی از آن‌ها در اندام‌های گل و برگ علف‌هرز شاتره باشد (شکل‌های ۱ و ۲) که پارامترهای وزن تر و خشک یولافوحشی را به شدت مورد حمله قرار می‌دهند. بر اساس نتایج، رابطه مثبت و معنی‌داری بین وزن خشک بوته علف‌هرز یولاف وحشی با وزن تر بوته، سطح برگ، میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها وجود داشت. اما همبستگی وزن خشک بوته با فعالیت آنزیم کاتالاز و پرولین منفی و معنی‌دار بود (جدول ۳). اصولاً گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی مختلفی را برای دفع یا کاهش گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از تنش را دارا می‌باشند. گونه‌های فعال اکسیژن با بیوملکول‌های فعال واکنش نشان داده و موجب اکسیداسیون آن‌ها می‌شوند. آنزیم کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم‌ها در گیاهان است که باعث شکسته شدن مولکول  $H_2O_2$  به آب و اکسیژن می‌گردد. محتوای پرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگار کننده نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلولی، پایدار کردن ساختار پروتئین‌ها و غشاء سلولی، جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، تنظیم pH سلولی و واکنش‌های اکسیداسیون و احیا، ایفا می‌نماید (Verbruggen, 2005; Hermons, 2008; Kavi Kishori et al, 2005). در مورد سطح برگ، بیشترین اثر دگرآسیبی معنی‌دار به اندام گل و برگ به ترتیب ۶۴/۵۴ و ۶۳/۰۴ درصد تعلق داشت. اندام ریشه از کمترین اثر منفی معادل ۲۴/۸۷ درصد برخوردار بود (شکل ۷). بر اساس نتایج، رابطه سطح برگ با تمام صفات مورد بررسی بجزء محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۲). این امر احتمالاً به‌واسطه اثر ترکیبات آللوپاتیک بر رشته‌های دوک و در نتیجه اختلال در استقرار کروموزوم‌ها و تقسیم سلولی می‌باشد. این عمل از طریق کاهش تعداد میکروتوبول‌های دوک سطح برگ و یا فعالیت غیر طبیعی آن‌ها انجام

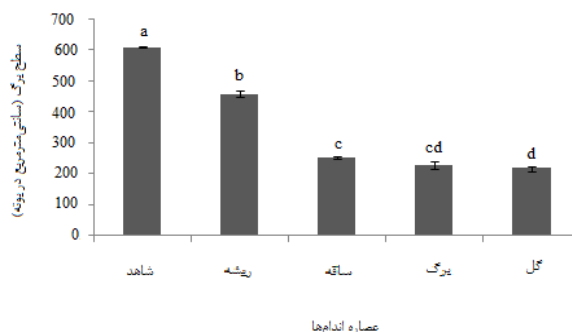
می‌شود. میقانی (۱۳۸۲) گزارش نمود برخی از آلكالوئیدهای ترپنی، تقسیم سلولی را کاهش می‌دهند و باعث افزایش قطر و کاهش طول سلول‌های ریشه و تشکیل هسته نامنظم در آنها می‌گردند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، عصاره آبی گل، برگ و ساقه شاتره، بیشترین تاثیر منفی بر سطح برگ یولاف وحشی در مقایسه با اندام ریشه نشان دادند. این نتیجه مطابق نتایج کلارک (Clarka, 2006); ناروال و تورو (Narwal & Tauro, 1996) می‌باشد. آنها گزارش نمودند که تجمع و نوع ترکیبات دگرآسیب در اندام‌های هوایی بیشتر از اندام ریشه می‌باشد.



شکل ۶: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر وزن خشک بوته گیاه یولاف وحشی



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر وزن تر بوته گیاه یولاف وحشی



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر سطح برگ بوته یولاف وحشی

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی یولاف وحشی تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

منبع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	طول گیاه	وزن تر بوته	وزن خشک بوته	سطح برگ در بوته	محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل b	محتوای کلروفیل کل	محتوای کارتنوئیدها
تیمار	۴	۸۴/۲۶**	۱۴۴/۱۹**	۵۹۵۹۶/۳۸**	۲۵۷/۵۸**	۹۱۹۸۱/۷۰**	۰/۰۹۱**	۰/۰۸۵**	۰/۳۴۵**	۰/۰۲۵*
خطا	۱۰	۰/۸۴	۴/۰۲	۱۲۵۹/۷۰	۴/۷۸	۲۱۷/۵۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۰۵
ضریب تغییرات(درصد)	-	۷/۰۹	۷/۴۷	۱۳/۵۵	۱۱/۰۰	۴/۱۹	۱۰/۱۴	۱۷/۸۶	۹/۶۹	۱۳/۱۳

\*، \*\* : به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد

ادامه جدول ۲: تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی یولاف وحشی تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره (*Fumaria parviflora*)

منبع تغییرات	درجه آزادی	محتوای پروتئین	محتوای پرولین	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
تیمار	۴	۱۰۰۲۲/۷۳**	۳/۹۰*	۷/۱۰**	۰/۰۸**	۰/۱۱**
خطا	۱۰	۱۱۹/۶۵	۰/۸۲	۰/۴۰	۰/۰۱	۰/۰۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۰/۷۲	۸/۳۵	۴/۵۳	۱۳/۴۴	۷/۳۰

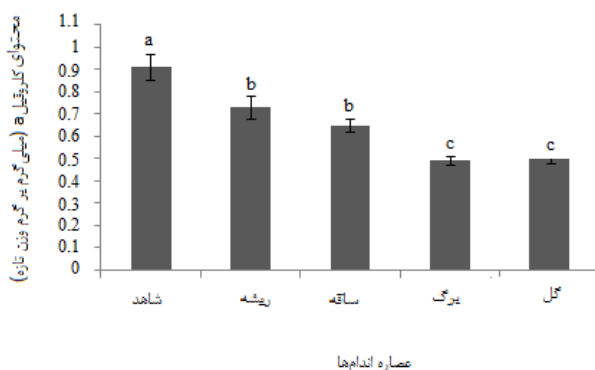
\*\*،\*: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد

### محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها

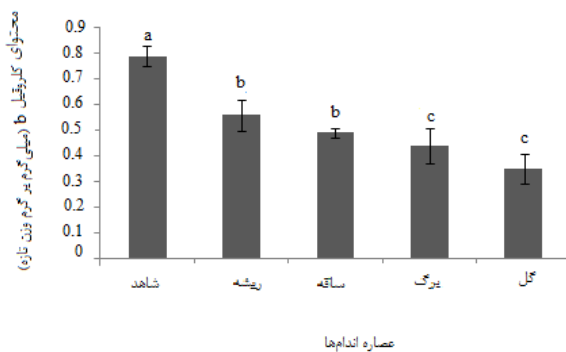
نتایج تجزیه واریانس بیانگر اختلاف معنی‌داری تحت اثر عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره بر رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها بود (جدول ۲). مطابق شکل‌های ۸، ۹ و ۱۰، محتوای کلروفیل a، b و کل یولاف وحشی تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره کاهش نشان داد. بیشترین اثر منفی بر محتوای این رنگیزه‌ها به ترتیب به اندام برگ، گل و گل به میزان ۴۶/۱۵، ۵۵/۷۰ و ۵۰/۲۹ درصد اختصاص داشت. اگرچه با برخی از اندام‌ها اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. مطابق نتایج، محتوای کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a، بیشتر تحت تاثیر ترکیبات دگرآسیب اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره قرار گرفت. کاهش رنگیزه کلروفیل b احتمالاً به دلیل کاهش نقش حفاظت نوری آن که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مهم در اندام کلروپلاست است. این مطالعه همسو با نتایج (Onsel et al., 2000) می‌باشد. آن‌ها گزارش کردند که مقدار زیادی از کلروفیل b موجود در کلروپلاست در کمپلکس‌های دریافت‌کننده نور در فتوسیستم II قرار دارد به طوری که در شرایط تنش، کمپلکس‌های دریافت‌کننده نور بیش‌تر آسیب می‌بینند که باعث کاهش شدید کلروفیل b در کلروپلاست و افزایش نسبت a به b خواهد شد. در اکثر گزارش‌های مربوط به دگرآسیبی، مهار رشد با کاهش در میزان کلروفیل کل همراه است که ممکن است نسبت به خسارات دیگر سلولی به دلیل تغییرات ایجاد شده در سطح سلولی و مولکولی یک اثر ثانویه باشد. ابو رحمان و همکاران (Abu-Romman et al., 2010) گزارش نمودند که کاهش سطح کلروفیل کل مربوط به کاهش بیوسنتز و یا افزایش تجزیه این رنگیزه‌ها است. ضرایب همبستگی پیرسون نشان داد که رابطه مثبت و معنی‌داری بین کلروفیل کل با میزان وزن تر و خشک بوته، سطح برگ، کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها وجود داشت. اما رابطه این صفت با میزان کاتالاز و پرولین منفی بود (جدول ۳).



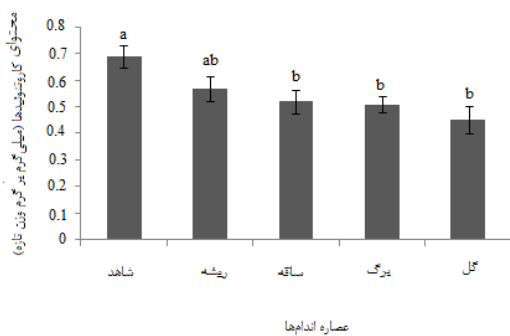
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان رنگیزه کاروتنوئیدها تحت عصاره آبی اندام ساقه، برگ و گل کاهش نشان داد. بیشترین کاهش مربوط به اندام گل بود که اختلاف این صفت با سایر اندام‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۱۱).



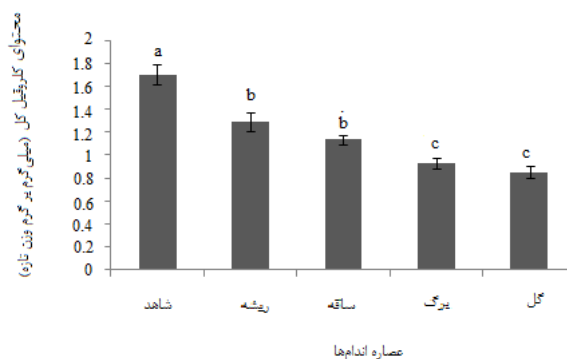
شکل ۸: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای کلروفیل a یولاف وحشی



شکل ۹: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای کلروفیل b یولاف وحشی



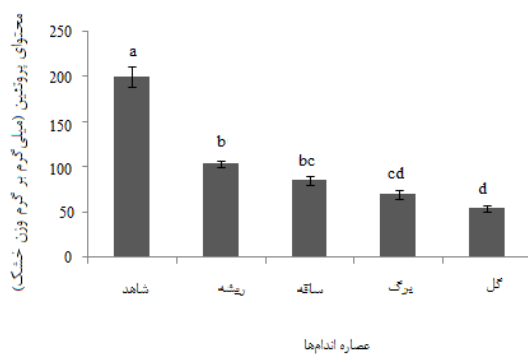
شکل ۱۰: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای کلروفیل کل یولاف وحشی



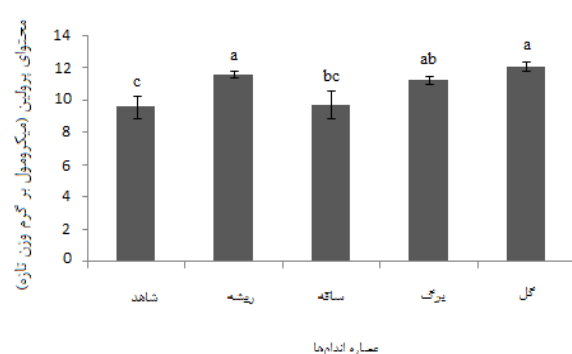
شکل ۱۱: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای رنگیزه کاروتنوئیدهای یولاف وحشی

## محتوای پروتئین و پرولین

نتایج به دست آمده نشان داد که تفاوت معنی داری بین اندام‌های مختلف شاتره از لحاظ تاثیر بر محتوای پروتئین و پرولین یولاف وحشی وجود داشت (جدول ۲). بر اساس نتایج، محتوای پروتئین یولاف وحشی تحت تیمارهای مختلف عصاره اندام‌های شاتره به‌طور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. بیشترین و کمترین کاهش به ترتیب به اندام گل و ریشه اختصاص داشت (شکل ۱۲). در مقابل عصاره آبی اندام‌های مختلف شاتره اثر افزایشی معنی دار و متفاوتی بر محتوای پرولین یولاف وحشی داشتند. بیشترین مقدار مربوط به اندام گل بود، اما تفاوت معنی داری با اندام برگ و ریشه نشان نداد (شکل ۱۳). مطابق نتایج، میزان پروتئین رابطه مثبت و معنی داری با وزن تر و خشک بوته، رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی نشان داد. بیشترین ضریب همبستگی به رنگیزه کلروفیل کل ( $r=0.948^{**}$ ) اختصاص داشت. اما همبستگی منفی و معنی داری بین پروتئین با آمینواسید پرولین و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز برقرار بود (جدول ۳). کو (Kao, 1981) اظهار داشت که افزایش غلظت اسید آمینه پرولین که به تنظیم اسمزی کمک می‌کند، ناشی از چند عامل گزارش شده است از جمله ممانعت از تجزیه پرولین، جلوگیری از ورود پرولین به پروتئین و یا افزایش تجزیه پروتئین که ممکن است با کاهش رشد همراه باشد. همچنین بیان شد که در برگ‌های بالغ تجزیه پروتئین‌ها باعث کاهش غلظت آن‌ها و در نتیجه افزایش اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین می‌شود.



شکل ۱۲: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای پروتئین یولاف وحشی

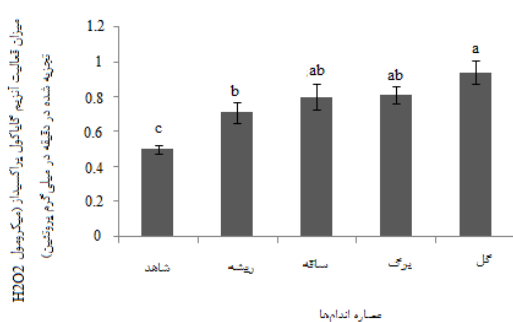


شکل ۱۳: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر محتوای پرولین یولاف وحشی

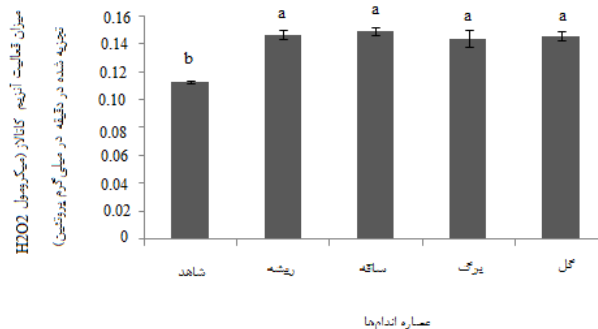
## فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز

در این مطالعه، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز یولاف وحشی مربوط به اندام ساقه معادل ۱۴/۹۲ میکرومول آب اکسیژنه تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بود که از لحاظ آماری با اندام‌های ریشه، برگ و گل اختلاف معنی داری را نشان نداد، لذا در گروه یکسانی قرار گرفتند (شکل ۱۴). میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز یولاف وحشی تحت عصاره آبی اندام‌های

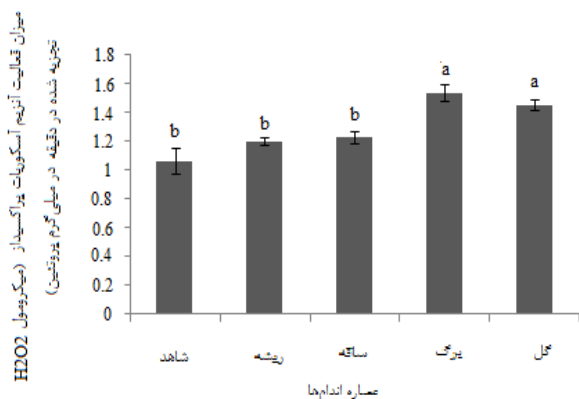
مختلف شاتره نیز از روند افزایشی در مقایسه با شاهد برخوردار بود. به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم تحت عصاره اندام گل با مقدار ۰/۹۴ میکرومول آب اکسیژنه تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین به دست آمد، اما اختلاف آن با اندام برگ و ساقه معنی دار نبود (شکل ۱۵). مطابق نتایج، عصاره آبی اندامهای گل و برگ شاتره اثر افزایشی معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز یولاف وحشی نشان دادند. در مقابل اثر اندامهای ریشه و ساقه بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به شاهد معنی دار نبود (شکل ۱۶). روی هم رفته افزایش در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در یولاف وحشی احتمالاً بیانگر افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن تحت تنش ناشی از عصاره آبی اندامهای مختلف شاتره می باشد. اورچ و همکاران (Oracz *et al.*, 2007) گزارش نمودند که تغییر در مقدار فعالیت آنزیمها به نوع و غلظت مواد دگرآسیب بستگی دارد. ضرایب همبستگی داده ها نشان داد که رابطه منفی و معنی داری بین فعالیت آنزیم کاتالاز و وزن تر و خشک، سطح برگ، میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدهای یولاف وحشی وجود داشت. رابطه این صفت با میزان پرولین، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، مثبت ولی غیر معنی دار بود (جدول ۳). به طور کلی کاهش مولفه های مورفولوژیکی، محتوای رنگیزه کلروفیل کل و پروتئین یولاف وحشی تحت تاثیر عصاره آبی اندامهای علف هرز شاتره علی رغم افزایش اسمولیت سازی پرولین و آنتی اکسیدان های مورد بررسی می تواند به دلیل عدم کفایت این متابولیتها باشد که منجر به پاسخ ناقص آنها در برابر تنش آلوپاتیک می گردد.



شکل ۱۵: مقایسه میانگین اثر عصاره اندامهای مختلف علف هرز شاتره بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز یولاف وحشی



شکل ۱۶: مقایسه میانگین اثر عصاره اندامهای مختلف علف هرز شاتره بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز یولاف وحشی



شکل ۱۶: مقایسه میانگین اثر عصاره اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز یولاف وحشی

جدول ۳: ضرایب همبستگی صفات مورد بررسی یولاف وحشی تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره

صفات	وزن تر بوته	وزن خشک بوته	سطح برگ در بوته	محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل b	محتوای کلروفیل کل	محتوای کارتنوئیدها	محتوای پرولین	محتوای پروتئین	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم گاپاکول	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
وزن تر بوته	۱											
وزن خشک بوته		۰/۹۷۴**										
سطح برگ در بوته			۱									
محتوای کلروفیل a				۱								
محتوای کلروفیل b					۱							
محتوای کلروفیل کل						۱						
محتوای کارتنوئیدها							۱					
محتوای پرولین								۱				
محتوای پروتئین									۱			
فعالیت آنزیم کاتالاز										۱		
فعالیت آنزیم گاپاکول											۱	
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز												۱

\*\*،\*: به ترتیب نشان دهنده معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد. <sup>ns</sup>: بیانگر عدم اختلاف معنی دار

## نتیجه گیری کلی

در مجموع با توجه به مقادیر نسبتاً مناسبی از ترکیبات آلکالوئیدی و فنلی در اندام‌های مختلف علف‌هرز شاتره به‌ویژه برگ و گل و اثر دگرآسیبی آن‌ها بر مولفه‌های رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی یولاف‌وحشی می‌توانند کاندیدهایی قابل بررسی برای تولید علفکش‌های طبیعی باشند. علاوه بر این به‌منظور استفاده از علف‌هرز شاتره به‌عنوان علفکش زیستی می‌بایست استخراج و شناسایی سایر آلوشیمیایی‌ها در اندام‌های این گیاه مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین با توجه به اثر دگرآسیبی علف‌هرز شاتره بر یولاف‌وحشی به‌عنوان یک نتیجه‌گیری جانبی پیشنهاد به کاشت ارقام مقاوم گیاهان زراعی به علف‌هرز شاتره می‌شود، درجایی که این علف‌هرز غالب است.

## منابع

- حسینی، پ. (۱۳۸۶) بررسی فیزیولوژیکی اثر تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف برنج. رساله دکتری تخصصی. دانشگاه شهید چمران اهواز ۱۴۵ صفحه.
- رجایی، و.، غلامعلی پور علمداری، ا.، اورسجی، ز. و نعیمی، م. (۱۳۹۷) ارزیابی پتانسیل دگرآسیبی عصاره آبی اندام‌های هوایی علف‌هرز تاتوره (*Datura stramonium*) بر صفات جوانه‌زنی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی ارقام گندم. نشریه پژوهش‌های بذر ایران ۵(۲): ۴۱-۲۹.
- زرگری، ع. (۱۳۷۱) گیاهان دارویی (جلد سوم)، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران.
- سلیمی، ح. و قربانلی، م. (۱۳۸۰) بررسی جوانه زنی بذور یولاف‌وحشی در شرایط متفاوت و تاثیر برخی عوامل موثر در شکست خفتگی بذر. رستنی‌ها جلد ۲.
- علی سلطانی، ا.، علیزاده، ه.، محفوظی، س. و خیال‌پرست، ف. (۱۳۹۱) اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت سرماسازگاری بر خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم بهاره و زمستانه گندم نان (*Triticum aestivum* L.). مجله علوم زراعی ایران ۱۴(۲): ۱۲۰-۱۰۸.
- قهرمان، ا. (۱۳۷۳) کورموفیت‌های ایران. جلد چهارم، مرکز نشر دانشگاه تهران. ۶۱۸ صفحه.
- قهرمان، ا. (۱۳۷۵) کد خانواده‌ها و جنس‌های گیاهی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور ۲۲۲ صفحه.
- مظفریان، و. (۱۳۷۵) فرهنگ نام‌های گیاهان ایران: لاتینی، انگلیسی، فارسی. فرهنگ معاصر ۲۳۸ صفحه.
- مهرپور، م.، کاشفی، ب. و مقدم، م. (۱۳۹۵) بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف گیاه دارویی *Ferula*. *assafetida* L. در دو رویشگاه طبیعی استان‌های سمنان و خراسان. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی ۱۳(۱): ۶۸-۵۶.
- میقانی، ف. (۱۳۸۲) آللوپاتی (دگرآسیبی) از مفهوم تا کاربرد. انتشارات پرتو واقعه، تهران ۲۵۶ صفحه.

- Abu-Romman, S., Shatnawi, M. and Shibli, R. (2010) Allelopathic effects of spurge (*Euphorbia hierosolymitana*) on wheat (*Triticum durum*). *American- Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 7(3): 298-302.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105: 121–126.
- Amoo, S.O., Ojo, A.U. and Van Staden, J. (2008) Allelopathic potential of *Tetrapleura tetraptera* leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. *South African Journal of Botany* 74: 149-152.
- Bates, L.S., Walderen, R.D. and Taere, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Caceres, A. (2000) Calidad de la material prima para la elaboracion de productos fitofarma ceuticas. Primer Congreso International FITO 2000 Por la investigacion, conservacion y diffusion del conocimiento de las plantas medicinals 27-30 de septiembre, Lima, Peru.
- Cadho, K.L. and Rajender, G. (1995) *Advances in horticulture medicinal and aromatic plants*. Vol. 11, Maldorta Publication. New Delhi.
- Clarka, D. (2006) The role of allelopathy in agricultural ecosystems. Department of Pomology and Basic Natural Sciences in Horticulture, Warsaw Agricultural University.
- Cruz-Ortega, R., Lara-Núñez, A. and Anaya, A. L. (2007) Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. *Plant Signaling and Behavior* 2: 269-270.
- Elisante, F., Tarimo, M.T. and Ndakidemi, P.A. (2013) Allelopathic effect of seed and leaf aqueous extracts of *Datura stramonium* on leaf chlorophyll content, shoot and root elongation of *Cenchrus ciliaris* and *Neonotonia wightii*. *American Journal of Plant Sciences* 4: 2332-2339.
- Enteshari, Sh. and Ahrabi, F. (2011) Effect of the coumarin on some physiological and biochemical indexes of Conola- Hiola variety. *Journal of Plant Biology* 3(10): 26-23.
- Gniazdowska, A. and Bogatek, R. (2005) Allelopathic interactions between plants, Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 395-407.
- Gupta, P.C., Sharma, N. and Rao, C.V. (2012) A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Fumaria indica* (Fumitory). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(8): 665-669.
- Harborne, J.B. (1973) *Phytochemical methods*, London. *Phytochemistry* 51: 187189.
- Harries, M.J., Chalmers, R.J.G. and Griffiths, C.E.M. (2005) Fumaric acid esters for severe psoriasis: a retrospective review of 58 cases. *British Journal of Dermatology* 153(3): 549-551.
- Hemeda, H.M. and Kelin, B.P. (1990) Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. *Journal of Food Science* 55(1), 184-185.
- Jabeen, N. and Ahmed, M. (2009) Possible allelopathic effects of three different weeds germination and growth of maize (*Zea mays*) cultivars. *Pakistan Journal of Botany* 41(4): 1677-1683.
- Justin, A.C., Ingrid, M.P. and Gregory, S.G. (2012) Allelopathy: Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration 213(12):1975- 1989.
- Kala, S. (2015) Effect of NaCl salt stress on antioxidant enzymes of isabgol (*Plantago ovata* forsk.) genotypes. *International Journal of Scientific and Technology Research* 4(02): 2277-8616.
- Kao, C.H. (1981) Senescence of rice leaves. VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turgid and water–stressed excised leaves. *Plant and Cell Physiology* 22: 683–685.
- Kavi Kishori, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plant: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88 (3): 424– 438.

- Kazzazi, M., Bandani, A.R. and Hosseinkhani, S. (2005) Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase of the Sunn pest, *Eurgaster intergriceps*. *Entomological sciences* 8: 371-377.
- Kobayashi, K. (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management* 4: 1-7.
- Kohli, R.K., Singh, H.P. and Batish, D.R. (2001) *Allelopathy in agro ecosystems*. Food Products Press, New York.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J. and Rand, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-273.
- Ma, L., Wu, H., Bai, R., Zhou, L., Yuan, X. and Hou, D. (2011) Phytotoxic effects of *Stellera chamaejasme* L. root extract. *African Journal of Agricultural Research* 6: 1170-1176.
- Machado, S. (2007) Allelopathic potential of various plant species on downy brome: Implications for weed control in wheat production. *Agronomy Journal* 99: 127-132.
- Macias, F.A., Molinillo, J., Varela, R.M. and Galindo, J.C.G. (2007) Allelopathy a natural alternative for weed control. *Pest Management Science* 63:327-348.
- Makoi, J.H. and Ndakidemi, P.A. (2012) Allelopathy as protectant, defense and growth stimulants in legume cereal mixed culture systems. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 40: 161-186.
- Malick, C.P. and Singh, M.B. (1980) *In plant enzymology and histo enzymology*. Kalyani Publishers, New Dehli.
- Martinov, M., Oztekin, S. and Muller, J. (2007) Drying. In: Oztekin, S. and Martinov, M. (Eds.). *Medicinal and Aromatic Crops*. CRC Press, United States of America 320p.
- McCalley D.V. (2002) Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatogr A* 967: 1: 1- 19.
- Narwal, S.S. and Tauro, P. (1996). Allelopathy in pest's management for sustainable agriculture. *Proceeding of the International Conference on Allelopathy, Volume I, New Delhi, India, 5th September* Pp 67-76.
- Nakano, Y. and Asado, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22(5): 867-880.
- Onsel, Y., Keles, Y. and Ustum, A.S. (2000) Interactive effect of temperature and heavy stress on the growth and biochemical compounds in wheat. *Environmental Pollution Journal* 107: 315-320.
- Oracz, K., Bailly, C., Gniazdowska, A., Côme, D., Corbinau, D. and Bogatek, R. (2007) Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology* 33:251-264.
- Rao, C.V., Verma, A.R., Gupta, P.K. and Kumar, M.V. (2007) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. *Acta Pharmaceutica* 57(4): 491- 498.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Najera, F. and Lopez-Romero, J.M. (2002). Direct determination of alkaloid content in *Fumeria* species by GC-MS. *Phytochemical Analysis* 13: 363-367.
- Ullah, R., Tanveer, A., Khaliq, A. and Hussain, S. (2013) Comparative allelopathic potential of *Fumaria indica* L. and *Polygonum plebejum* L. against field crops. *Weed Science Research* 19(1): 15-29.
- Verbruggen, N. and Hermons, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35(4): 753- 759.
- Vyvyan, J.R. (2002) Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58:1631-1646.
- Weir, T.L., Park, S.W. and Vivanco, J.M. (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 113-119.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A. (1976) *Laboratory manual for physiological studies of rice*. 3rd Edition. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.

---

## Study of contents of some secondary metabolites and allelopathic effects of various organs of *Fumaria parviflora* weed on *Avena ludoviciana*

A. Ataei<sup>1</sup>, E. Gholamalipour Alamdari<sup>2\*</sup>, Z. Avarseji<sup>2</sup>, A. Rahemi Karizaki<sup>2</sup>

Received: 2018.7.7

Accepted: 2019.7.1

### Abstract

Basically, the reduction in crop yield is due to the competition and allelopathy of weeds. This study was aimed at assessing content of some secondary metabolites and evaluating allelopathic potential of various organs of *Fumaria parviflora* on morpho-physiological and biochemical characteristics of *Avena ludoviciana* seedling. Aqueous solution of organs was prepared using 5g plant material/ 100 ml D.W and applying it on 7- day old seedlings of *Avena ludoviciana*. The quantification assay of alkaloids and total phenols in various organs of *Fumaria parviflora* indicated that leaves and flowers had the highest content of these compounds, compared to the roots and stems. According to the results, the allelopathic compounds of various organs of *Fumaria parviflora* had a different inhibitory effect on root length, seedling length, fresh and dry plant weight, leaf area, and the content of total chlorophyll, carotenoids and proteins of *Avena ludoviciana*. The most negative effect on the traits of *Avena ludoviciana* was obtained in the leaves of *Fumaria parviflora*. In addition, the content of prolin and enzymes activity of catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase were increased under aqueous extract of *Fumaria parviflora* organs compared to the control.

**Keywords:** Allelopathic compounds, Catalase activity, Hydroponic culture, Leaf area, Suspension, Total phenols.

---

1- MSc. student of Identification and Weeds Control, College of Agriculture and Natural Resources of Gonbad Kavous University.

2-Assistants Professor of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources of Gonbad Kavous University.

\*(Corresponding author: eg.alamdari@gonbad.ac.ir)



# اثر تیمارهای مقاومسازی بر تحمل تنش سرما در نشا خیار

فردین قنبری\*، سجاد کردی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

## چکیده

تنش سرمایی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان مناطق گرمسیری مانند خیار در اوایل فصل رشد می‌باشد. در این تحقیق امکان مقاومسازی به سرما در نشا خیار با پیش تیمار دمایی و خشکی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور ارقام خیار (سوپر دامینوس و سوپر استار) و پنج تیمار مقاومسازی (شاهد، دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد) و تنش خشکی با استفاده از ۱۰ و ۲۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. پس از اعمال تیمارهای مقاومسازی و فرصت ۴۸ ساعته بازیابی، نشاها در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز و هر روز ۶ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقاومسازی سبب افزایش رشد نشا در شرایط تنش سرمایی شد. همچنین تیمار مقاومسازی میزان کلروفیل، نسبت کلروفیل  $a/b$ ، رطوبت نسبی، پرولین و پراکسید هیدروژن نشاها را افزایش و میزان نشت یونی را کاهش دادند. در بیشتر صفات مورد ارزیابی اختلاف آماری معنی‌داری بین ارقام مشاهده نشد. بیشترین تحمل سرمایی در پیش تیمار ۱۰ و ۲۰ درصد PEG به دست آمد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال پیش تیمار مقاومسازی با تنش سرمایی و تنش خشکی می‌تواند آثار سوء تنش سرمایی بر نشا خیار را کاهش دهد.

**واژه های کلیدی:** پراکسید هیدروژن، پرولین، پلی‌اتیلن گلیکول، خوگیری، مقاومسازی.

## مقدمه

تنش‌های محیطی از دلایل اولیه کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در سراسر دنیا هستند که منجر به کاهش ۵۰ درصدی عملکرد در بسیاری از گیاهان می‌شوند (Sharma et al., 2012). پیش‌بینی می‌شود که با توجه به تغییرات آب و هوایی، اثر تنش بر گیاهان در آینده نزدیک افزایش یافته و اثر سوء بیشتری بر گیاهان بگذارد. از طرف دیگر با توجه به افزایش سریع جمعیت دنیا تا سال ۲۰۵۰ تولید غذا باید دو برابر شود تا بتواند نیازهای غذایی انسان تأمین شود (Tilman et al., 2002). بنابراین، اصلاح و توسعه ارقام متحمل به تنش نگرانی اصلی بسیاری از برنامه‌های اصلاحی در گیاهان برای تضمین امنیت غذایی بشر است. نکته

۱-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد، ایران.

\*نویسنده مسئول: (F.ghanbari63@gmail.com)

کلیدی در این مورد، شناخت صحیح تغییرات سلولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان در پاسخ به شرایط تنش می‌باشد تا به‌وسیله آن بتوان راهکار و امکانات جدیدی را برای بهبود تحمل تنش در گیاهان فراهم آورد (Hossain *et al.*, 2016).

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. گیاهی است یک‌ساله و از خانواده کدوئیان، که دوره رشد آن ۸۵ تا ۹۰ روز می‌باشد. عده‌ای این گیاه را بومی نواحی گرم شمال شرقی هندوستان می‌دانند و گروهی معتقدند که نوع خودروی آن در ارتفاعات هیمالیا یافت شده است (پیوست، ۱۳۸۸). خیار از جمله مهم‌ترین سبزی‌های تولیدی در کشور ایران می‌باشد. بر اساس آخرین آمار منتشرشده تولید خیار در ایران در سال ۲۰۱۶ بیش از ۱/۷ میلیون تن بوده است که حدود دو درصد تولید جهانی این محصول را به خود اختصاص داده و چهارمین تولیدکننده عمده این محصول در سطح دنیا می‌باشد (FAO, 2016). اگرچه شرایط محیطی در بسیاری از نواحی ایران برای کشت کدوئیان مناسب است، به دلیل نوسانات دمایی در اوایل فصل بهار نشاهای کاشته شده در مزرعه تحت دمای پایین و آسیب سرمازدگی قرار می‌گیرند (Baninasab, 2009). در این حالت با توجه به شدت و طول دوره ممکن است سبب توقف رشد، ظهور علائم سرمازدگی، تأخیر در برداشت و در موارد شدیدتر مرگ گیاه شود (جوانمردی، ۱۳۸۸).

تلاش‌های متعددی برای افزایش تحمل گیاهان به تنش سرمایی از طریق روش‌های بیوتکنولوژی، اصلاح ارقام و تغییر شرایط کشت و کار صورت گرفته است (Vinocur & Altman, 2005). گیاهان توانایی اکتساب تحمل سرمایی به‌وسیله پیش‌تیمار خوگیری دمایی را دارند (Pardossi *et al.*, 1987). این فرآیند در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است که شامل تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است و شامل کاهش آب از دست‌دهی بافت‌ها، افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش محلول‌های سازگار می‌باشد (Hossain *et al.*, 2016). مطالعات گذشته نشان داده است که در معرض قرار گرفتن گیاه با تنش خشکی می‌تواند سبب افزایش تحمل یخ‌زدگی در گیاهان شود. به‌عنوان مثال پیش‌تیمار خشکی در مرحله رویشی گیاه سبب تحمل اثرهای تنش خشکی و تنش گرمایی در مرحله زایشی شد (Wang *et al.*, 2015). به‌علاوه گزارش شده است که پیش‌تیمار خشکی سبب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تحمل تنش سرمایی در مراحل بعدی رشد می‌شود (Dong *et al.*, 2013). علاوه بر این شواهد نشان می‌دهد که تنش خشکی به‌تنهایی و یا به همراه دمای پایین سبب افزایش تحمل سرما در گیاهان مختلف مانند توت‌فرنگی می‌شود (Rajashekar & Panda, 2014). این فرآیند تحت عنوان مقاومت تقاطعی به تنش‌های محیطی شناخته شده است به این معنی که در معرض تنش قرار گرفتن گیاهان می‌تواند سبب افزایش تحمل به تنش‌های بعدی شود (Hossain *et al.*, 2016).

درحالی‌که مکانیسم مولکولی دقیق این پدیده شناخته‌نشده است، این احتمال وجود دارد که مقاومت تقاطعی بین تنش‌های شوری، خشکی، فلزات سنگین، گرما و سرما به دلیل نتایج مشترک این تنش‌ها بر گیاهان باشد (Li *et al.*, 2011). اخیراً، مطالعات گسترده نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد و به‌خصوص پراکسید هیدروژن فعالیت سیگنالی مهمی در پاسخ به

تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان می‌دهند، این نکته یادآوری می‌کند که این مولکول ممکن است ترکیب مرکزی کنترل‌کننده مقاومت بین تنش‌های محیطی در گیاهان باشد (Iseri et al., 2013). با توجه به موارد شرح داده‌شده و لزوم استفاده از روش‌های طبیعی بدون استفاده از مواد شیمیایی برای افزایش تحمل به تنش‌های محیطی در گیاهان، در این تحقیق نقش احتمالی پیش‌تیمار دمایی و خشکی بر تحمل سرمایی نشا خیار و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی وابسته به آن مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### شرایط کشت و اعمال تیمارها

این آزمایش در سال ۱۳۹۶ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق شامل پنج تیمار مقاوم‌سازی شامل بدون مقاوم‌سازی (شاهد)، کاربرد تنش خشکی با پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰ درصد، کاربرد تنش خشکی با پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰ درصد، پیش‌تیمار سرمایی در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و پیش‌تیمار سرمایی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بر روی دو رقم مشهور خیار مزرعه (سوپر دامینوس و سوپر استار) بودند.

ابتدا بذره‌های گیاه خیار (شرکت US Agriseeds) در گلدان‌های کوچک نشایی کشت شدند. محیط کشت مورد استفاده پرلایت و ورمیکولایت (به ترتیب با نسبت ۱ به ۲) بود که پس از اختلاط کامل و شستشوی اولیه به اندازه ۴۰ گرم برای هر چاهک استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه با نور طبیعی و دمای روزانه حدود ۲۵ و شبانه حدود ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای جلوگیری از کمبود عناصر غذایی آبیاری نشاها به صورت یک روز در میان با استفاده از غلظت یک در هزار کود کامل فوسامکو انجام گرفت. پس از سبز شدن نشاها در چند مرحله عمل تنک کردن و حذف نشای غیر یکسان انجام شد و در نهایت درون هر گلدان یک نشا حفظ شد.

در مرحله چهار برگ کاملاً توسعه‌یافته گیاهچه‌های حاصله به مدت دو روز متوالی، تحت پیش‌تیمار تنش خشکی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۶۰۰۰ در دو سطح تنش متوسط (۱۰ درصد PEG، معادل پتانسیل اسمزی ۰/۱۸۳/مگاپاسکال) و تنش شدید (۲۰ درصد PEG، معادل پتانسیل اسمزی ۰/۵۷۷/مگاپاسکال) و یا تیمار سرمایی ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. مقادیر موردنیاز PEG برای ایجاد پتانسیل-های اسمزی مورد نظر بر اساس رابطه زیر تعیین شد (Michel & Kaufmann, 1973).

$$\Psi S = - (1.18 \times 10^{-2}) C - (1.18 \times 10^{-4}) C^2 + (2.67 \times 10^{-4}) CT + (8.39 \times 10^{-7}) C^2T$$

در رابطه فوق،  $\Psi S$  و  $C$  و  $T$  به ترتیب پتانسیل اسمزی (بر حسب بار)، غلظت PEG-6000 (گرم در لیتر آب) و درجه حرارت محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشند. برای جلوگیری از تجمع PEG در گلدان‌ها، آبیاری آن‌ها به صورت روزانه و با مقدار بیشتر محلول انجام می‌گرفت به طوری که حدود نصف محلول PEG مورد استفاده به صورت زه‌آب از ته گلدان خارج می‌شد. پس از اعمال تیمارها، نشاها به مدت ۴۸ ساعت در گلخانه (بدون تیمار، فرصت بازیابی) قرار گرفتند.

پس از تیمارهای مقاوم‌سازی (خشکی و سرما) و فرصت بازیابی، گیاهچه‌ها تحت تیمار سرمایی قرار گرفتند. برای اعمال تنش سرما گیاهچه‌ها به سردخانه با دمای سه درجه سانتی‌گراد به مدت شش روز و در هر روز به مدت شش ساعت منتقل شدند (Baninasab, 2009). بعد از پایان تیمار سرمایی همه گلدان‌ها به گلخانه با شرایط نور و دما ذکر شده منتقل شدند و پس از ۷۲ ساعت در این شرایط، اندازه‌گیری صفات انجام گرفت (Korkmaz *et al.*, 2010).

### اندازه‌گیری صفات

برای تعیین وزن تر شاخساره و ریشه ابتدا قسمت هوایی گیاه از سطح محیط کشت قطع شد و وزن تر آن ثبت گردید. ریشه‌ها برای حذف مواد بستر کاشت به دقت با آب جاری شسته شدند و پس از خشک کردن با دستمال کاغذی برای برداشتن آب سطحی، وزن تر آن‌ها ثبت گردید. میانگین وزن پنج بوته به‌عنوان وزن تر ریشه و شاخساره آن واحد آزمایشی در نظر گرفته شد.

برای تعیین محتوای آب نسبی (RWC) از روش Korkmaz *et al.* 20 استفاده شد. ابتدا تعدادی مساوی برگ رسیده و جوان از هر تکرار انتخاب و جدا گردید. بعد از جدا نمودن برگ‌ها از گیاه بلافاصله نمونه‌ها در محیط آزمایشگاهی به‌وسیله ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شدند (FW) و سپس به مدت ۴ ساعت در آب مقطر (جهت آب‌گیری کامل) قرار گرفتند و در این مدت در محیط آزمایشگاهی با دمای تقریبی ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از خشک کردن آب سطحی مجدداً توزین شدند (TW). پس از آن برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون الکتریکی قرار داده شدند. سپس برگ‌ها توزین شدند تا وزن خشک به دست آید (DW). از رابطه زیر، محتوای آب نسبی برگ محاسبه گردید.

$$RWC = \frac{FW-DW}{TW-DW} \times 100$$

در رابطه فوق RWC: محتوای آب نسبی بر حسب درصد، FW: وزن تر، TW: وزن آماس و DW: وزن خشک نمونه‌ها می‌باشد.

اندازه‌گیری نشت یونی برگ بر اساس روش Korkmaz *et al.* (2010) انجام شد. برای این منظور تعداد ۱۲ دیسک برگی به‌صورت تصادفی از گیاهان هر تیمار مورداستفاده قرار گرفت. نمونه‌های تهیه‌شده در داخل لوله آزمایش ریخته شد و به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی سه بار با آب مقطر شستشو شدند. سپس در داخل هرکدام از لوله‌های آزمایش مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس میزان نشت یونی محلول با استفاده از دستگاه سنجش هدایت الکتریکی قرائت گردید (EC<sub>1</sub>). سپس نمونه‌ها در داخل اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از سرد شدن در دمای اتاق قرائت دوم محلول (EC<sub>2</sub>) انجام گرفت و بر اساس رابطه زیر میزان نشت الکترولیت محاسبه و بر اساس درصد گزارش شد.

$$\text{نشست الکترولیت‌ها} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

در رابطه فوق،  $EC_1$ : هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت و  $EC_2$ : هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از اتوکلاو می‌باشد.

برای اندازه‌گیری کلروفیل ابتدا مقدار ۰/۱ گرم برگ تازه را با استفاده از پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی کاملاً ساییده تا توده یکنواختی به دست آید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد و سپس در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر طول موج جذب (A) قرائت، و کلروفیل a، b به ترتیب بر اساس روابط زیر محاسبه شد (Strain & Svec, 1966).

$$a \text{ کلروفیل} = 12.7(A663) - 2.69(A645)$$

$$b \text{ کلروفیل} = 25.8(A645) - 4.68(A663)$$

شاخص خسارت سرمازدگی بر اساس پژمرده شدن، از دست دادن آب و نکروزه شدن برگ‌ها و شاخه‌ها پس از تنش سرمای بر طبق مقیاس از یک (بدون علائم) تا ۵ (بیش از ۵۰ درصد سطح برگ آسیب ببیند) طبقه‌بندی شد (Baninasab, 2009).

برای استخراج و اندازه‌گیری پرولین از روش Bates *et al.* (1973) استفاده شد. برای این کار ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد (وزنی به حجمی) در هاون چینی ساییده شد. سپس نمونه ساییده شده درون لوله آزمایش ریخته و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. برای اندازه‌گیری میزان پرولین، مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره فوق جدا و داخل لوله آزمایش ریخته شد. به هر نمونه مقدار ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و سپس، ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیسیل اضافه گردید. پس از طی مراحل فوق، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خنک کردن نمونه‌ها در آب یخ، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شدند و میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از تولوئن به‌عنوان بلانک قرائت شد. میزان پرولین نمونه‌های برگ بر حسب میکرو مول در گرم وزن تر برگ گزارش گردید.

مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش  $H_2O_2$  با یدید پتاسیم و با استفاده از روش Alexieva *et al.* (2001) اندازه‌گیری شد. در این روش نیم گرم بافت تازه گیاه در تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره صاف‌شده، ۵۰۰ میکرو لیتر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی و دمای اتاق

نگهداری شد و پس از آن جذب محلول در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن بر اساس نانومول بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش شد.

## تجزیه آماری

نتایج به دست آمده از این تحقیق به کمک نرم افزار SAS-9.1 تجزیه آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### پارامترهای رشدی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی رقم و تیمار بر وزن تر شاخساره و وزن تر ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار شد. هیچ‌کدام از اثرات متقابل رقم  $\times$  تیمار بر پارامترهای رشدی معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات اصلی نشان داد که رقم سوپر استار نسبت به رقم سوپر دامینوس وزن تر شاخساره و وزن تر ریشه بیشتری داشت (جدول ۲). نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف مقاوم‌سازی تأثیر متفاوتی بر پارامترهای رشدی خیار داشتند. تیمار ۱۰ درصد PEG سبب افزایش معنی‌دار وزن تر شاخساره نسبت به شاهد شد و تیمارهای دیگر تأثیر معنی‌داری بر آن نداشتند. همچنین نتایج نشان داد که کاربرد ۱۰ درصد PEG و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش و کاربرد ۲۰ درصد PEG سبب کاهش وزن تر ریشه نسبت به شاهد شدند (جدول ۲).

تنش سرما همانند سایر تنش‌های محیطی می‌تواند اثرهای مخربی بر رشد و نمو گیاهان داشته باشد. در گیاهان هنگام قرار گرفتن در دماهای پایین و تنش سرمایی، کاهش کلروفیل، کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی رخ می‌دهد و نیز کاهش هدایت روزنه‌ای و در نتیجه کاهش دی‌اکسید کربن، کاهش انتقال الکترون در فتوسنتز، آسیب به ریشه و کاهش جذب عناصر غذایی اتفاق می‌افتد، که همه این عوامل سبب کاهش رشد گیاهان در شرایط تنش سرما می‌شوند (Berova et al., 2002). نتایج این تحقیق نشان داد که پیش تیمار نشا خیار با تنش خشکی و تنش دمایی سبب بهبود رشد آن پس از تنش سرمایی می‌شود. این نتیجه با گزارش Pardossi et al. (1987) مطابقت دارد که گزارش کردند تنش خشکی در گوجه‌فرنگی سبب افزایش مقاومت آن به سرما شد و رشد گیاه و میزان عملکرد آن را در شرایط سرد گلخانه افزایش داد. (Nayyar et al., 2005) نشان دادند که پیش تیمار دمایی ۱۰:۷ (روز: شب) درجه سانتی‌گراد به مدت شش روز میزان رشد گیاه را در شرایط تنش سرمایی افزایش داد. همچنین گزارش شده است که در گیاه خیار پیش تیمار دمایی با تغییر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب افزایش تحمل و حفظ رشد گیاه در شرایط تنش سرمایی می‌شود (Dong et al., 2013). به نظر می‌رسد گیاهانی که تحت پیش تیمار خشکی و دمایی قرار می‌گیرند، میزان رشد طولی ساقه و گسترش برگ‌ها کاهش و تجمع مواد محافظتی در برگ‌های آن‌ها افزایش می‌یابد. این گیاهان

در شرایط تنش رشد بهتری نسبت به گیاهان شاهد خواهند داشت. شرایط پیش تیمار (سرما و خشکی) باعث تغییراتی در میزان رشد گیاه می‌شود که ممکن است در آماده‌سازی آن‌ها برای نشاکاری و تحمل شرایط مزرعه مفید باشد (جوانمردی، ۱۳۸۸).

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در نشا خیار تحت تنش سرما پس از پیش تیمار دمایی و خشکی

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر شاخساره	وزن تر ریشه	محتوای رطوبت نسبی	نشست یونی	کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b	پراکسید هیدروژن	پرولین	شاخص سرمازدگی
رقم	۱	۰/۹۵**	۰/۷۸**	۰/۶۹ <sup>ns</sup>	۵/۷۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۷۶**	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۲۰*	۲۱/۳۵**	۰/۸۴*	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>
تیمار	۴	۰/۷۵**	۰/۹۰**	۷۷/۸۷**	۵۹/۸۷**	۰/۰۸۳**	۰/۱۰۷**	۱/۰۸**	۲۷/۶۰**	۴/۹۶**	۳/۲۰**
رقم×تیمار	۴	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۱۴ <sup>ns</sup>	۵/۳۰ <sup>ns</sup>	۲/۴۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۲۶**	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۳۴**	۱/۲۷*	۰/۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۱ <sup>ns</sup>
خطا	۲۰	۰/۱۰	۰/۰۸	۸/۴۷	۱/۸۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۵	۰/۴۰	۰/۲۱	۰/۰۶
C.V	-	۶/۸۸	۵/۹۷	۳/۴۶	۵/۵۴	۵/۲۳	۱۳/۹۷	۱۰/۴۳	۶/۹۹	۶/۴۳	۱۲/۵۹

ns، \* و \*\* به ترتیب فاقد تفاوت معنی‌دار و دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲: نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی رقم و تیمار در گیاه خیار تحت تنش سرما

تیمار	وزن تر شاخساره (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	محتوای رطوبت نسبی (درصد)	نشست یونی (درصد)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	پرولین (میکرو مول بر گرم وزن تر)	شاخص سرمازدگی (نمره)
سوپر دامینوس	۴/۵۵ <sup>b</sup>	۴/۸۵ <sup>b</sup>	۸۳/۸۹ <sup>a</sup>	۲۳/۸۴ <sup>a</sup>	۰/۴۶ <sup>a</sup>	۶/۹۶ <sup>a</sup>	۲/۰۱ <sup>a</sup>
سوپر استار	۴/۹۱ <sup>a</sup>	۵/۱۷ <sup>a</sup>	۸۴/۱۹ <sup>a</sup>	۲۴/۷۱ <sup>a</sup>	۰/۴۷ <sup>a</sup>	۷/۳۰ <sup>a</sup>	۲/۰۴ <sup>a</sup>
شاهد	۴/۵۴ <sup>bc</sup>	۴/۹۸ <sup>b</sup>	۷۸/۰۸ <sup>b</sup>	۲۹/۶۸ <sup>a</sup>	۰/۳۹ <sup>c</sup>	۶/۰۴ <sup>c</sup>	۳/۳۱ <sup>a</sup>
۱۰ درصد PEG	۵/۲۱ <sup>a</sup>	۵/۳۶ <sup>a</sup>	۸۷/۱۱ <sup>a</sup>	۲۱/۷۷ <sup>c</sup>	۰/۶۷ <sup>a</sup>	۷/۵۲ <sup>b</sup>	۱/۶۱ <sup>b</sup>
۲۰ درصد PEG	۴/۷۸ <sup>b</sup>	۴/۵۶ <sup>c</sup>	۸۴/۴۱ <sup>a</sup>	۲۲/۹۳ <sup>bc</sup>	۰/۵۳ <sup>a</sup>	۸/۴۱ <sup>a</sup>	۱/۵۵ <sup>b</sup>
دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد	۴/۲۶ <sup>c</sup>	۴/۷۲ <sup>bc</sup>	۸۳/۹۶ <sup>a</sup>	۲۴/۳۲ <sup>b</sup>	۰/۳۹ <sup>c</sup>	۷/۱۴ <sup>b</sup>	۱/۸۱ <sup>b</sup>
دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد	۴/۸۴ <sup>ab</sup>	۵/۴۵ <sup>a</sup>	۸۶/۶۰ <sup>a</sup>	۲۲/۶۶ <sup>bc</sup>	۰/۳۴ <sup>c</sup>	۶/۵۵ <sup>c</sup>	۱/۸۵ <sup>b</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند.

## محتوای آب نسبی برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد بر محتوای آب نسبی برگ معنی‌دار شد. اثر اصلی رقم و اثر متقابل رقم × تیمار بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمار نشان داد که همه تیمارهای مقاوم‌سازی سبب افزایش معنی‌دار محتوای آب نسبی برگ در مقایسه با شاهد شدند. بین تیمارهای مختلف مقاوم‌سازی (خشکی و سرما) اختلاف آماری معنی‌داری برای این صفت مشاهده نشد (جدول ۴).

به‌طور کلی محتوای رطوبت نسبی آب در گیاه معرف بسیار خوبی از وضعیت آبی گیاه است و به‌عنوان شاخص مناسب و مهمی در انتخاب برای مقاومت به تنش‌های محیطی در برنامه‌های مختلف اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاهانی که در پایان تنش بتوانند میزان آب برگ بیشتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز موفق‌تر خواهند بود. کاهش آب برگ باعث می‌شود که میزان هدایت روزنه‌ای و در نهایت فتوسنتز و فرآوری CO<sub>2</sub> کاهش پیدا کند (حسن‌پور، ۱۳۸۷). در واقع در تنش

سرمایی گیاه دچار تنش خشکی نیز می‌شود که به‌وسیله کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه آغاز و با کاهش پتانسیل آب و فشار آماس برگ ادامه می‌یابد، روزه‌ها بسته‌شده و تعرق پایین‌تر سبب کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه و در نهایت گیاه دچار کمبود آب می‌شود (Joshi *et al.*, 2007). نتایج این تحقیق نشان داد که پیش تیمار سرمایی و خشکی سبب حفظ رطوبت نسبی برگ‌های خیار پس از تنش سرمایی شد که با یافته‌های (Banon *et al.*, 2003) در مورد مقاوم‌سازی گیاه خرزهره با استفاده از تنش خشکی و کاهش رطوبت نسبی هوا مطابقت دارد. (De Juan *et al.*, 1997) گزارش کردند که در گیاه ذرت پیش تیمار خشکی سبب افزایش تحمل گیاه به تنش سرمایی با تأثیر بر روابط آبی گیاه و میزان هورمون آبسزیک اسید می‌شود. به نظر می‌رسد که پیش تیمار خشکی و سرما با تغییر هدایت روزه‌ها و همچنین کاهش آب بافت‌های گیاهی سبب حفظ رطوبت نسبی و جلوگیری از کاهش بیشتر آب در شرایط تنش سرمایی می‌شود.

### نشت الکترولیت‌ها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد بر نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار شد. اثر اصلی رقم و همچنین اثر متقابل رقم × تیمار بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر اصلی تیمار نشان داد که همه تیمارهای بکار رفته سبب کاهش معنی‌دار نشت یونی نسبت به شاهد شدند. کمترین میزان نشت یونی (۲۱/۷۷ درصد) در تیمار ۱۰ درصد PEG به دست آمد که البته اختلاف آماری معنی‌داری با تیمارهای ۲۰ درصد PEG و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نداشت. (جدول ۲). به‌طور مشابه (Nayyar *et al.*, 2005) با بررسی تأثیر پیش تیمار دمایی بر افزایش تحمل به تنش دمای بالا در گیاه نخود گزارش دادند که استفاده از این روش مقاوم‌سازی سبب جلوگیری از آسیب به غشاها در گیاه تحت تنش دمایی می‌شود. (Dong *et al.*, 2013) نشان دادند که پیش تیمار خشکی با استفاده از PEG به‌طور معنی‌داری سبب حفظ ساختار غشا و کاهش تجمع مالون دی‌آلدئید در نشاهای خیار تحت تنش سرما شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تنش سرما همانند سایر تنش‌های زنده و غیرزنده سبب تولید انواع گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)<sup>۱</sup> می‌شود. ROSها می‌توانند به غشاهای سلولی مانند اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها حمله کنند. در نتیجه ویژگی‌هایی چون سیالیت غشا انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد و باعث مرگ سلولی می‌شوند (Sharma *et al.*, 2012). یکی از واکنش‌هایی که در اثر حمله رادیکال‌های آزاد سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پر اکسیداسیون لیپیدهای غشا است که باعث تولید مالون دی‌آلدئید و افزایش نشت الکترولیت‌ها می‌شود (Sharma *et al.*, 2012). ثابت‌شده است که کاهش صدمه به غشا سلولی موجب پایداری بیشتر اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشاهای سلولی و تحمل بیشتر به تنش در گیاهان می‌شود

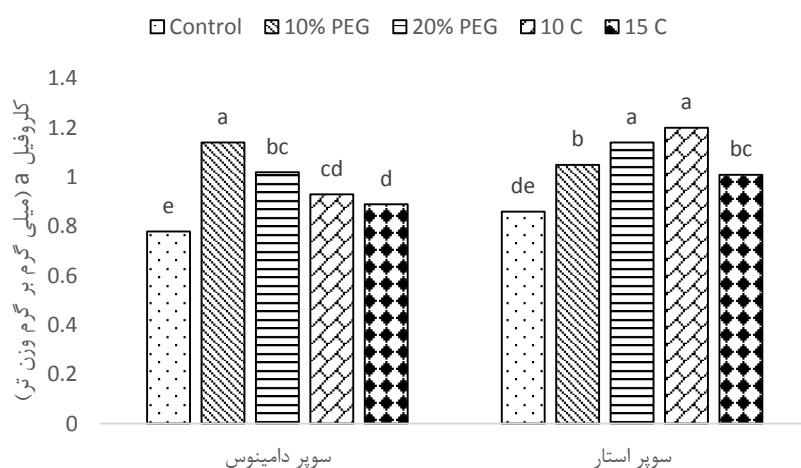
<sup>۱</sup> - Reactive Oxygen Species (ROS)



(Maali-Amiri *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد حفظ ساختار غشا و جلوگیری از افزایش نشت الکترولیت‌ها در نشاهای خیار در اثر تنش سرما، بیانگر فعالیت مکانیسم‌های دفاعی ایجادشده به وسیله پیش تیمار خشکی و سرما می‌باشد.

## کلروفیل a و b

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی رقم و تیمار و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد بر کلروفیل a معنی‌دار شد. همچنین اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد بر کلروفیل b معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم × تیمار در مورد کلروفیل a نشان داد که همه تیمارهای مقاوم‌سازی در هر دو رقم سبب افزایش معنی‌دار کلروفیل a نسبت به شاهد شدند. در رقم سوپر دامینوس پیش تیمار خشکی ۱۰ درصد PEG نسبت به تیمارهای دیگر تأثیر بیشتری در افزایش کلروفیل a داشت در حالی که در رقم سوپر استار تیمار ۲۰ درصد PEG و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان کلروفیل a را نسبت به تیمارهای دیگر داشت (شکل ۱).



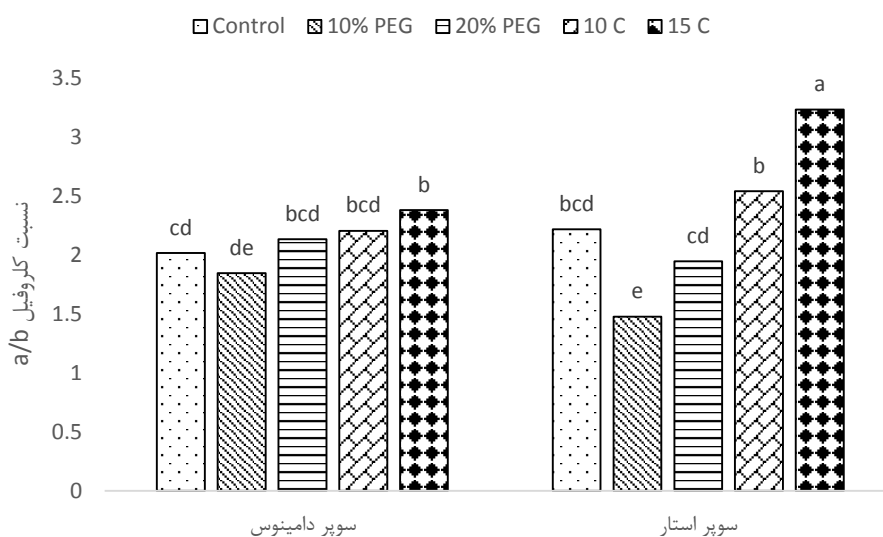
شکل ۱: اثر تیمارهای مقاوم‌سازی بر محتوای کلروفیل a در نشاهای خیار تحت تنش سرما

گزارش شده است که تنش سرما سبب اختلال در تولید انواع کلروفیل می‌شود و به کلروپلاست آسیب وارد می‌کند (Hallgren & Oquist, 1990). با کاهش دما فرآیند بیوسنتز کلروفیل در گیاهان متوقف می‌شود زیرا که تولید کلروفیل یکی از فرآیندهای حساس وابسته به دما می‌باشد و با اندازه‌گیری آن می‌توان میزان حساسیت و یا مقاومت گیاهان به تنش سرما را تخمین زد (Mahajan & Tuteja, 2005). بر اساس نظریه Schütz & Fangmeier (2001) کاهش رنگدانه کلروفیل در اثر تنش مربوط به افزایش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در سلول می‌باشد که سبب تجزیه این رنگیزه در شرایط تنش می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پیش تیمار دمایی و خشکی سبب افزایش میزان کلروفیل در نشا خیار تحت تنش سرما می‌شود. در هر دو رقم خیار تأثیر پیش تیمار در حفظ محتوای کلروفیل مشاهده شد که به‌طور کلی تأثیر پیش تیمار خشکی بیشتر از پیش

تیمار سرمایی بود. (Li *et al.* (2014) گزارش کردند که پیش تیمار خشکی ملایم سبب حفظ کلروفیل گیاهان گندم در شرایط دمایی پایین می‌شود. همچنین Helmy *et al.* (1999) گزارش کردند که مقاوم‌سازی نشاهای خیار با استفاده از پیش تیمار دمایی سبب افزایش کلروفیل و کاهش نشت یونی نشاها در شرایط تنش سرمایی می‌شود که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. به نظر می‌رسد پیش تیمار تنش دمایی و خشکی از طریق تغییرات فیزیولوژیکی سبب کاهش آثار تنش سرما در گیاه و کاهش کلروفیل در این شرایط می‌شود.

### نسبت کلروفیل a/b

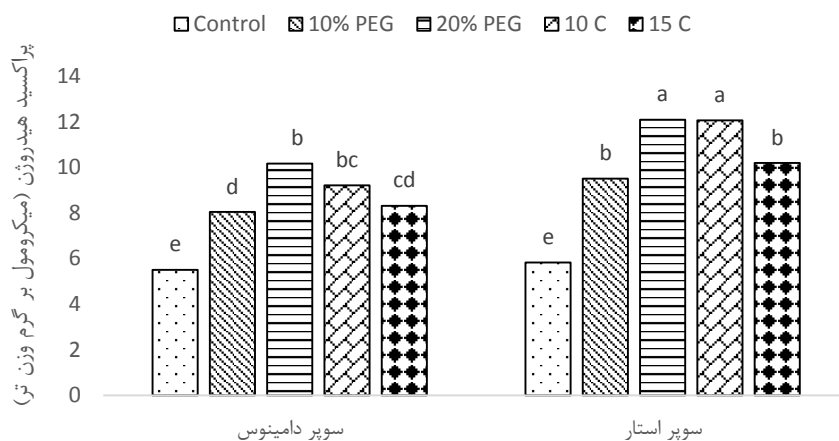
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی رقم در سطح پنج درصد و اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد بر نسبت کلروفیل a/b معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل رقم × تیمار بر این صفت معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که در دو رقم خیار، تیمارهای مقاوم‌سازی تاثیر متفاوتی بر نسبت کلروفیل a/b داشت. در رقم سوپر دامینوس، تنها پیش تیمار دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به شاهد شد و بقیه تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد نداشتند. در رقم سوپر استار، ۱۰ درصد PEG سبب کاهش و دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار نسبت کلروفیل a/b شد (شکل ۲). میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی به‌شمار می‌رود. در این حالت با توجه به شدت تنش، مرحله رشدی گیاه و همچنین گونه گیاهی تاثیر تنش بر هر کدام از مقادیر کلروفیل a و b متفاوت خواهد بود (Haldimann, 1998). در تحقیق حاضر نسبت کلروفیل a/b در دو رقم خیار به طور متفاوتی تحت تاثیر تیمارهای مختلف مقاوم‌سازی قرار گرفت که مربوط به واکنش متفاوت ارقام بود و با نتایج Kalisz *et al.* (2016) همخوانی داشت. نسبت کلروفیل a/b شاخصی از عملکرد رنگدانه‌ها و هماهنگی دستگاه فتوسنتزی با محیط است. کلروفیل b به عنوان دریافت‌کننده انرژی نورانی در سیستم‌های فتوسنتزی عمل می‌کند و کلروفیل a، رنگدانه کلیدی در مراکز واکنش فتوسیستم یک و دو است (Lichtenthaler, 2007). (Kalisz *et al.* (2016) با بررسی تاثیر تنش سرمایی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی پنج رقم ریحان گزارش کردند که در شرایط تنش سرمایی نسبت کلروفیل a/b در این ارقام افزایش می‌یابد و البته واکنش ارقام در این شرایط یکسان نبود. در این ارتباط Yang *et al.* (2009) گزارش کردند که افزایش نسبت کلروفیل a/b در شرایط تنش ممکن است در ارتباط با تبدیل کلروفیل b به کلروفیل a برای خوگیری سرمایی گیاهان باشد. همچنین گزارش شده است که افزایش نسبت کلروفیل a/b در گیاهان سبب کاهش آسیب نوری به گیاه می‌شود (Lichtenthaler, 2007). در تحقیق حاضر پیش تیمار دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش نسبت کلروفیل a/b در هر دو رقم خیار تحت تنش سرما شد که نشان‌دهنده موثر بودن این تیمارها در شرایط سرمازدگی می‌باشد.



شکل ۲: اثر تیمارهای مقاوم سازی بر نسبت کلروفیل a/b در نشاهای خیار تحت تنش سرما

### پراکسید هیدروژن

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی رقم و تیمار در سطح یک درصد آماری بر میزان پراکسید هیدروژن معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل رقم  $\times$  تیمار در سطح پنج درصد بر پراکسید هیدروژن معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که همه تیمارهای مقاوم سازی در هر دو رقم سبب افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد شدند. در هر دو رقم تیمارهای ۲۰ درصد PEG و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تأثیر را در افزایش پراکسید هیدروژن داشتند و تأثیر این تیمارها در رقم سوپر استار بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳: اثر تیمارهای مقاوم سازی بر محتوای پراکسید هیدروژن در نشاهای خیار تحت تنش سرما

پراکسید هیدروژن در گیاهان می‌تواند نقش دوگانه‌ای داشته باشد. این مولکول در غلظت بالا سبب خسارت سلولی شده و به بافت‌های گیاهی آسیب می‌رساند ولی در غلظت پایین به‌عنوان سیگنال می‌تواند مسیرهای دفاعی گیاه را فعال کند

(Zhang *et al.*, 2007). در مورد نقش پر اکسید هیدروژن در مقاومت تقاطعی گیاهان گزارش‌هایی منتشر شده است. Hoffman *et al.* (2012) نشان دادند که پیش تیمار خشکی سبب افزایش سنتز پر اکسید هیدروژن در گیاه می‌شود که می‌تواند مکانیسم آنتی‌اکسیدانی گیاه برای مقابله با یخ‌زدگی را فعال کند. Gong *et al.* (2001) گزارش کردند که پیش تیمار شوک دمایی سبب تولید پیک  $H_2O_2$  در ارقام ذرت شد. ظهور پیک  $H_2O_2$  قبل از تحریک مقاومت تقاطعی بود که نشان می‌دهد یک افزایش اولیه  $H_2O_2$  ممکن است یکی از پیش‌نیازهای لازم برای مقاومت تقاطعی در گیاهان باشد. همچنین تأثیر کاربرد خارجی پر اکسید هیدروژن در مقاومت به تنش سرما گزارش شده است (Iseri *et al.*, 2013). در تحقیق حاضر، پیش تیمار خشکی و دمایی سبب افزایش پر اکسید هیدروژن در نشا خیار شد که می‌تواند نقش مهمی در سازگاری گیاه به شرایط تنش داشته باشد. لازم به ذکر است که در منابع گذشته، غلظت پر اکسید هیدروژن که نقش تخریبی و یا سیگنالی آن را تعیین می‌کند مشخص نشده است، بنابراین نمی‌توان افزایش پر اکسید هیدروژن را صرفاً تغییر مثبت برای گیاه در مقابله با تنش محیطی قلمداد کرد.

## پرولین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد آماری بر میزان پرولین معنی‌دار شد. همانند بسیاری از صفات دیگر اثر اصلی رقم و اثر متقابل رقم  $\times$  تیمار بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمار در مورد محتوای پرولین نشان داد که تیمارهای ۱۰ و ۲۰ درصد PEG و همچنین دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار پرولین نسبت به شاهد شدند. بیشترین میزان پرولین در تیمار ۲۰ درصد PEG مشاهده شد و پیش تیمار دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد نداشت (جدول ۲). یکی از مکانیسم‌های مؤثر گیاهان برای تحمل بهتر تنش‌های محیطی تنظیم اسمزی می‌باشد (Hayat *et al.*, 2012). در این فرآیند پتانسیل اسمزی بافت‌های تحت تنش در نتیجه تجمع مواد اسمولایت (مانند پرولین) کاهش می‌یابد. بنابراین فشار آماس گیاهان در سطح مطلوب حفظ می‌شود. گزارش شده است که تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش، نوعی مکانیسم دفاعی است (Hossain *et al.*, 2016). این اسید آمینه از طریق تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پاک کردن رادیکال‌های آزاد، بردباری و تحمل گیاهان را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Dar *et al.*, 2016). افزایش پرولین در نتیجه تنش‌های محیطی در گیاهان مختلف یک پدیده شایع بوده و در مطالعات زیادی گزارش شده است (Dar *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2016). Kuznetsov *et al.* (1999) برای ارزیابی مکانیسم تحمل تنش خشکی با استفاده از شوک حرارتی آزمایشی روی گیاه پنبه انجام دادند. نتایج نشان داد که پیش تیمار شوک حرارتی (۴۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱/۵ ساعت) مقاومت به تنش خشکی در گیاه را افزایش داد. شوک حرارتی تجمع آمینواسیدها و آمیدها را افزایش و سبب افزایش ورود آن‌ها به فشار اسمزی سلول‌های برگ شد. این نتایج نشان می‌دهد که سیستم مقاومت مشترکی بین تنش‌های محیطی وجود دارد و مخصوصاً تجمع اسیدهای آمینه مانند پرولین در این فرآیند دخیل است (Hossain *et al.*, )

2016). در این تحقیق پیش تیمار دمایی و خشکی سبب افزایش پرولین در نشاهای خیار پس از تنش سرمایی شد. گزارش شده است که یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاوم‌سازی گیاهان با استفاده از عوامل محیطی مانند خشکی و سرما تجمع پرولین است که می‌تواند سبب افزایش تحمل گیاه به تنش‌های بعدی شود (Li & Gong, 2011). همچنین تیمار پرولین خارجی در بسیاری از گیاهان سبب افزایش تحمل شرایط تنش در گیاه شده است (Hayat et al., 2012) که نشان‌دهنده مؤثر بودن این اسید آمینه در پاسخ گیاهان به تنش می‌باشد. با توجه به نتایج گفته‌شده افزایش تجمع پرولین در اثر پیش تیمار خشکی و سرما تغییر مثبتی برای افزایش تحمل تنش سرما در گیاه خیار می‌باشد.

### شاخص سرمازدگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنها اثر اصلی تیمار در سطح یک درصد بر شاخص سرمازدگی نشاهای خیار معنی‌دار شد. اثر اصلی رقم و همچنین اثر متقابل رقم  $\times$  تیمار بر شاخص سرمازدگی معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج نشان داد که همه تیمارهای مقاوم‌سازی شاخص سرمازدگی را نسبت به شاهد کاهش دادند و البته اختلاف آماری معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشد (جدول ۲). دماهای پایین در گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند کدویان، سولاناسه، ذرت و سورگوم ممکن است سبب کاهش رشد، ایجاد نقاط پژمرده و نکروزه بر روی برگ‌ها و افزایش حساسیت به پاتوژن‌های عامل بیماری شود (Hallgren & Oquist, 1999). این علائم ظاهری معمولاً ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از تنش ظاهر می‌شوند. برخی نشانه‌های ظاهری در پاسخ به دماهای پایین در گیاهان حساس به سرمازدگی شامل کاهش توسعه برگ، پژمردگی، کلروز برگ‌ها و نکروزه شدن آن‌ها می‌باشد (Mahajan & Tuteja, 2005). در این تحقیق به منظور اندازه‌گیری شاخص سرمازدگی به نشاهای خیار از ویژگی‌هایی مانند نقاط نکروز و کلروز روی برگ‌ها و میزان آسیب به برگ‌های گیاه استفاده شد. نتایج نشان داد که پیش تیمار خشکی ۱۰ و ۲۰ درصد PEG و همچنین پیش تیمار دمایی ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش علائم سرمازدگی در نشاهای خیار شد. (Dong et al., 2013) نیز در گزارش مشابهی نشان دادند که پیش تیمار خشکی با PEG با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب کاهش آثار سرما بر نشا خیار می‌شود. همچنین کاهش خسارت سرمایی در گیاه ذرت با پیش تیمار سرمایی (Li et al., 2011) و در گیاه *Jatropha* با پیش تیمار دمایی (Ao et al., 2013) گزارش شده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

### نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که پیش تیمار دمایی و خشکی سبب افزایش تحمل سرمایی در ارقام خیار سوپر دامینوس و سوپر استار شد. این نتایج وابسته به افزایش رطوبت نسبی، کلروفیل، پرولین و پراکسید هیدروژن و کاهش نشت یونی بود. اگرچه هر دو روش تأثیر مثبتی در کاهش سرمازدگی داشت ولی تیمار تنش خشکی تأثیر بهتری نسبت به تیمار سرمایی

گذاشت. در مجموع با توجه به تأثیر سوء تنش سرمایی بر رشد گیاهان فصل گرم در اوایل فصل رشد، کاربرد تنش خشکی می‌تواند روش مؤثری برای کاهش این آثار سوء باشد.

## سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم‌آباد انجام گرفته است. بدین‌وسیله از همکاری دست‌اندرکاران باشگاه به‌خصوص آقای دکتر فولادوند تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

- پیوست، غ، (۱۳۸۸) سبزیکاری، چاپ پنجم، انتشارات دانش پذیر، ۵۷۷ صفحه.
- جوانمردی، ج. (۱۳۸۸) مبانی علمی و عملی تولید نشای سبزی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۵۶ صفحه.
- حسن‌پور، ج. م.، کافی، م.، میرهادی، م. ج. (۱۳۸۷) اثر تنش خشکی بر عملکرد و برخی خصوصیات فیزیولوژیک جو. مجله علوم کشاورزی ایران: دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۷۷-۱۶۵.
- 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(12): 1337-1344.
- Ao, P.X., Li, Z. G., Fan, D.M. and Gong, M. (2013) Involvement of antioxidant defense system in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta physiologiae plantarum* 35(1): 153-160.
- Baninasab, B. (2009) Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. *Scientia horticulturae* 121(2): 144-148.
- Banon, S., Ochoa, J., Franco, J.A., Alarcón, J.J. and Sánchez-Blanco, M.J. (2006) Hardening of oleander seedlings by deficit irrigation and low air humidity. *Environmental and Experimental Botany* 56(1): 36-43.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1): 205-207.
- Berova, M., Zlatev, Z. and Stoeva, N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 28(1-2): 75-84.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F. and Khan, F.A. (2016) Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment*. Emerging Omics Technologies. Springer India.
- De Juan, P., José, I.J. and Manuel, S.D. (1997) Chilling of drought-hardened and non-hardened plants of different chilling-sensitive maize lines changes in water relations and ABA contents. *Plant Science* 122(1): 71-79.
- Dong, X., Bi, H., Wu, G., Ai, X. (2013). Drought-induced chilling tolerance in cucumber involves membrane stabilisation improved by antioxidant system. *International Journal of Plant Production* 7: 67-80.
- FAO. (2016). from <http://faostat3.fao.org>. Accessed: January 11, 2016.
- Gong, M., Chen, B.O, Li, Z.G. and Guo, L.H. (2001) Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Plant Physiology* 158(9): 1125-1130.

- Haldimann, P. (1998) Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant, Cell & Environment* 21(2): 200-208.
- Hallgren, J. and Oquist, G. (1990) Adaptations to low temperatures. In stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Eds R Alscher and J Cumming. pp. 265-293.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* 7(11): 1456-1466.
- Helmy, Y.I., Singer, S.M. and El-Abd, S.O. (1999) Reducing chilling injury by short-term cold acclimation of cucumber seedlings under protected cultivation. In International Symposium Greenhouse Management for Better Yield and Quality in Mild Winter Climates 491: 177-184.
- Hoffman, L., DaCosta, M., Ebdon, J.S. and Zhao, J. (2012) Effects of drought preconditioning on freezing tolerance of perennial ryegrass. *Environmental and experimental Botany* 79: 11-20.
- Hossain, M.A., Burritt, D.J. and Fujita, M. (2016) Cross-stress tolerance in plants: molecular mechanisms and possible involvement of reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification systems. *Abiotic Stress Response in Plants*. 323-375.
- Iseri, Ö.D., Körpe, D.A., Sahin, F.I. and Haberal, M. (2013) Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta physiologiae plantarum* 35(6): 1905-1913.
- Joshi, S.C., Chandra, S. and Palni, L.M. (2007) Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetica* 45(4): 594-600.
- Kalisz, A., Jezdinsky, A., Pokluda, R., Sękara, A., Grabowska, A. and Gil, J. (2016). Impacts of chilling on photosynthesis and chlorophyll pigment content in juvenile basil cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 57(4): 330-339.
- Korkmaz, A., Korkmaz, Y. and Demirkiran, A.R. (2010) Enhancing chilling stress tolerance of pepper seedlings by exogenous application of 5-aminolevulinic acid. *Environmental and Experimental Botany* 67(3): 495-501.
- Kuznetsov, V.V., Rakitin, V.Y. and Zholkevich, V.N. (1999) Effects of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. *Physiologia Plantarum* 107(4): 399-406.
- Li, H.Y., Li, C.G. and Gong, M. (2011) Short-term cold-shock at 1 C induced chilling tolerance in maize seedlings. *International Conference of Biology Environment and Chemistry* 1: 346-349.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W. and Jiang, D. (2014) Physiological, proteomic and transcriptional responses of wheat to combination of drought or waterlogging with late spring low temperature. *Functional plant biology* 41(7): 690-703.
- Li, Z.G. and Gong, M. (2011) Mechanical stimulation-induced cross-adaptation in plants: an overview. *Journal of Plant Biology* 54(6): 358-364.
- Lichtenthaler, H.K. (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92(2): 163-179.
- Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I.V., Yur'eva, N.O., Pchelkin, V.P., Tsydendambaev, V.D., Vereshchagin, A.G. and Nosov, A.M. (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the  $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology* 54(5): 600-606.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 444(2): 139-158.
- Michel, B.E., and Kaufmann, M.R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology* 51(5): 914-916.

- Nayyar, H., Bains, T.S. and Kumar, S. (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 54(3): 275-285.
- Pardossi, A., Tognoni, F. and Lovemore, S.S. (1987) The effect of different hardening treatments on tomato seedling growth, chilling resistance and crop production in cold greenhouse. In *Symposium on Biological Aspects of Energy Saving in Protected Cultivation* 229: 371-378.
- Rajashekar, C.B. and Panda, M. (2014) Water stress is a component of cold acclimation process essential for inducing full freezing tolerance in strawberry. *Scientia Horticulturae* 174: 54-59.
- Schütz, M. and Fangmeier, A. (2001) Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO<sub>2</sub> and water limitation. *Environmental Pollution* 114(2): 187-194.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 212: 1-26.
- Strain, H.H. and Svec, W.A. (1966) Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls. *The Chlorophylls* 1: 22-66.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. and Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677.
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16(2): 123-132.
- Wang, X., Vignjevic, M., Liu, F., Jacobsen, S., Jiang, D. and Wollenweber, B. (2015) Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. *Plant Growth Regulation* 75(3): 677-687.
- Yang, J., Kong, Q., & Xiang, C. (2009) Effects of low night temperature on pigments, chl a fluorescence and energy allocation in two bitter melon (*Momordica charantia* L.) genotypes. *Acta physiologiae plantarum* 31(2): 285-293.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X. and Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist* 175(1): 36-50.



## **The effect of hardening treatments on chilling stress tolerance of cucumber seedlings**

**F.Ghanbari\* , S.Kordi**

**Received:2018.1.8**

**Accepted:2019.3.4**

### **Abstract**

Chilling stress is a major limiting factor on growth and development of tropical crops like cucumber in early of growing season. In this research, the possibility of chilling hardening of cucumber seedlings was investigated through pretreatment of drought and decreased temperature. The factorial experiment was consisted of two factors including cucumber cultivars (i.e. Super dominos and Super star) and hardening treatments (control, 10 °C, and 15 °C as well as 10% and 20% PEG) based on CRD in three replications in 2017. After applying treatments and allowing them 48 hrs to be recovered, the seedlings were placed 3 °C for a six days and 6 hrs for each day. The results showed that hardening increased cucumber growth under chilling stress. Hardening treatments improved seedlings' chlorophyll content, chlorophyll a/b ratio, relative water content, proline accumulation, and hydrogen peroxide while reducing electrolyte leakage content. It was not observed a significant difference between cultivars in terms of measured traits. The highest chilling tolerance was obtained by 10 and 20% PEG. Overall, the results of this experiment showed that employing drought and decreased temperature pretreatments are able to mitigate the harmful effects of chilling on cucumber seedlings.

**Keyword: Acclimation, Hardening, Hydrogen peroxide, Polyethylene glycol, Proline.**

# اثر تیمار نانو نقره بر میزان عناصر موجود در بنه زعفران تحت شرایط شوری

آزاده کریمی جعفری<sup>۱</sup>، منیر حسین زاده نمین<sup>\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

## چکیده

زعفران (*Crocus sativus L.*) گیاهی از تیره زنبقیان بخش کلاله و بنه آن بخصوص از نظر دارویی و غذایی دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد. امروزه نانو ذرات نقره با خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی و تاثیر بر گیرنده‌های اتیلن در گیاهان در بسیاری از زمینه‌ها کاربرد دارد. در ایران به دلیل افزایش سطح خاک‌های شور، بررسی عوارض تنش شوری با به کارگیری نانو نقره می‌تواند چشم انداز خوبی برای کنترل اثرات تنش شوری بر گیاهان باشد. برای این منظور آزمایشی با استفاده از چهار تیمار شامل: نانو نقره (۴۰ppm)، شوری (۱۰۰ mM NaCl)، تیمار نانو نقره (۴۰ppm) توأم با شوری (۱۰۰ mM NaCl)، شاهد بدون هر گونه تیمار و کنترل (نمونه اولیه قبل از کشت) با دو روش آبیاری و غوطه‌ور طراحی شد و میزان عناصر فسفر، سدیم و پتاسیم در بنه زعفران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، یون فسفر در همه تنش‌ها در مقایسه با شاهد و کنترل (نمونه اولیه قبل از کشت) افزایش یافت که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود. میزان غلظت یون سدیم در روش آبیاری و پتاسیم در روش غوطه‌ور در تنش شوری (۰/۷۷ mg/gDW) (۹/۹۶ mg/gDW) افزایش اما در تنش شوری همراه با نانو نقره (۰/۶۷ mg/gDW) (۰/۶۷ mg/gDW) در مقایسه با شاهد (۰/۷۳ mg/gDW) (۸/۰۸ mg/gDW) کاهش معنی‌داری در سطح ( $P \leq 0.05$ ) یافت. در این پژوهش بکارگیری نانو نقره همراه تنش شوری نشان داد که اثرات تنش شوری با تعدیل عناصری از قبیل سدیم و پتاسیم و افزایش فسفر همراه بوده است.

**واژه‌های کلیدی:** تنش شوری، تیمار نانو نقره، زعفران مزروعی، غلظت یون‌ها.

## مقدمه

زعفران (*Crocus sativus L.*) گیاهی دارای ارزش ادویه‌ای و دارویی است که بخش کلاله‌های خشک شده آن به عنوان زعفران شناخته شده است (Eslami et al., 2016). زعفران به مقدار زیادی در مناطق خشک و نیمه خشک از قبیل استان‌های خراسان و فارس در ایران تولید می‌شود و به دلیل نیاز آبی کم و درآمد زیاد آن توجه زیادی را در کشاورزی به همراه داشته است (Yarami et al., 2016).

۱-دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

\*نویسنده مسئول : monirhosseinzade@yahoo.com

شوری یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست محیطی است که مانع بهره‌وری گیاهان به ویژه در آب و هوای خشک و نیمه خشک می‌شود (Acosta-Motos *et al.*, 2017). شوری خاک یک مشکل جهانی است که تقریباً ۲۰٪ از زمین‌های کشاورزی و محصولات را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Negrao *et al.*, 2017). شوری سبب ایجاد عدم توازن بین عناصر غذایی گیاه می‌شود و بر جنبه‌های فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهان تاثیر می‌گذارد و به طور قابل توجهی باعث کاهش عملکرد آنها می‌شود (معصومی و رونقی، ۱۳۹۰). غلظت بالای نمک بر جوانه زنی بذر تاثیر می‌گذارد و باعث کمبود آب، عدم تعادل یونی، سمیت یونی و استرس اسمزی، تخریب غشا، کاهش جذب CO<sub>2</sub> برای بسته شدن روزنه‌های هوایی، کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیک و افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید می‌شود (khan & Panda, 2008).

گیاهانی که شوری را تحمل می‌کنند، سازوکارهای زیادی را در برابر افزایش شوری، از جمله تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، اجرا می‌کنند و با ایجاد مکانیسم‌های مقاومتی مختلف می‌توانند محتوای نمک خود را در آب تنظیم کنند. این مکانیسم‌ها شامل تغییر در مورفولوژی، آناتومی، روابط آب، فتوسنتز، مشخصات هورمونی، توزیع یون‌های سمی و سازگاری بیوشیمیایی (مانند پاسخ متابولیسم آنتی اکسیدانی) می‌باشند (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

تنش شوری اثرات منفی را بر تولیدات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک وارد می‌کند و می‌تواند اثرات اسمزی و یونی بر گیاهان تحمیل کند (Yarami *et al.*, 2016). اثرات مضر تنش شوری بر روی رشد گیاه و عملکرد آن عمدتاً بواسطه دو عامل استرس اسمزی و سمیت یونی می‌باشد (Horie *et al.*, 2010). سدیم و کلر می‌توانند در گیاه سمیت ایجاد نمایند و سبب ایجاد عدم تعادل یونی در گیاه شوند (معصومی و رونقی، ۱۳۹۰). گیاهان برای کسب تحمل بیشتر در شرایط استرس زا، اقدام به برقراری همئوستازی یونی می‌کنند که ناقلین یونی تعیین کننده نهایی آن هستند (Zhu, 2001).

بسیاری از گیاهان زراعی حساسیت قابل ملاحظه‌ای نسبت به شرایط شور دارند که این موضوع به علت تجمع یون سدیم در داخل سلول و تاثیر آن بر اختلال در تعادل یونی و تنظیم اسمزی، تاثیر بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها و متابولیسم سلول و نیز ایجاد سمیت بازدارنده است. فراوانی سدیم در خاک باعث لطمه به جذب پتاسیم توسط گیاه می‌شود. در مجموع، پایین بودن غلظت سدیم سیتوزولی و عدم تعادل نسبت یون (K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>) پتاسیم به سدیم، یکی از مهمترین جنبه‌های تحمل به شوری شناخته می‌شود (آذری و همکاران، ۱۳۹۳).

افزایش جذب یون Na<sup>+</sup> و کاهش یون K<sup>+</sup> در اغلب گونه‌های در معرض تنش شوری تعادل یونی را مختل می‌کند (khan & Panda, 2008). بیشتر گیاهان در غلظت شوری بالاتر از ۱۰۰ میلی مولار نسبت به محلول خاک نمی‌توانند رشد کنند (Estefan *et al.*, 2013). تحمل نمک در گیاهان اغلب با جلوگیری از انباشتن Na<sup>+</sup> و نگهداری نسبت بالا K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> در ساقه‌ها ارتباط دارند. میزان انباشت سدیم در ساقه‌های گیاهان به واسطه جذب خالص Na<sup>+</sup> در ریشه‌ها و انتقال آن از ریشه‌ها به ساقه‌ها تعیین می‌شود (Estefan *et al.*, 2013).

پتاسیم در فرآیندهای مهم سلولی مانند تثبیت سنتز پروتئین، فعال‌سازی آنزیم‌ها، خنثی‌سازی بارهای منفی روی پروتئین‌ها و بسیاری موارد دیگر شرکت می‌کند. علاوه بر وظایف فوق، پتاسیم در گیاهان، نقش مهمی در فرآیندهای اسمزی شرکت کننده در فشار تورگر سلولی، طول عمر سلول، انتقال در سلول‌های فتوسنتزی، حفظ هومیوستاز pH سیتوزول و تنظیم پتانسیل غشاء همراه با نیروی محرکه پروتون، بازی می‌کند (Sharma et al., 2013).

نقش فسفر در ساختارهای ماکرومولکولی در اسیدهای نوکلئیک مثل DNA مشاهده شده است که ناقل اطلاعات ژنتیکی و RNA هستند. فسفات پل بین واحدهای ریبونوکلوئید با ماکرومولکول‌ها را تشکیل می‌دهد (Villiers, 2007).

اگر چه فسفات در غلظت کم در سلول‌های گیاهی وجود دارد، فسفات‌های پر انرژی و استرهای فسفات در متابولیسم‌های سلولی شرکت می‌کنند. ATP یکی از ترکیبات بسیار مهم است که گروه‌های فسفات توسط باندهای پیرو فسفات متصل می‌شود (Villiers, 2007).

فسفات در رشد و متابولیسم گیاهان نقش دارد بنابراین در بیشتر واکنش‌های متابولیسمی مانند تقسیم سلولی، بیان ژن، تنفس و فتوسنتز کاهش به همراه دارد (Villiers, 2007).

نانو، ذرات اتمی یا مولکولی یک بعدی با حداقل بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که برخی خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها در مقایسه با مواد مشابه ولی فاقد ساختار نانویی متفاوت است (Salama, 2012). در ذرات نانو نقره به علت داشتن سطح تماس بیشتر در ارتباط با فضای بیرونی که ناشی از اندازه کوچک آن‌ها است، میزان چسبندگی به سطح سلول افزایش می‌یابد که منجر به افزایش کارایی آن‌ها می‌شود (Seif Sahandi et al., 2011).

کریشناراج و همکاران (۲۰۱۲) اثر بیولوژیکی نانوذرات سنتز شده را در رشد و متابولیسم *Bacopa monnieri* مطالعه کردند و مشخص شد که نانوذرات اثر معنی‌داری در جوانه زدن بذر از قبیل (*Boswellia ovalifoliolata*)، سنتز پروتئین و کربوهیدرات داشتند و نیز باعث کاهش محتوای فنل کل و فعالیت‌های کاتالاز و پراکسیداز گردید (Savithamma et al., 2012). نانو نقره پارامترهای رشد (طول ساقه و طول ریشه، سطح برگ) و صفات بیوشیمیایی (محتوای کلروفیل، کربوهیدرات، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی) در گیاهان لوبیا و ذرت معمولی را افزایش دادند (Sharma et al., 2012; Salama, 2012).

همچنین، نانو نقره باعث مهار آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC) در ریشه نهال‌های آراییدوپسیس، کاهش بیان آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید سنتاز (ACC سنتاز) ۷ و آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید اکسیداز (ACC اکسیداز) ۲ می‌شود. نشان دادند که نانو نقره به عنوان سرکوب کننده ادراک اتیلن توسط گیرنده‌ها عمل کند و می‌تواند در متابولیسم اتیلن و کلروفیل با سرکوب آنزیم کلروفیلاز دخالت کند (Siddiqui et al., 2015; Nejatizadeh-Barandozi et al., 2014; Seif Sahandi et al., 2011).

کاتیون‌های نقره از طریق کانال‌های سدیم و مس وارد سلول شده و می‌توانند از طریق ناقلین یونی غشاء در آرگانوسم‌ها انباشته شوند (Winkelmann *et al.*, 2015).

خاک یک سیستم بسیار پیچیده است و تحت تاثیر نانو نقره خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن مانند pH، EC، بافت و محتوای مواد آلی می‌تواند تغییر کند و از طرفی نانو ذرات نقره بر میکروارگانوسم‌های درون خاک از طریق واکنش با غشا سلولی اثر می‌گذارد (Pallavi *et al.*, 2016). سیلین و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که کاربرد نانو ذرات نقره در خاک باعث افزایش زیست توده گیاه ذرت و همچنین باعث افزایش تشکیل گره‌های تثبیت کننده نیتروژن در لوبیای چشم بلبلی می‌شود.

در گیاه آویشن (Thymus) نانو ذرات نقره درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی و طول ریشه را در شوری ۲۰۰ میلی مولار افزایش داد ولی در شوری ۱۰۰ میلی مولار باعث افزایش قدرت نامیه بذر و افزایش طول ساقه در مقایسه با شاهد شد. از طرفی مشاهده گردید تیمار با نانو نقره عوارض ناشی از تنش‌های خفیف و ملایم شوری را حذف می‌کند (Ghavam, 2018).

به گزارش محامد و همکاران (۲۰۱۷) در مراحل اولیه رویش بذر در گیاهان گندم حضور نانو ذرات نقره، به ویژه در ۲ تا ۵ میلی مولار، اثر منفی تنش شوری را کاهش داد. در واقع نانو ذرات نقره تحمل نمک را در گندم افزایش داد و می‌توان از آن به عنوان یک استراتژی برای محصولات زراعی در خاک‌های شور استفاده کرد.

رجائی و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تنش شوری در گیاه زعفران کار کردند و گزارش دادند که شوری باعث کاهش رشد و افزایش محتوای پروتئین و یون سدیم در تمامی اندام‌ها می‌شود. Soroshzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند در شرایط غرقابی، محلول پاشی نانو نقره (۵۰ یا ۱۰۰ ppm) باعث افزایش در ارتفاع بوته و تعداد بنه‌ها ی زعفران می‌شود. بنابراین برخی از اثرات تنش غرقابی بر رشد زعفران ممکن است توسط نانو نقره تعدیل شود. Rezvani و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش دادند که غلظت ۴۰ ppm می‌تواند احتمال تنش غرقابی را در زعفران کاهش دهد.

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات نانو نقره بر روی تغییرات جذب یون‌ها در تنش شوری بر روی گیاه زعفران بود تا اثرات تعدیل کنندگی شوری توسط تیمار با نانونقره را بررسی کنیم.

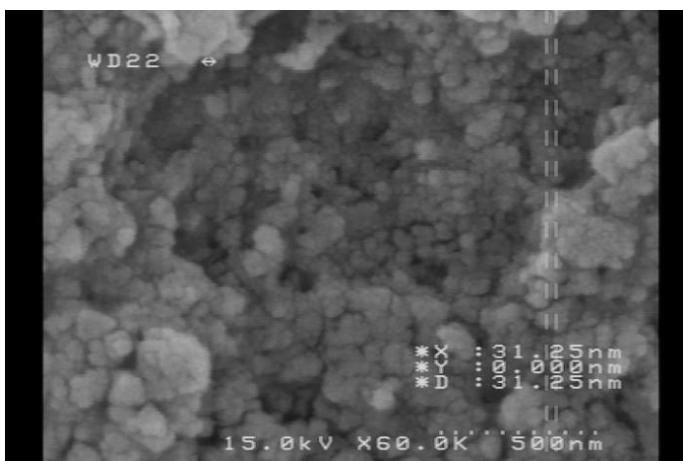
## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه

بنه‌های زعفران در شهریور ماه (مرحله خواب بنه) از مزارع قائن تهیه گردید و به آزمایشگاه آورده شد.

### تهیه نانو نقره

نانونقره استوک در غلظت ۱۰۰۰ ppm از شرکت پیام آوران نانو فناوری فردانگر تهیه گردید. نانو نقره از نوع کلئیدی و در ابعاد ۲۰ تا ۳۰ نانو متر بود (شکل ۱). با استفاده از آب دو بار تقطیر غلظت ۴۰ ppm از آن تهیه شد.



شکل ۱: تصویر اسکن میکروسکوپ الکترونی (SEM) از ذرات نانو نقره (گرفته شده در شرکت پیام آوران نانو فناوری فردانگر).

### تیمار تنش شوری و نانو نقره به طریقه آبیاری

تعدادی گلدان با ظرفیت ۳ کیلو گرم با خاک لومی- شنی تهیه شدند. در هر گلدان چهار عدد بنه در عمق ۱۵ سانتی متری از سطح خاک کاشته شدند. برای هر تیمار و شاهد تعداد ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد و همه آن‌ها در دانشگاه الزهرا تحت شرایط محیطی بهینه کنترل شده از قبیل نور و دما (۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی گراد در روز و ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد در شب) قرار داده شدند. مقداری از بنه‌ها برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی (به عنوان نمونه کنترل) کاشته نشده و در آزمایشگاه نگهداری شدند. گلدان‌های کشت داده شده به چهار دسته، شاهد (آبیاری با آب معمولی)، تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl، تیمار نانو نقره ۴۰ ppm و تیمار توام شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl و نانو نقره ۴۰ ppm تقسیم شدند. تیمارها یک ماه بعد از کاشت زعفران‌ها همراه با آبیاری گلدان‌ها و در دو مرحله به فاصله زمانی یک ماه اعمال شدند. پس از گذشت سه ماه نمونه‌ها برداشت شدند.

### تیمار تنش شوری و نانو نقره به طریقه غوطه‌ور

گلدان‌ها در این روش نیز به چهار دسته‌ی شاهد، تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl، تیمار نانونقره ۴۰ ppm، تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl توام با نانو نقره ۴۰ ppm تقسیم شدند. تعدادی از بنه‌ها که تحت تیمار نانو نقره باید قرار می‌گرفتند در قبل از کاشت به مدت ۹۰ دقیقه در نانو نقره ۴۰ ppm غوطه‌ور گردیدند و سپس در گلدان‌های مشابه کاشته شدند. تیمار دوم یک ماه بعد اعمال شد که برای اعمال تیمار نانو نقره ۴۰ ppm با استفاده از سرنگ مقدار ۱۰ ml نانو نقره ۴۰ ppm به اطراف بنه‌ها تزریق شد (به دلیل اینکه خروج بنه‌ها از خاک و غوطه‌ور کردن آن‌ها در نانو نقره مقدور نبود). تیمارهای شوری نیز در دو نوبت به فاصله یک ماه به گلدان‌ها داده شد. متأسفانه در بین گلدان‌های تیمار داده شده به روش غوطه‌ور بنه‌هایی که تنها با نانو

نقره تیمار داده شده بودند به دلایلی از بین رفتند و برای انجام آزمایشات قابل استفاده نبودند اما بنه‌های شاهد، تیمار شوری و نانو نقره همراه با شوری قابل برداشت و آزمایش بودند. از پژوهش‌های رضوان و همکاران (۲۰۱۲) به عنوان منبع برای اعمال تیمارها استفاده شد.

## سنجش عناصر در بافت گیاهی

### هضم اسیدی

۱ گرم از بنه خشک زعفران همراه با ۱۰ ml نیتریک اسید غلیظ ۶۵ درصد و ۵ ml پرکلریدریک اسید ۷۰ درصد بر روی گرمکن با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از اتمام هضم با آب مقطر به حجم ۵۰ ml رسانده شد. در نهایت توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. از محلول بدست آمده برای سنجش فسفر، سدیم و پتاسیم استفاده شد (Richards, 1954).

### سنجش مقدار فسفر در بنه‌های زعفران تیمار شده

برای تعیین مقادیر فسفر در نمونه‌ها ۵ ml از محلول هضم شده گیاهی با ۵ ml معرف بارتن مخلوط گردید تا رنگ زرد حاصل شود سپس به حجم ۵۰ ml رسانیده و ورتکس گردید. بعد از ۳۰ دقیقه استراحت رنگ زرد واناد-مولیبدو فسفریک ظاهر شد که نشانگر کامل شدن واکنش است. سپس جذب محلول‌ها در ۴۳۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل cecil CE1021) خوانده شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد که در غلظت‌های ۰ تا ۵۰  $\mu\text{g}/\text{mL}$  فسفات منو پتاسیم تهیه شده بود، مقدار فسفر در یک گرم محاسبه و درصد آن در بنه زعفران تعیین گردید (Hanson, 1950).

### سنجش مقدار سدیم و پتاسیم در بنه‌های زعفران تیمار شده

برای تعیین مقادیر سدیم و پتاسیم نمونه‌ها در محلول هضم اسیدی از دستگاه فلیم فتومتر (مدل JENWAY PFP7) با تنظیمات بین صفر (آب مقطر) و صد (غلیظ ترین محلول) استفاده شد و محاسبات با استفاده از نمودار استاندارد سدیم و پتاسیم که در غلظت‌های ۰ تا ۵۰  $\mu\text{g}/\text{mL}$  تهیه شده بود، بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک انجام گرفت (Richards, 1954).

### سنجش مقدار نقره در بنه‌های تیمار شده

مقادیر نقره محلول‌های حاصل از هضم اسیدی نمونه‌ها توسط دستگاه جذب الکتروترمال (مدل contra 700) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران آنالیز گردید.

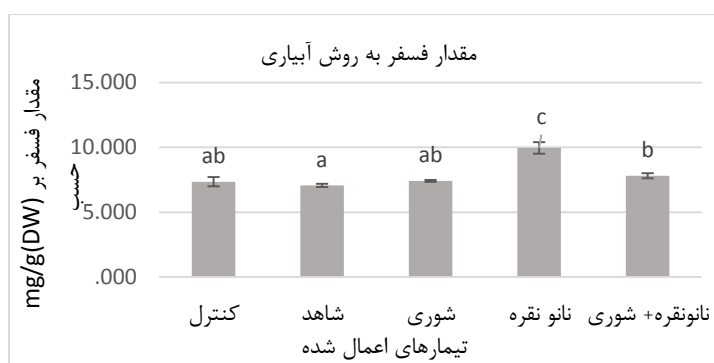
## آنالیزهای آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزارهای SPSS (Version 19) و Excel 2013 برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده گردید و برای آنالیزهای آماری از ANOVA و آزمون Duncan استفاده شد.

## نتایج

### سنجش فسفر

**روش آبیاری:** مقدار فسفر در بنه‌های کنترل (۷/۳۴ mg/gDW)، شاهد (۷/۰۶ mg/gDW)، شوری (۷/۴۱ mg/gDW)، تیمار با نانو نقره ۴۰ ppm (۹/۹۵ mg/gDW) و تیمار نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۷/۸۰ mg/gDW) نشان داد فسفر هر سه تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت که در تیمار با نانو نقره ۴۰ ppm و تیمار نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار تغییرات مقدار فسفر در بنه‌های تیمار داده شده در شوری (NaCl ۱۰۰mM)، نانو نقره ۴۰ ppm و نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (NaCl ۱۰۰mM)

**روش غوطه‌ور:** مقدار فسفر در بنه‌های کنترل (۷/۳۴ mg/gDW)، شاهد (۱۳/۷۶ mg/gDW)، تنش شوری

(۱۴/۰۵ mg/gDW) و تیمار نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۱۲/۶۳ mg/gDW) بدست آمد (شکل ۲).

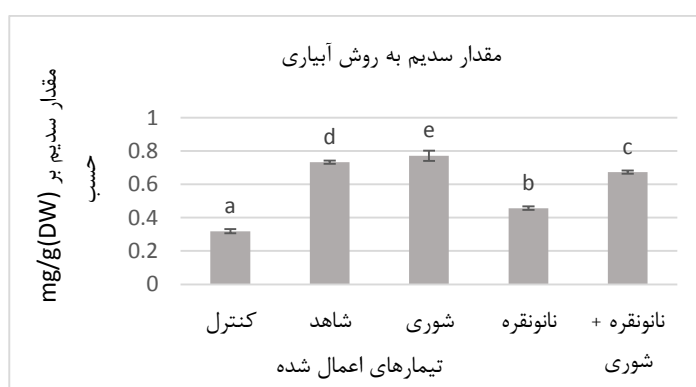


شکل ۲: نمودار تغییرات مقدار فسفر در بنه‌های تیمار داده شده در شوری (NaCl ۱۰۰mM) و نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (NaCl ۱۰۰mM).



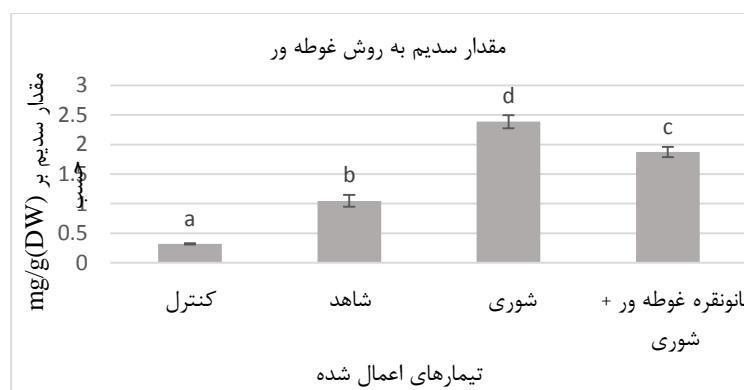
## سنجش سدیم

**روش آبیاری:** مقدار سدیم در بنه‌های کنترل ( $0.31 \text{ mg/gDW}$ )، شاهد ( $0.73 \text{ mg/gDW}$ )، شوری ( $0.77 \text{ mg/gDW}$ )، نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  ( $0.45 \text{ mg/gDW}$ ) و شوری همراه نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  به روش آبیاری ( $0.67 \text{ mg/gDW}$ ) بدست آمد. مقدار سدیم در نمونه شاهد نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری در سطح ( $P \leq 0.05$ ) یافت. غلظت یون سدیم در نمونه شوری نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) داشت و در تیمار نانو نقره همراه با شوری و تیمار نانو نقره به تنهایی نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) یافتند (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار تغییرات مقدار سدیم در بنه‌های تیمار داده شده در شوری ( $100 \text{ mM NaCl}$ )، نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  و نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  همراه با شوری ( $100 \text{ mM NaCl}$ ).

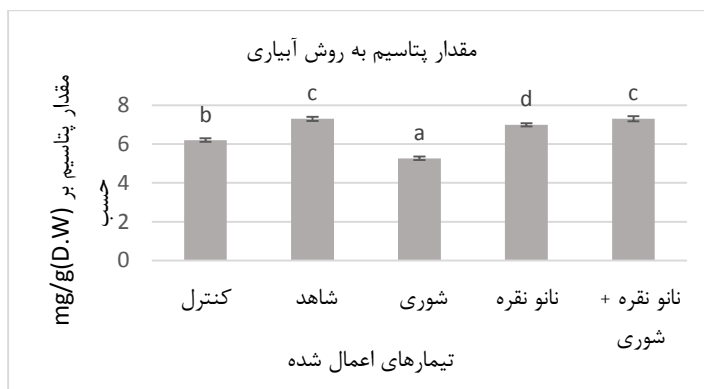
**روش غوطه‌ور:** مقدار سدیم در بنه‌های کنترل ( $0.31 \text{ mg/gDW}$ )، شاهد ( $1.47 \text{ mg/gDW}$ )، شوری ( $1.87 \text{ mg/gDW}$ )، نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  به روش غوطه‌ور همراه با شوری ( $1.87 \text{ mg/gDW}$ ) بدست آمد. نمونه شاهد نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) یافت. نمونه شوری و نمونه تیمار شوری همراه با نانو نقره نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) یافت (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار تغییرات مقدار سدیم در بنه‌های تیمار داده شده در شوری ( $100 \text{ mM NaCl}$ ) و نانو نقره  $40 \text{ ppm}$  همراه با شوری ( $100 \text{ mM NaCl}$ ).

## سنجش پتاسیم

روش آبیاری: مقدار پتاسیم در بنه‌های کنترل (۶/۲۰ mg/gDW)، شاهد (۷/۳۰ mg/gDW)، شوری (۷/۳۰ mg/g DW)، تیمار با نانو نقره ۴۰ ppm (۶/۹۹ mg/gDW) و تیمار نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۷/۳۰ mg/gDW) بدست آمد. مقدار پتاسیم در نمونه‌های تیمار با شوری و تیمار با نانو نقره کاهش معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) یافت. مقدار پتاسیم در نمونه کنترل نسبت به شاهد کمتر شد که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار تغییرات مقدار پتاسیم در بنه‌های تیمار داده شده در شوری (۱۰۰mM NaCl)، نانو نقره ۴۰ ppm و نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۱۰۰mM NaCl).

روش غوطه‌ور: مقدار سدیم در بنه‌های کنترل (۶/۲۰ mg/gDW)، شاهد (۸/۰۸ mg/gDW)، شوری (۷/۳۰ mg/gDW)، نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۷/۶۱ mg/gDW) بدست آمد که در نمونه شوری نسبت به شاهد افزایش و در تیمار با نانو نقره همراه با شوری کاهش مشاهده شد که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود (شکل ۶).



شکل ۶: نمودار تغییرات مقدار پتاسیم در بنه‌های تیمار داده شده در شوری (۱۰۰mM NaCl) و نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری (۱۰۰mM NaCl).

## بررسی مقادیر عنصر نقره در بنه‌های تیمار شده

مقدار نقره مشاهده شده در تمام نمونه‌ها کمتر از ۵ ppb بود، در واقع می‌توان نتیجه گرفت نانو نقره درونی بر اساس استانداردها در حد آلودگی نبود و در حد مجاز می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: مقدار یون نقره در بنه‌های تیمار داده شده به روش آبیاری.

نمونه‌ها	مقدار نقره	Ag(ppb)
	شاهد	<۵
	شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl	<۵
	نانو نقره ۴۰ ppm	<۵
	نانو نقره ۴۰ ppm همراه با شوری ۱۰۰ میلی مولار NaCl	<۵

## بحث

**روش آبیاری:** میزان فسفر در تیمار شوری، نانو نقره ۴۰ ppm و تیمار شوری همراه با نانو نقره ۴۰ ppm افزایش یافت که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود. نتایج مطابق با یافته‌های طالعی و همکاران (۲۰۱۲) بود که نشان داد فسفر در گیاهان ذرت تحت شرایط نمک افزایش می‌یابد. نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد هر دو تیمار شوری و نانو نقره باعث افزایش مقادیر فسفر شدند.

فسفر به عنوان یک جزء ضروری نوکلئیک اسیدها، قندهای فسفریله شده، فسفولیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد که تمام فرایندهای زندگی را کنترل می‌کند و به عنوان ناقل‌های انرژی برای بسیاری از واکنش‌های زیستی عمل می‌کند (Reddy, 2006). مظلومی و رونقی (۱۳۹۱) گزارش دادند فسفر نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دارد و نیاز به فسفر کافی در محیط شور، مربوط به نقش این عنصر در تنظیم تجمع و یا کدبندی یون‌ها در داخل سلول است.

میزان سدیم در تیمار شوری افزایش و در تیمار نانو نقره ۴۰ ppm و تیمار شوری همراه با نانو نقره ۴۰ ppm کاهش یافت که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود. کاتیون‌های نقره از طریق کانال‌های سدیم و مس وارد سلول می‌شوند در نتیجه ایجاد رقابت با یون‌های سدیم باعث کاهش غلظت سدیم در سلول می‌گردد (Winkelmann et al., 2015).

مؤمن پور و همکاران (۱۳۹۳) اعلام کردند با افزایش غلظت شوری، مقدار سدیم در برگ و ریشه در رقم‌های بادام افزایش یافت. در پژوهش حاضر نیز مقدار سدیم در بنه‌ها افزایش یافت. در شوری بالا، کنترل هموستازی شامل خروج سدیم از سیتوپلاسم با حفظ غلظت پتاسیم است (Diédhiou, 2006).

میزان پتاسیم در تیمار شوری و در تیمار نانو نقره ۴۰ ppm کاهش یافت و در تیمار شوری همراه با نانو نقره ۴۰ ppm

نسبت به شاهد تغییری مشاهده نشد. اثرات تعدیل کنندگی توسط نانو نقره، در تنش شوری همراه با نانو نقره مشاهده شد.

میزان یون نقره اندازه گیری شده در بافت‌های تمامی بنه‌ها در این پژوهش دارای غلظت بسیار اندک و در حد کمتر از

۵ ppb بود. سیف سهندی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که غلظت یون نقره در گیاه *Borago officinalis* L. تحت تیمار نانو

نقره و نیترات نقره نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است.

**روش غوطه‌ور:** میزان فسفر در این روش در تنش شوری افزایش یافت ولی معنی‌دار نبود، در تنش شوری همراه با

تیمار نانو نقره کاهش مشاهده شد که در سطح ( $P \leq 0.05$ ) معنی‌دار بود.

در پژوهش اخیر میزان فسفر در تنش شوری همراه با نانو نقره نسبت به شوری کاهش یافت که بیانگر این می‌تواند

باشد که نانو نقره میزان نیاز به فسفر را تا حدی کاهش داده است. گیاه وقتی در شرایط شوری قرار می‌گیرد میزان جذب فسفر

را افزایش می‌دهد تا بتواند فرایندهای زیستی خود را از جمله فتوسنتز انجام دهد و رشد آن کاهش نیابد (Villiers, 2007). در

نتیجه نانو نقره در این پژوهش اثرات مخرب ناشی از تنش شوری را کاهش داده است. کریمی و همکاران در سال ۱۳۹۵ گزارش

دادند که نانو نقره همراه با تنش شوری در بسیاری از سنجش‌ها از قبیل میزان وزن خشک بنه دختری، طول ریشه‌ها و محتوای

کارتونوئیدها باعث کاهش شدت اثر منفی شوری بر گیاه می‌شود و نقش تعدیل کنندگی دارد.

میزان سدیم در تنش شوری و تیمار شوری همراه با نانو نقره ۴۰ ppm افزایش معنی‌داری در سطح ( $P \leq 0.05$ ) نسبت

به شاهد یافت. میزان پتاسیم نیز در تنش شوری افزایش و در تیمار شوری همراه با نانو نقره ۴۰ ppm کاهش معنی‌داری نسبت

به شاهد در سطح ( $P \leq 0.05$ ) یافت.

کریمی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش دادند که میزان غلظت پرولین در تنش شوری و نانو نقره افزایش می‌یابد. افزایش

پرولین در گیاه نشان دهنده آن است که گیاه برای حفظ تعادل اسمزی به جای اینکه غلظت پتاسیم را افزایش دهد متوسل به

افزایش پرولین شده است.

تغییرات غلظت یون‌ها در بنه زعفران در آزمایشات نقی زاده و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که غلظت پتاسیم تحت تأثیر

شوری قرار نگرفته است اما غلظت سدیم با اعمال شوری ۶ دسی زیمنس بر متر شروع به افزایش می‌کند. از طرف دیگر نسبت

یون‌های سدیم به پتاسیم هم با افزایش شوری به شدت زیاد شد. این موضوع می‌تواند باعث بروز اثرات سمیت یونی در زعفران

شده و عملکرد گیاه را با مشکل مواجه کند. اگرچه پتاسیم می‌تواند در تنظیم اسمزی برخی گیاهان نقش داشته باشد، اما در

سطوح شوری انتخاب شده، این عنصر نقشی در تنظیم اسمزی زعفران نداشت (Naghizadeh, 2014). در پژوهش حاضر نیز

غلظت سدیم در تیمار شوری افزایش یافت و مطابقت با گزارش فوق داشت که با بکار گیری نانو نقره در تنش شوری اثرات مضر

سدیم کاسته شد.

## نتیجه گیری

بر طبق نتایج بدست آمده تیمار شوری در گیاه زعفران در غلظت ۱۰۰ میلی مولار NaCl باعث ایجاد تنش گردید، در نتیجه گیاه برای مقابله با این تنش و حفظ بقای خود تغییراتی را در مکانیسم‌های حیاتی خود ایجاد کرد. به دلیل تجمع یون‌های سدیم و کاهش فشار اسمزی با افزایش غلظت پتاسیم باعث افزایش فشار اسمزی و حفظ تعادل یونی شد، همچنین به دلیل اینکه در تنش شوری میزان رشد کاهش می‌یابد گیاه با افزایش میزان فسفر میزان رشد خود را افزایش داد. از سوی دیگر نانو نقره همراه با تنش شوری باعث تعدیل شدت اثر منفی شوری بر گیاه گردید. نانو نقره باعث کنترل ورود سدیم به سلول شد و در نتیجه سلول نیازی به افزایش عنصر پتاسیم جهت افزایش فشار اسمزی خود نداشت. اگر غلظت نانو نقره بیش از حد شود اثرات سمی را در گیاهان ایجاد می‌کند و می‌تواند تغییرات متفاوتی در ترکیبات گیاه ایجاد نماید.

## منابع

آرمان آذری، سید علی محمد مدرس ثانوی، حسین عسکری، فائزه قناتی، امیرمحمد ناجی و بهرام علیزاده (۱۳۹۱) اثر تنش شوری بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک دو گونه کلزا و شلغم روغنی (*Brassica napus* and *B. rapa*). مجله علوم زراعی ایران جلد چهاردهم، شماره ۲.

کریمی جعفری، آزاده، حسین زاده نمین، منیر (۱۳۹۵) اثر شوری و نانو نقره بر پارامترهای رشد و خصوصیات بیوشیمیایی بنه زعفران تیمار شده در شرایط غوطه‌ور. دوره بیست و نهم، شماره ۳، صفحه ۱۵۹ الی ۱۷۴.

مظلومی، فرهاد و رونقی، عبدالمجید (۱۳۹۱) اثر شوری و فسفر بر رشد و ترکیب شیمیایی دو رقم اسفناج. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، سال سوم، شماره نهم.

مؤمن پور، علی، بخشی، داود، ایمانی، علی و رضایی، حامد (۱۳۹۳) اثر تنش شوری بر خصوصیات رشدی و غلظت عناصر غذایی در رقم‌های بادام، شاهرود ۱۲، 'تونو' و ژنوتیپ '۱۶ - ۱' پیوندشده روی پایه GF677. به زراعی کشاورزی. ۱۷(۱): ۱۹۷-۲۱۶

Acosta-Motos, Jose Ramón, Ortuño, Maria Fernanda, Bernal-Vicente, Agustina, Diaz-Vivancos, Pedro, Sanchez-Blanco, Maria Jesus and Hernandez, Jose Antonio (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7: 18.

Diédhiou Calliste Jérémie (2006). Mechanisms of Salt Tolerance: Sodium, Chloride and Potassium Homeostasis in two Rice Lines with Different Tolerance to Salinity Stress. Thesis Submitted to obtain Dr. rer. nat. at the Faculty of Biology University of Bielefeld, Bielefeld, Germany, 132 Pp.

Estefan, G., Sommer, R. and Ryan, J. (2013). *Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A manual for the West Asia and North Africa region* George. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), 243 Pp, Beirut.

Eslami M., Bayat M., Mozaffari Nejad A., Sabokbar A., Anvar A. (2016). Effect of polymer/nanosilver composite packaging on long-term microbiological status of Iranian saffron (*Crocus sativus* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 341–347.

- Ghavam, Mansureh (2018). Effect of Silver Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth in *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak under Salinity Stress. *Journal of Rangeland Science*, 8(1): 93-100.
- Hanson, WC. (1950). The photometric determination of phosphorus in fertilizers using the phosphovanadomolybdate complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1(6): 172-173.
- Horie, Tomoaki, Hauser, Felix and Schroeder Julian I. (2010). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Science*, 14(12): 660-668.
- Kan, M.H. and Panda S.K. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant*, 30: 81-89.
- Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. *Plant growth metabolism. Process Biochem*, 47(4): 51-658.
- Mohamed, Abdel Kareem S.H., Qayyum, Muhammad Farooq, Abdel-Hadi, Ahmed Mustafa, Rehman, Rabia Abdur, Ali, Shafaqat and Rizwan, Muhammad (2017). Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 21-40.
- Naghizadeh, Mahdi, Gholami Shabestari, Mahmood and Shamsaddin Saied, Mohadeseh (2014). The study of some physiological responses of three Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) landraces to salinity stress *Saffron. Agronomy & Technology*, 2(3): 127-136.
- Negrao, S., Schmoekel S. M. and Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119: 1-11.
- Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F., Aminkhani, A. (2014). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.). *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4:11.
- Pallavi, Mehta, C. M., Srivastava, R., Arora, S., Sharma, A. K. (2016). Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *3 Biotech*, 6(254): 1-10.
- Rajaei, S.M., Niknam, V., Seyedi, S.M., Ebrahimzadeh, H. and Razavi, K. (2009). Contractile roots are the most sensitive organ in *Crocus sativus* to salt stress. *Biology Plantarum* 53 (3): 523-529.
- Reddy, K.J., Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S. (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, pp 187-217.
- Rezvani, N., Sorooshzadeh, A., Farhadi, N. (2012). Effect of Nano-Silver on Growth of Saffron in Flooding Stress. *World Academy of Science Engineering and Technology*, 6(1): 11-16.
- Richards, L. A. (1954). *Diagnosis and improvement of saline and alkali soil*. Agriculture hand book, United States department of agriculture, 160 Pp. Washington.
- Salama 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(10): 190-197.
- Savithamma N, Ankanna S, Bhumi G (2012). Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon. *Nano Vision*, 2:61-68.
- Seif Sahandi M., Sorooshzadeh, A., Rezazadeh, H. S. and Naghdibadi H. A (2011). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5): 706-710.
- Sharma P, Bhatt D, Zaidi MG, Saradhi PP, Khanna PK, Arora S (2012). Silver nanoparticle mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotechnol*, 167: 2225-2233.
- Sharma, Tripti, Dreyer, Ingo and Riedelsberger, Janin (2013). The role of K<sup>+</sup> channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Science*, 4: 224.
- Siddiqui M., Al-Wahaibi M., Firoz M. and Al-Khaishany M., (2015). *Role of Nanoparticles in Plants*. Springer International Publishing Switzerland, *Nanotechnology and Plant Sciences*, 19-35.

- Sillen WM, Thijs S, Abbamondi GR, Janssen J, Weyens N, White JC, Vangronsveld J (2015). Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 91: 14–22
- Sorooshzadeh, Ali, Hazrati, Saeid, Oraki, Hussein, Govahi, Mostafa, Ramazani, Ahmad (2012). Foliar application of nano-silver influence growth of saffron under flooding stress. *NANOCON*, the International Conference on Nanotechnology. Brno, Czech Republic, 1-4.
- Talei, Daryush, Kadir, Mihdzar Abdul, Yusop, Mohd Khanif, Valdiani, Alireza and Abdullah, Mohd Puad (2012). Salinity effects on macro and micronutrients uptake in medicinal plant King of Bitters (*Andrographis paniculata* Nees.). *POJ*, 5(3): 271-278.
- Villiers, c., (2007). The effect of Phosphorus on the growth, plant mineral content and essential oil composition of Buchu (*Agathosma betulina*). Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of master of agricultural science at Stellenbosch university. Study leader: prof. G.A. Agenbag. Co-study leader: Dr. P. Langenhoven, 108 Pp.
- Winkelmann, K. and Palmer, A. (2015) Phytotoxicity of Silver Nitrate and Silver Nanoparticles on *Elodea canadensis* Leonard Bernas. Engineering & science student design showcase at Florida Institute of Technology.
- Yarami, N., Sepaskhah, A.R. (2016) Effect of irrigation water salinity, manure application and planting method on soil ions variation and ions uptake by saffron (*Crocus sativus* L.). *International Journal of Plant Production* 10 (2): 197-219.
- Zhu, J. K. (2001) Plant salt tolerance. *TRENDS in Plant Science* 6(2): 66-71.

---

## The effect of nano silver on elements of saffron corms under salinity condition

A.karimi jafari<sup>1</sup>, m. hoseinzadeh namin\*<sup>1</sup>

Received:  
Accepted:

### Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a member of Iridaceae family, which especially its stigma and corm are important in medicine and food. Today, silver nanoparticles with antimicrobial and antifungal properties are used in many fields and also affect on ethylene receptors in plants. In Iran, due to increasing saline soils, the study on reducing effects of salinity stress by using nanosilver in plants can be used to control the effects of salinity stress in plants. For this purpose, the experiment was carried out using four treatments: nano silver (40 ppm), salinity (100 mM NaCl), nano silver (40 ppm) whit salinity (100 mM NaCl), control without any treatment and primary corm, with two applied methods of irrigation and soaking. The amount of phosphorous, sodium and potassium ions of treated corms were investigated. Results showed that phosphorous ion compared to control and primary corm increased in all stresses, which was significant at level ( $P \leq 0.05$ ). The concentration of sodium in irrigation method and potassium in soaking method increased in salt stress (0.77 mg / gDW)(9.9 mg / gDW), but using salinity stress with nano silver (0.67 mg / gDW)(7.61 mg / gDW) showed a significant decrease in the levels of two mentioned ions ( $P \leq 0.05$ ) compared to control(0.73 mg / gDW)(8.08 mg / gDW). In this study, the use of nanosilver particles under salt condition showed that the effects of salinity have been influenced as phosphorous ion increased and amount of sodium and potassium ions modified.

**Keywords:** Agricultural saffron, Concentration of ions, Nano silver treatment, Salinity stress.

---

1- University of Alzahra, Faculty of biology

\*(Corresponding author. E-mail: monirhosseinzade@yahoo.com)



# مقایسه ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های *Mentha spicata* L. و *Mentha longifolia* L. با روش‌های مختلف استخراج

نیر محمدخانی<sup>۱\*</sup>، ژیلا عباس زاده<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۸

## چکیده

نعنا سبز، *Mentha spicata* L. و پونه کوهی، *Mentha longifolia* L. کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و طب سنتی ایران دارند. سرشاخه‌های گیاهان جمع‌آوری شده و اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب (کلونجر) استخراج گردید. عصاره‌گیری با استفاده از دو روش ماسراسیون (حلال‌های آبی، هیدروالکلی و اتانولی) و روش سوکسله (حلال اتانولی) انجام شد. محتوای ترکیبات فنولی کل، محتوای فلاوونوئید کل، ظرفیت پاداکسایشی و درصد مهار تولید رادیکال آزاد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد محتوای ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی، ظرفیت پاداکسایشی و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH تحت تأثیر روش استخراج قرار گرفت. بیش‌ترین میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئید کل در گیاه نعنا سبز در روش سوکسله به دست آمد. بالاترین ظرفیت پاداکسایشی مربوط به عصاره هیدروالکلی نعنا سبز بود. روش استخراج با سوکسله بدلیل هزینه فرآوری پایین آن، سادگی عمل، صرف زمان کمتر و حلالیت بیشتر در مقایسه با دیگر روش‌های سنتی مانند خیساندن و پرکولاسیون برای استخراج ترکیبات فنولی توصیه می‌شود. استفاده از سیستم دو حلالی در روش خیساندن با حلال‌های دیگر برای دستیابی به خاصیت پاداکسایشی بالا نیازمند تحقیقات بیشتر است.

## واژه‌های کلیدی: اسانس، حلال، روش سوکسله، سرشاخه گیاهان، عصاره

## مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک حاصل از آن‌ها به عنوان منابع طبیعی دارای خاصیت پاداکسایشی، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Kulisic et al., 2004). اثرات پاداکسایشی مواد گیاهی تا حدودی به حضور ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی آن‌ها نسبت داده می‌شود که در بخش‌های مختلف گیاهی مانند ریشه، برگ، پوست، میوه و دانه وجود دارند (Mathew & Abraham, 2006). قدرت پاداکسایشی نعنائیان عمدتاً به وجود فنول‌ها بستگی دارد. عمده ترکیبات فنولی موجود

۱- استادیار، گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میان‌دوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

\* (نویسنده مسئول: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir)

۲- دانش آموخته مهندسی تولیدات گیاهان دارویی و معطر، مرکز آموزش عالی شهید باکری میان‌دوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

در گیاهان تیره نعنا شامل رزمارینیک اسید و فلاوونوئیدها از جمله فلاون‌ها، فلاونون‌ها و اشکال گلیکوزیدی آن‌ها است (Areias *et al.*, 2001).

نحوه عصاره‌گیری از این گیاهان، به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات پاداکسایشی، بسیار مهم است. اندام گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب‌شده می‌تواند روی کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت تجربیات متعددی جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است (Kothari *et al.*, 2012; Fernandez-Ponce *et al.*, 2012). معمولاً کارایی استخراج ترکیبات فنولی تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر روش استخراج، نوع حلال، غلظت حلال، زمان تماس، دمای استخراج، نسبت حلال جامد و اندازه ذرات قرار می‌گیرد (Chirinos *et al.*, 2007). عمدتاً برای عصاره‌گیری با حلال از استخراج‌کننده‌هایی مانند متانول، اتانول و استون یا مخلوطی از آن‌ها با آب استفاده می‌کنند (Abad-Garcia *et al.*, 2007). استفاده از آب همراه با سایر حلال‌های آلی در ایجاد یک محیط نسبتاً قطبی اثر دارد که استخراج پلی‌فنول‌ها را تضمین می‌کند (Chirinos *et al.*, 2007).

روش سوکسله نیز یک روش عمومی بوده که به طور عمده برای استخراج ترکیبات با فراریت کم یا متوسط که در مقابل حرارت پایدار باشند به کار می‌رود (Loque de Caster & Garcia-Ayuso, 1998). اسانس‌ها را معمولاً از طریق تقطیر گیاهان اسانس‌دار تهیه می‌کنند و روش استفاده، بستگی به نوع و حالت مواد گیاهی دارد. تقطیر با آب رایج‌ترین روش برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی می‌باشد که سودمندی آن در تحقیقات نیز ثابت شده است (Stahl-Biskup & Saez, 2002). نعنا سبز یا نعنا خوراکی (*Mentha spicata* L.) را در طب سنتی، برای هضم بهتر مواد، افزایش حرکات دستگاه گوارش، درمان سرماخوردگی، وبا و کاهش التهاب برونش‌ها استفاده می‌کنند. امروزه نیز از این گیاه در تهیه بسیاری از غذاها و همچنین در لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود.

تحقیقات، فعالیت بالای پاداکسایشی در عصاره گونه‌های مختلف نعنا را نشان داده است (Damein Dorman *et al.*, 2003; Kamkar *et al.*, 2010).

پونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia* (L.) Hud. گیاهی چندساله و معطر است (Stanivljević *et al.*, 2014) که در طب سنتی غالباً از دم‌کرده برگ‌های آن به عنوان مدر (Ghaderi *et al.*, 2014)، تسریع‌کننده هضم، رفع آسم، اسپاسم، نفخ، درد معده، سردرد، سرماخوردگی و سرفه و همچنین در استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم استفاده می‌شود و به عنوان پاداکساینده مقوی سیستم ایمنی، ضد قارچ، ضد التهاب و ضد میکروب استفاده می‌شود (Unnithan *et al.*, 2013). Akroum و همکاران (2009) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) وجود اسیدهای فنولی و فلاوونوئیدها به مقدار زیاد را در گیاه پونه کوهی نشان دادند.

استخراج و خالص سازی ترکیبات فیتوشیمیایی از منابع طبیعی مورد نیاز است، زیرا این مواد زیست فعال اغلب در تهیه مکمل های غذایی، نوشیدنی ها، افزودنی های غذایی، محصولات دارویی و آرایشی استفاده می شوند (Gao & Mazza, 1996).

نعنا سبز و پونه کوهی جزو گیاهان بومی کشور می باشند و برای مصارف مختلف غذایی و دارویی بسیار در دسترس هستند. پژوهش حاضر به منظور مقایسه روش های استخراج مختلف ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی دو گونه دارویی نعنا سبز و پونه کوهی و مقایسه توان پاداکساینده عصاره حاصل از این روش های استخراج به انجام رسید.

## مواد و روش ها

### جمع آوری اندام های گیاهی

نمونه های اندام های هوایی گیاهان نعنا و پونه در فروردین ماه سال ۱۳۹۵ در اوایل رشد از روستای دشه شهرستان پاوه (استان کرمانشاه) با مختصات  $46^{\circ}16'$  طول شرقی و  $35^{\circ}3'$  عرض شمالی و ارتفاع ۱۱۵۹ متری از سطح دریا جمع آوری شدند. نمونه های گیاهی در قالب سه تکرار جمع آوری شدند که هر تکرار مربوط به ۲۰ بوته از گیاه نعنا سبز و پونه کوهی بود. بعد از تمیز کردن نمونه های گیاهی و پس از شستشو با آب مقطر، نمونه های مذکور تحت شرایط طبیعی محیطی در یک اتاقک تاریک به مدت ده روز خشک گردیدند؛ سپس نمونه های خشک شده، با هاون پودر شدند و جهت عصاره گیری در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

### عصاره گیری به روش ماسراسیون

در این روش عصاره گیری با آب، حلال هیدروالکلی (۷۰٪ اتانول) و اتانول ۹۶ درصد انجام شد. بدین ترتیب که پس از خشک شدن نمونه ها، ۲۰۰ میلی لیتر حلال به ۲۰ گرم از ماده خشک هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به مدت ۶ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت و پس از گذشت زمان مذکور، عصاره های حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شدند و در نهایت همه ی عصاره ها تا زمان انجام آزمون در ظروف استریل غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال نگهداری شدند (Sultana et al., 2009).

### اسانس گیری با دستگاه کلونجر

پس از پودر کردن بخش های هوایی گیاه، ۲۰ گرم از هر نمونه به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت عصاره گیری شد. از آنجایی که عصاره ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساس اند و در چنین شرایطی ترکیبات آن ها دچار تغییر و تحول می گردد، لذا بلافاصله عصاره استخراج شده به یک شیشه تیره دربسته منتقل و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری گردید.

### عصاره‌گیری با دستگاه سوکسله

عصاره‌ها به نسبت وزن به حجم (W/V) تهیه شدند. ۲۰ گرم از پودر خشک گیاه توزین شد و در ۲۰ سی سی حلال کلروفرم یا n-هگزان به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا چربی موجود در نمونه پودر شده خارج گردید. پس از گذشت زمان مذکور مخلوط حلال و پودر گیاه فیلتر شد و به همراه ۱۵۰ سی سی اتانول ۹۶ درصد درون بالن ریخته و بالن در شرایط رفلکس قرار داده شد و عمل عصاره‌گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت (Herzi et al., 2013). عصاره‌های استخراج شده به هر روش قبل از استفاده با حلال مربوطه به حجم یکسان رسانده شدند.

### تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل

تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل به روش فولین-سیوکالتنو (Horwitz, 1984) انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵٪)، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتنو و ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. جذب محلول حاضر در ۷۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-visible, WPA S2100, UK) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گالیک اسید تهیه شد (Herzi et al., 2013) و محتوای ترکیبات فنولی کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گزارش شد.

### تعیین محتوای فلاوونوئید کل

محتوای فلاوونوئید کل با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم به روش بونوهی و همکاران (Serra Bonvehi et al., 2001) تعیین شد. ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره و ۰/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه با ۱ میلی‌لیتر  $AlCl_3$  ۲٪ (محلول ۵٪ استیک اسید در متانول) مخلوط شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ۴۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-visible, WPA S2100, UK) خوانده شد. منحنی استاندارد با قرائت جذب غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد. محتوای فلاوونوئید عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک گزارش شد.

### ارزیابی ظرفیت پاداکسایشی کل

ظرفیت پاداکسایشی کل عصاره‌ها به روش فسفومولیبدات آنالیز شد (Prieto et al., 1999). ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره با ۳ میلی‌لیتر معرف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) مخلوط شد به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم  $95^{\circ}C$  قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. آسکوربیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. ظرفیت پاداکسایشی کل به صورت میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه گزارش شد.

## بررسی درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)

فعالیت جاروب رادیکال‌های آزاد با استفاده از رادیکال آزاد ۱ و ۱- دی فنیل- ۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به روش بلویس (Blois, 1958) اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر DPPH متانولی ۰/۲ میلی‌مول مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۲۵ قرار گرفت. میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای عصاره‌های مربوط به روش خیساندن با آب و روش کلونجر از آب مقطر فاقد عصاره به عنوان شاهد؛ در روش کلونجر و روش خیساندن با اتانول از اتانول ۰/۹۶٪ به عنوان شاهد؛ و در روش خیساندن با حلال هیدروالکلی از اتانول ۰/۷۰٪ به عنوان شاهد استفاده گردید و درصد بازدارندگی با فرمول زیر محاسبه شد (Herzi et al., 2013):

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [(\text{OD control} - \text{OD sample}) / \text{OD control}]$$

inhibition: درصد بازدارندگی (درصد بازداری پاداکساینده در برابر رادیکال آزاد).

OD control: جذب شاهد

OD sample: جذب نمونه

## تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار مربوط به سه تکرار بیان شده‌اند. نتایج از نظر آماری و اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS, version 19.0 انجام شد. رسم نمودارها با همین نرم افزار صورت گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون GLM استفاده شد. تست مقایسات چندگانه Tukey ( $P < 0.05$ ) برای تعیین تفاوت بین عصاره‌ها استفاده شد.

## نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی دو گیاه با روش‌های استخراجی مختلف نشان داد که تفاوت در میزان فنول کل بین روش استخراج و گیاهان، معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بود ولی تفاوت اثر متقابل بین روش استخراج و گیاهان معنی‌دار نبود. با توجه به جدول آنالیز واریانس مشاهده شد که تفاوت در میزان فلاوونوئید کل بین روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان، معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بود. جدول آنالیز واریانس هم‌چنین نشان داد، تفاوت در مقادیر ظرفیت پاداکسایشی کل روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق جدول آنالیز واریانس، تفاوت درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد روش استخراج، گیاهان و اثر متقابل روش استخراج و گیاهان معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بود (جدول ۱).

**جدول ۱: تجزیه واریانس مقایسه ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و خاصیت پاداکسایشی عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج.**

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		محتوای ترکیبات فنولی	محتوای فلاوونوئید	ظرفیت پاداکسایشی
		کل	کل	کل
روش استخراج	۴	۲۴/۳۲**	۰/۰۶**	۶۷۹/۶۰**
گیاه	۱	۳/۱۵**	۰/۰۰۴**	۱۰۷۲۷/۴۱**
روش استخراج × گیاه	۴	۰/۴۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲**	۲۲۶/۱۰**
خطای آزمایش	۲۰	۰/۱۸	۰/۰۰۰	۳۵/۵۶
ضریب تغییرات	—	۱۲/۳۹	۱۹/۵۲	۱۱/۱۸
درصد بازدارندگی				۵۰۵/۲۰**
				۱۷۰۲/۸۰**
				۱۴۱/۲۳**
				۱/۲۷
				۱۸/۲۲

\*\* و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

نوع روش به کار رفته برای استخراج و عصاره‌گیری از بافت‌های گیاهی به نوع بافت گیاهی، نوع ماده جدا شدنی و مقاومت ماده جدا شده به حرارت بستگی دارد و انتخاب یک روش مناسب استخراج می‌تواند غلظت پاداکساینده‌های مربوط به گیاه را افزایش دهد. هر روش، راندمان استخراج متفاوتی دارد و ترکیبات مختلفی در عصاره حاصل از هر روش موجود است (Suhaj, 2006). استخراج با حلال در دمای محیط و استخراج با حلال با استفاده از حرارت به روش سوکسله از روش‌های متداول عصاره‌گیری هستند. در این روش‌ها گیاه مورد نظر و حلال به مدت مشخصی در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند و در نهایت، پس از عمل استخراج، حلال جدا می‌شود (Suhaj, 2006).

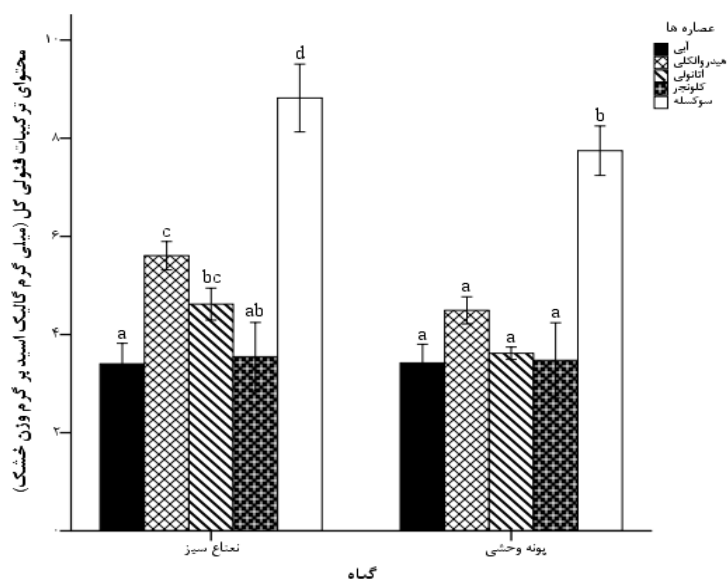
یافته‌های حاصل از بررسی اثر روش‌های استخراج بر محتوای ترکیبات فنولی تام در شکل ۱ نشان داد که بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولی در گیاه نعنا سبز و پونه کوهی از روش سوکسله به دست آمد. هم‌چنین میزان ترکیبات فنولی به دست آمده از روش سوکسله و ماسراسیون (حلال اتانولی و هیدروالکلی) هم در نعنا سبز و هم در پونه کوهی اختلاف معنی‌داری نسبت به هم داشتند ( $P < 0.05$ ). با مقایسه هر دو گیاه، بیش‌ترین محتوای تام فنولی مربوط به روش سوکسله و گیاه نعنا سبز با مقدار  $۸/۸۲ \pm ۰/۶۰$  میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک نمونه بود.

طبق نتایج به دست آمده، نوع حلال و نوع روش استخراج دو عامل مؤثر بر میزان بازده استخراج شناخته شدند. نتایج نشان داد که روش سوکسله بیش‌ترین و روش ماسراسیون (عصاره آبی) کم‌ترین بازده در استخراج ترکیبات فنولی را در گونه نعنا سبز داشت. محققانی همچون Pinelo و همکاران (2005)، Yilmaz و Toledo (2004) در پژوهش‌های خود روند استخراج ترکیبات فنولیک را بررسی نمودند. این محققان اعلام داشتند که در دماهای بالا، کاهش در میزان استخراج ترکیبات فنولیک مشاهده شده‌است که دلیل این موضوع را واکنش‌های پلیمریزاسیون ترکیبات فنولیک با خودشان بیان نمودند که این موضوع با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت ندارد. Biswas و همکاران (2012) نشان دادند که از بین عصاره‌های مختلف نعنا، عصاره آبی نعنا کم‌ترین

میزان فنول را داشت که بیشترین میزان مهار DPPH را نشان داد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. Barchan و همکاران (2014) بیان کردند که بیشترین ترکیبات فنولی کل به ترتیب در عصاره‌گیری با سوکسله با استفاده از حلال متانول و آب در گیاه *M.spicata* وجود دارد و محتوای ترکیبات فنولی کل در گونه *M.spicata* بیشتر از *M.piperita* و *M.pulegium* می‌باشد که با نتایج پژوهش حاضر تطابق دارد با این تفاوت که در پژوهش حاضر از اتانول به عنوان حلال مورد نظر در دستگاه سوکسله استفاده شد.

نتایج یک مقاله پژوهشی نشان داد که عصاره گل‌آذین گیاه زولنگ (یک گیاه دارویی از خانواده چتریان) دارای محتوای تام فنولی ۵/۸/۵۸، ۱/۶۰ و ۵/۱۰۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی التراسونیک، خیساندن و سوکسله بود. نتایج حاکی از وجود مواد فنولی بیش‌تر در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بود (Riekandeh et al., 2016)، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

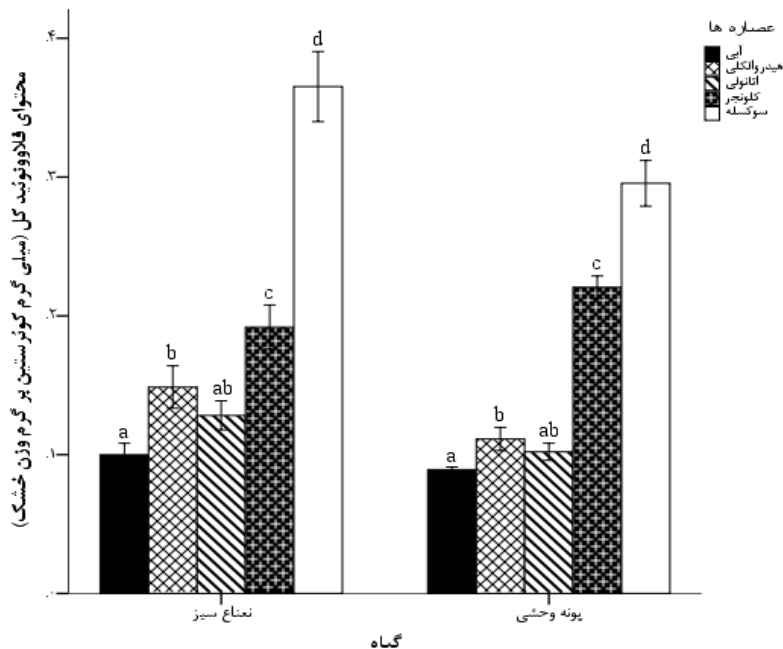
کم‌ترین محتوای ترکیبات فنولی در پژوهش حاضر در روش خیساندن در حلال آب مشاهده شد. این می‌تواند به این دلیل باشد که درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات فنولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ترکیبات فنولی ترکیبات حجیم و با قطبیت پایین می‌باشند. در مقایسه با حلال‌هایی مانند اتانول و متانول، استخراج با آب مقدار کمتری از ترکیبات فنولی را به همراه دارد. آب بیش‌ترین ثابت دی‌الکتریک را نسبت به حلال‌های معمول دارد. بنابراین میزان استخراج پاداکساینده و ترکیبات فنولی توسط آب کمتر می‌باشد (Proestos & Komaitis., 2008).



شکل ۱: مقایسه محتوای ترکیبات فنولی کل عصاره‌های دو گیاه ننا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

بر طبق شکل ۲ یافته‌های حاصل از بررسی اثر روش‌های استخراج بر محتوای فلاوونوئید تام نیز نتیجه‌گیری شد که روش سوکسله در هر دو گیاه از بازده بهتری برخوردار بود. بین روش سوکسله و استخراج اسانس نیز هم در نعنا سبز و هم در یونه کوهی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). در کل بیش‌ترین میزان فلاوونوئید کل در روش سوکسله و گیاه نعنا سبز با مقدار  $0.37 \pm 0.02$  میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک نمونه به‌دست آمد.

در دهه‌های اخیر، توجه خاصی به اثرات پاداکسایشی فلاوونوئیدها و توانایی آن‌ها در اتصال و مهار رادیکال‌های آزاد شده‌است. Kamkar و همکاران (2010) نشان دادند که اسانس و عصاره‌های آبی و الکلی یونه ایرانی (*Mentha longifolia*) دارای خاصیت پاداکسایشی هستند. Brahmi و همکاران (2012) گزارش کردند برای استخراج ترکیبات پاداکسایشی از نعنا سبز با حلال‌های مختلف در سطح آزمایشگاهی، مخلوطی از اتانول و آب به نسبت ۷۰:۳۰ (V/V) بهترین انتخاب در بین حلال‌های ارزیابی شده در پژوهش‌شان بود که با نتایج پژوهش حاضر که در آن حلال هیدروالکلی گیاه نعنا سبز ظرفیت پاداکسایشی بیشتری از خود نشان داد مطابقت داشت. هم‌چنین، Alara و همکاران (2018) بیان کردند که در استخراج ترکیبات فنلی از ماتریکس گیاهی استفاده از دو حلال بهتر از یک حلال است. حضور آب در فرآیند استخراج، باعث شستشوی پاداکساینده‌های آبدوست می‌شود. تحقیقات اخیر خواص پاداکسایشی و ضد میکروبی گیاه یونه را گزارش کرده‌اند (Tiexera et al., 2012).

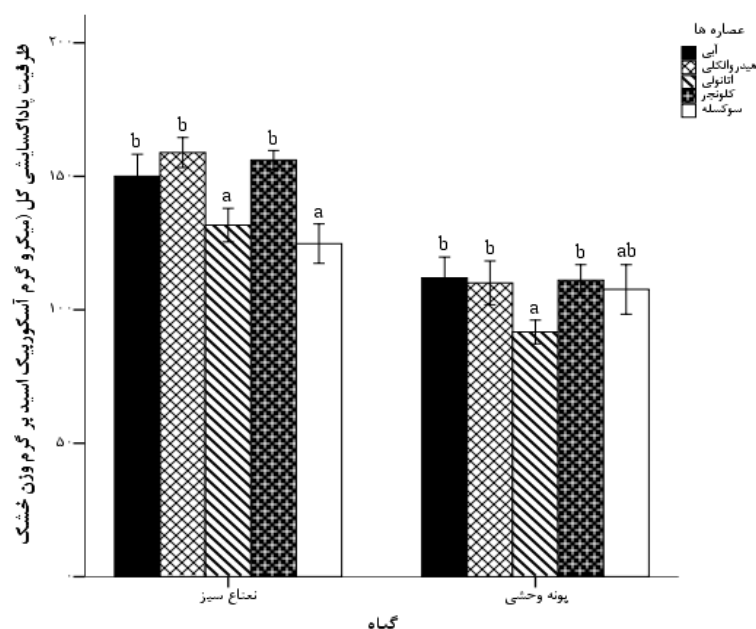


شکل ۲: مقایسه محتوای فلاوونوئید کل عصاره‌های دو گیاه نعنا و یونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.



بررسی ظرفیت پاداکسایشی نمونه‌ها با روش فسفو مولیبدات در شکل ۳ نشان داد که ظرفیت پاداکسایشی کل با روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) در گیاه نعنا سبز با مقدار  $158/90 \pm 4/90$  میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه بیشتر از ظرفیت پاداکسایشی کل با همین روش در گیاه پونه با مقدار  $110/07 \pm 7/10$  میکروگرم آسکوربیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه است. بیشترین ظرفیت پاداکسایشی کل نیز از بین هر دو گونه دارویی با روش ماسراسیون و عصاره هیدروالکلی در گیاه نعنا سبز به دست آمد. در گیاه نعنا سبز از نظر آماری بین روش عصاره‌گیری با سوکسله و روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) وجود داشت.

از نظر ظرفیت پاداکسایشی، Brahmi و همکاران (2014) نشان دادند که پونه‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه کشور الجزایر هر دو دارای فعالیت پاداکسایشی بودند، به این دلیل که همه‌ی نمونه‌ها از همان گیاه مادری مشتق شده‌اند، تفاوت بین آن‌ها اساساً به علت شرایط محیطی یا ماهیت حلال استفاده شده می‌باشد که برای پژوهش حاضر می‌توان دلیل دوم را مؤثر دانست و نیز تفاوت در ظرفیت پاداکسایشی نمونه‌های استخراج شده با روش‌های مختلف را به ماهیت روش مورد استفاده نسبت داد؛ بنابراین ظرفیت پاداکسایشی با حلال مورد استفاده برای آماده‌سازی عصاره تغییر می‌کند. پژوهش‌های پیشین طیف وسیعی از فعالیت پاداکسایشی عصاره‌های پونه یا اسانس آن را گزارش کرده‌اند؛ برای مثال عصاره اتانولی، خاصیت پاداکسایشی مشابه (Mata et al., 2007) یا بیشتر (Nickavar et al., 2008)، در مقایسه با پژوهش حاضر داشتند.

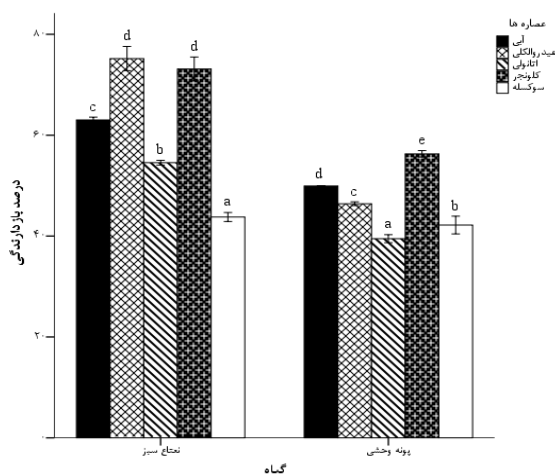


شکل ۳: مقایسه ظرفیت پاداکسایشی عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

با بررسی قدرت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH بر اساس داده‌های به‌دست آمده در شکل ۴ مشاهده شد که نمونه عصاره هیدروالکلی در گیاه نعنا سبز به میزان  $2/09 \pm 75/19$  درصد با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر عصاره‌ها بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد را به خود اختصاص داد، در حالی که در هر دو گیاه نعنا سبز و پونه کوهی، روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) و اسانس با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نداشتند.

طبق بررسی‌های صورت گرفته در این تحقیق، روش ماسراسیون (عصاره هیدروالکلی) در گیاه نعنا سبز با وجود استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کمتر، بیش‌ترین میزان خاصیت پاداکسایشی را از طریق ارزیابی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد. احتمالاً در روش ماسراسیون ترکیبات پاداکساینده دیگری به جز فنول‌ها و فلاونوئیدها استخراج شده که به افزایش خاصیت پاداکسایشی کمک کرده‌است. Biswas و همکاران (2012) هم نتایج مشابهی را گزارش و بیان کردند که فعالیت پاداکسایشی نعنا صرفاً بدلیل وجود پلی فنول‌ها نمی‌باشد. فعالیت جاروب‌کنندگی عصاره‌های نعنا بررسی شده بستگی به ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی و وجود گروه‌های هیدروکسیل فنولی دارد که قادر به دهنده‌گی الکترون یا هیدروژن‌شان هستند و بدین طریق تشکیل فرآورده نهایی پایدار دارد (Jayaprakasha *et al.*, 2008). در ارزیابی میزان جاروب رادیکال DPPH، Fatiha و همکاران (2015) نشان دادند که قوی‌ترین فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال را عصاره اتانولی نعنا سبز یا *M. spicata* داشت که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند.

Al okbi و همکاران (2015) ظرفیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد بالای اسانس پونه آسیایی (*M. longifolia*) را گزارش کردند که به نظر می‌آید اساساً با مقدار مونوترپن‌های کتونی و آلدهیدی این گونه همبسته باشد که مؤید این است که اسانس پونه آسیایی می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سالم و مکمل گندزدا و ضد عفونی‌کننده در داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۴: مقایسه درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های دو گیاه نعنا و پونه با روش‌های مختلف استخراج. حروف غیر مشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) طبق آنالیز Tukey می‌باشد.

Barchan و همکاران (2014) گزارش کردند که خاصیت پاداکسایشی عصاره آبی نعنا بوسیله ارزیابی تست DPPH بیشتر از پونه بود که با نتایج پژوهش انجام شده حاضر هم‌راستا می‌باشد؛ مشاهده کردیم که ظرفیت پاداکسایشی و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در گیاه نعنا سبز بیشتر از گیاه پونه بود. از این رو یافتن بهینه‌ترین روش استخراج، هم از نظر زمان و هم صرف انرژی، برای دستیابی به بالاترین میزان ترکیبات پاداکساینده ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق بین محتوای تام فنول و ظرفیت پاداکسایشی همبستگی منفی مشاهده شد که این همبستگی در پژوهش‌های دیگر نیز اثبات شده است و مطابق با نتایج پژوهش پیش‌رو می‌باشد (Tuberoso *et al.*, 2010; Lakić *et al.*, 2010).

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش توجه به اهمیت روش عصاره‌گیری جهت دست یافتن به خاصیت پاداکسایشی بالا را لازم می‌داند، لذا توصیه می‌شود که روش خیساندن به دلیل فعالیت پاداکسایشی و جاروب‌کنندگی بالا که هدف اصلی این پژوهش بوده است و سادگی و ارزان بودن این روش، به عنوان یک روش مناسب و آسان مورد توجه قرار گیرد. می‌توان این روش را با حلال‌های دیگر از جمله متانول، استون و یا مخلوط این‌ها را با آب استفاده کرد و یا زمان خیساندن را طولانی‌تر کرد. در کل، نعنا سبز در پژوهش حاضر پاسخ بهتری نسبت به روش‌های مختلف استخراج نشان داد؛ شاید این به دلیل خواص پاداکسایشی بالای این گونه نسبت به گونه پونه وحشی باشد.

## منابع

- Abad-García, B., Berrueta, L. A., López-Márquez, D. M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B. and Vicente, F. (2007) Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 1154(1): 87-96.
- Akroum, S., Bendjedou, D., Satta, D. and Lalaoui, K. (2009) Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American Journal of Scientific Research*. 4(2): 93-96.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., and Ukaegbu, C. I. (2018) Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 12-17.
- Al-Okbi, S. Y., Fadel, H. H. and Mohamed, D. A. (2015) Phytochemical Constituents, Antioxidant and Anticancer Activity of *Mentha citrata* and *Mentha longifolia*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6(1): 739-751.
- Areias, F. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F. and Seabra, R. M. (2001) Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chemistry*. 73(3): 307-311.
- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R. and Laglaoui, A. (2014) The effects of sol-vents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(11): 399-412.

- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J. and Zaidul, I. S. M. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*. 89(1): 67-72.
- Biswas, A. K., Chatli, M. K. and Sahoo, J. (2012) Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food chemistry*. 133(2): 467-472.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1199-1200.
- Brahmi, F., Boulkbatche-Makhlouf, L., Yalaoui-Guellal, D., Chibane, M. and Madani, K. H. (2014) Comparative study on the antioxidant effect of aqueous and ethanolic extracts of *Mentha pulegium* L. grown at two different locations. *Phyto Chemistry and Bio Sub Journal*. 8(3): 138-149.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. (2007) Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*. 55(2): 217-225.
- Damein Dorman, H.J., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. (2003) Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4563-4569.
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K. and Pierre, D. (2015) Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*. 74: 722-730.
- Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., and de la Ossa, E. M. (2012) Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*. 72: 168-175.
- Gao, L., and Mazza, G. (1996) Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science*. 61(3): 600-603.
- Ghaderi, P., Ahmadi, R., Balkanyian, F., Moridikiya, A., Mahdavi, E. and Tavakoli, P. (2014). In-vitro antibacterial activity of *Bunium persicum* and *Mentha longifolia* against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences*, May 2-3, Antalya, Turkey.
- Goli, A. H., Barzegar, M. and Sahari, M. A. (2005) Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. 92(3): 521-525.
- Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M. and Condoret, J. S. (2013) Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 141 (4): 3537-3545.
- Horwitz, W. (1984) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists. 1-771.
- Jayaprakasha, G. K., Girenavar, B. and Patil, B. S. (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*. 99(10): 4484-4494.
- Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F. and Kamalinejad, M. (2010) The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1796-1800.
- Kothari, V. (2011) *Antimicrobial and Antioxidant Properties of Plant Products*, Lambert Academic Publishing: Germany; 6.
- Kothari, V., Gupta, A., and Naraniwal, M. (2012) Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of natural remedies*. 12(2): 162-173.
- Kulusic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*. 85(4): 633-640.

- Lakić, N. S., Mimica-Dukić, N. M., Isak, J. M. and Božin, B. N. (2010) Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European Journal of Biology*. 5(3): 331-337.
- Luque de Castro, M. D. and Garcia-Ayuso, L. E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytical Chemical Acta*. 369: 1-10.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. and Araújo, M. E. M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*. 103(3): 778-786.
- Mathew, S. and Abraham, T.E. (2006) In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 44(2): 198-206.
- Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. (2008) Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3): 203-209.
- Omidbaigi, R. (2005) Production and processing of medicinal plants. Vol. 3. Astane Quds Publ. Tehran, 347 p.
- Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. 269(2): 337-341.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., and Núñez, M. J. (2005) Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 2111-2117.
- Proestos, C., and Komaitis, M. (2008) Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-food science and technology*. 41(4): 652-659.
- Riekandeh, S. M., Mazandarani, M., Ebrahimzadeh, M. A., and Zargari, M. (2016) Antioxidant activities of *Eryngium caucasicum* Inflorescence. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 20(5): 946-949.
- Sefidkon, F. (2007) Chemistry and Industrial Preparation of Essential oils. Zavesh, Iran, Tehran, 254 p.
- Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., Ahmadi, S. (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of satureja rechinger jamzad. *Journal of Food Chemistry*. 100: 1054-1058.
- Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M. and Centelles Lorente, E. (2001) Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(4): 1848-1853.
- Stahl-Biskup, E. and Saez, F. (2002) *Thyme the genus thymus*. NY, NJ: Taylor and Francis.
- Stanisavljević, D., Dordevic, S., Milenkovic, M., Lazic, M., Velickovic, D., Randelovic, N. and Zlatkovic, B. (2014). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, dried by three different techniques. *Records of Natural products*. 8(1): 61.
- Suhaj, M. (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7): 531-537.
- Sultana, B., Anwar F. and Ashraf M. (2009) Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14: 2167-2180.
- Sweetie, R.K., Chander, R. and Sharma, A. (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*. 100: 451-458.
- Taghiloo, A.H., (2010) Evaluation of spicula horsemint population are native to Iran by morphological traits and RAPD markers. Master's thesis of Horticulture sciences, Tehran University, 57 p.

- 
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O. and Nunes, M. L. (2012) European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*. 36(1): 81-87.
- Tuberoso, C. I. G., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M. P., Atzeri, A., Pirisi, F. M. and Dessì, M. A. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*. 123(4): 1242-1251.
- Unnithan, C. R., Gebreselassie, H., Sushen, U., Reddy, D. N., Woldu, A. and Muuz, M. (2013) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L of Mekole, Ethiopia. *Journal of Biological and Scientific Opinion*. 1(3): 151-153.
- Yilmaz, Y., and Toledo, R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 52(2): 255-260.

## Comparison of phenolic, flavonoid compounds and antioxidative properties of *Mentha spicata* L. and *Mentha longifolia* L. 's extracts by different extraction methods

N. Mohammadkhani<sup>1\*</sup>, J. Abbaszadeh<sup>2</sup>

Received:2017.6.9

Accepted:2019.6.8

### Abstract

Spearmint (*Mentha spicata* L.) and Horsemint (*Mentha longifolia* L.) have abundant uses in food industries and Iranian traditional medicine. The aerial parts of plants were collected and their essential oils were isolated by hydrodistillation method (Clevenger). The extractions were conducted by maceration method (aqueous, hydroalcoholic and ethanolic solvents) and soxhlet method (ethanolic solvent). Total phenolic compounds content, total flavonoid content, antioxidant capacity and percentage of free radical inhibition were measured. The results showed that total phenolic compounds and flavonoid content, total antioxidant capacity and percentage of free radical inhibition were affected by extraction method. The highest total phenolic compounds and flavonoid were obtained by soxhlet method in spearmint. The highest total antioxidant capacity belonged to hydroalcoholic extract in spearmint. The Soxhlet extraction method is recommended because of its low processing cost, simplicity of operation, lesser time consuming and more solubility comparing to other traditional methods such as soaking or percolation in order to extract phenolic compounds. The use of a two-solvent system in the soaking process with other solvents requires further researches to achieve high antioxidant properties.

**Key words:** Essential oil, Solvent, Soxhlet method, Aerial part of plants, Extract

---

1- Assistant professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

\*(Corresponding Author: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir)

2- Graduated of Medicinal and Aromatic Plants Production Engineering, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

# تاثیر کاربرد کود مرغی حاوی انروفلوکساسین بر تنفس، بیوماس میکروبی و جمعیت برخی

## باکتری‌های مفید خاک

مهسا محمدزاده<sup>۱</sup>، فروزان قاسمیان رودسری<sup>۲</sup>، اکبر حسنی<sup>۳\*</sup>، عباسعلی زمانی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۳۱

### چکیده

غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر اضافه کردن کود مرغی آلوده به آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد و ممکن است جامعه میکروبی خاک را تحت تاثیر قرار دهد. هدف این پژوهش تاثیر اضافه نمودن کود مرغی محتوی انروفلوکساسین به خاک بر جمعیت *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida* و همچنین بیوماس میکروبی و تنفس میکروارگانیسم‌های خاک است. یک آزمایش در آزمایشگاه به مدت ۴۵ روز با ۷ تیمار و سه تکرار انجام شد. این آزمایش شامل کود مرغی تازه و کمپوست شده محتوی آنتی‌بیوتیک در دو سطح غلظتی بالا (۲۶/۲ mg kg<sup>-1</sup>) و پایین (۴/۲۳ mg kg<sup>-1</sup>) و کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک بر مبنای طرح کرت‌های به‌طور کامل تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد کاربرد کود مرغی حاوی آنتی‌بیوتیک منجر به کاهش جمعیت *Azotobacter spp.* (۲۸٪)، *Pseudomonas fluorescens* (۷۳٪) و *Pseudomonas putida* (۱۴/۶٪) در خاک‌ها شد. کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه اثر منفی آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت. کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک سبب افزایش ۱۲۷ درصدی تنفس میکروبی خاک نسبت به شاهد شد اما بین سایر تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی تفاوت معنی‌دار دیده نشد. کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد (۹۵٪). وجود آنتی‌بیوتیک در کود مرغی تاثیر منفی بر غلظت کربن بیوماس میکروبی داشت. به طور کلی رهاسازی و انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر افزودن کود مرغی به مزارع حتی اگر قبل از مصرف کمپوست شده باشد، باعث کاهش رشد گروه‌های باکتریایی مفید خاک شد.

واژه‌های کلیدی: *Azotobacter*، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens*، کمپوست، کود مرغی

- 
- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم محیط زیست، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان
  - ۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه زنجان
  - ۳- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، نویسنده مسئول  
\* (نویسنده مسئول : Akbar.Hassani@znu.ac.ir)
  - ۴- استادیار گروه علوم محیط زیست، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان



## مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله داروهایی هستند که در علوم پزشکی دام و طیور جدید بیشترین تجویز را دارند. تاثیر آنتی-بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی بیشترین کاربرد را یافته است و امروزه بیش از یکصد نوع آنتی‌بیوتیک وجود دارد که برای درمان بیماری‌های خفیف تا عفونت‌های شدید مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lewis, 2013). انروفلوکساسین<sup>۱</sup> یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف باکتریوسید از نوع فلوروکینولون می‌باشد که از طریق مهار غیرقابل برگشت آنزیم ژیراز باعث ممانعت از همانندسازی اسید نوکلئیک و در نتیجه مرگ باکتری‌ها می‌گردد (Kuhlmann *et al.*, 2012).

شرکت‌های متعددی در دنیا به تولید انواع مختلف آنتی‌بیوتیک می‌پردازند که فاضلاب آنها محتوی بقایای آنتی‌بیوتیکی می‌باشد و ورود این فاضلاب به محیط زیست موجب انتشار آن می‌شود. با این وجود، اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها پس از استفاده توسط انسان‌ها و یا دام‌ها وارد محیط زیست می‌شوند (Grenni *et al.*, 2018). زمانی که یک آنتی‌بیوتیک توسط موجود زنده مصرف می‌شود، تقریباً تمام آن آنتی‌بیوتیک پس از مدتی به شکل دست نخورده و یا با تغییر جزئی در ترکیب شیمیایی از طریق ادرار و مدفوع موجود زنده دفع می‌شود (Thiele-Bruhn, 2003). آنتی‌بیوتیک‌های دفع شده از طریق انسان‌ها از طریق فاضلاب شهری وارد محیط زیست می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌های صنعت دام و طیور نیز ممکن است به طور طبیعی وارد محیط زیست شوند ولی اغلب این آنتی‌بیوتیک‌ها به دست عوامل انسانی و به شکل کودهای دامی وارد محیط زیست می‌شوند. قسمت عمده آزادسازی این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل کاربرد کودهای دامی به شکل تازه یا کمپوست شده در زمین‌های کشاورزی می‌باشد (Kim *et al.*, 2011).

غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر اضافه کردن کود دامی تازه و یا کمپوست شده و همچنین آبیاری با فاضلاب آلوده به آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد تا جایی که غلظت آن ممکن است به دو تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز برسد (Thiele-Bruhn, 2003). آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک ممکن است توسط میکروارگانیسم‌ها تغییر شکل پیدا کنند و یا اینکه برعکس، متابولیت‌های آنها به حالت اولیه برگردد (Zarfl *et al.*, 2009). به طور کلی آنتی‌بیوتیک‌هایی که از طریق کودهای دامی و طیور وارد خاک می‌شوند به‌سادگی توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه نمی‌شوند (Kim *et al.*, 2011). کاربرد کودهای دامی و طیور در کنار مزایایی که برای خاک‌های کشاورزی دارد، تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را نیز وارد خاک می‌کند (Poulsen *et al.*, 2013). این موضوع می‌تواند منجر به تغییر قابل توجهی در پویایی جامعه میکروبی خاک شود (Ding *et al.*, 2014). جمعیت بالای میکروبی در خاک‌ها، تغییر و تبدیلات ژنتیکی در آنها را زیاد نموده و ایجاد ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهد (Ding and He, 2010). علاوه بر این، وقتی خاک در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها قرار بگیرد، ساختار میکروبی خاک نیز ممکن

است تغییر کند. این موضوع به این دلیل است که آنتی‌بیوتیک‌ها معمولاً روی میکروب‌ها تاثیر انتخابی دارد و یک آنتی‌بیوتیک ممکن است روی طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها و باکتری‌ها موثر باشد و آنتی‌بیوتیکی دیگر فقط روی یک گونه میکروبی تاثیرگذار باشد. در نتیجه تاثیر انتخابی آنتی‌بیوتیک‌ها، فراوانی نسبی گونه‌های میکروبی را تغییر می‌دهند و در نتیجه تعاملات بین گونه‌های مختلف میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Ding and He, 2010). وی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین باعث کاهش جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک می‌شود. همسفر و همکاران (۲۰۰۸) ساختار میکروبی خاک کشاورزی محتوی ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفادiazین را با اسیدهای چرب گرفته شده از فسفولیپید<sup>۱</sup> (PLFA) و ژل الکتروفورز با گرادیان شیب ماده ۲ بررسی کردند و نشان دادند که کل فسفولیپید اسیدهای چرب و نسبت باکتری به قارچ کاهش یافت در حالی که اثرات آن بر *Pseudomonas* و *Betaproteobacteria* اندک بود (Hammesfahr et al., 2008). وستگراد و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند که بر اثر اضافه نمودن تایلوژین به خاک یک تغییر دائمی در ساختار جمعیتی باکتری‌ها به وجود می‌آید (Westergaard et al., 2001). دیاو و همکاران (۲۰۰۳) نیز تاکید کردند که آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آپرامایسین<sup>۳</sup> موجب جلوگیری از رشد باکتری‌ها در خاک می‌شود (Diao et al., 2004). در برخی پژوهش‌ها نیز تاثیرات بازدارنده کلروتتراسایکلین و سولفودiazین روی رشد میکروارگانیزم‌های خاک گزارش شده است (Fründ et al., 2000; Kotzerke et al., 2008). کوتزرک و همکاران (۲۰۰۴) با اضافه کردن سولفودiazین به کود خوکی مایع، تغییرات کوچکی در جامعه میکروبی نیمرخ خاک مشاهده کردند (Kotzerke et al., 2008). بر خلاف این نتایج، هاندریک و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که اضافه کردن تتراسایکلین<sup>۴</sup> تاثیری بر ساختار میکروبی خاک ندارد (Hund-Rinke et al., 2004). در مطالعه مشابهی زیلنزی و همکاران (۲۰۰۶) تاکید نمودند که تاثیرات بازدارندگی رشد آنتی‌بیوتیک‌های اضافه شده به خاک به دلیل جذب سطحی آنها توسط ذرات خاک، ناچیز می‌باشد (Zielezny et al., 2006). تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های دامی بر جمعیت‌های میکروبی به ویژگی‌های خاک (Čermák et al., 2008)، گروه‌های میکروبی (Hammesfahr et al., 2008) و مقدار آنتی‌بیوتیک وارد شده به خاک (Zielezny et al., 2006) بستگی دارد. علاوه بر این، گروه‌های مختلف باکتریایی به علت ساختار متفاوتی که در دیواره سلولی خود دارند، واکنش متفاوتی خواهند داشت؛ به عنوان مثال سولفودiazین نسبت باکتری‌های گرم مثبت به گرم منفی را تغییر نداد (Hammesfahr et al., 2008) در حالی که تتراسایکلین این نسبت را کاهش داد زیرا باکتری‌های مقاوم به تتراسایکلین بیشتر از نوع گرم منفی هستند (Hund-Rinke et al., 2004). لیو و همکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند که آنتی‌بیوتیک‌های کلروتتراسایکلین، تتراسایکلین، تایلوژین، سولفامتوکسازول و تری‌متوپریم، فعالیت‌های میکروبی و آنزیم‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

<sup>1</sup> - phospholipid-derived fatty acids

<sup>2</sup> -denaturing gradient gel electrophoresis

<sup>3</sup> - apramycin

<sup>4</sup> - tetracycline

آنها در مطالعات خود متوجه شدند که این آنتی بیوتیک‌ها اثر بازدارندگی روی تنفس خاک و فعالیت آنزیم فسفاتاز دارند ( Liu *et al.*, 2009).

*Azotobacter* باکتری گرم منفی، هوازی، شیمیوارگانوتروف و قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی به صورت غیرهمزیست می‌باشد. این باکتری می‌تواند انواع اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و هورمون‌های محرک رشد گیاه را سنتز کند. *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* نیز دو باکتری گرم منفی از شاخه proteobacteria و جنس *Pseudomonas* می‌باشند که در خاک با اعمالی مانند تولید برخی هورمون‌های محرک رشد، افزایش انحلال عناصر غذایی و مقابله با برخی بیماری‌ها به رشد گیاهان در خاک کمک می‌کنند (Hayat *et al.*, 2010). با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که اطلاعات و دانش موجود همچنان اندک می‌باشد و تاثیر آنتی بیوتیک‌ها بر گروه‌های مختلف میکروبی خاک هنوز نیاز به بررسی بیشتری دارد. تاثیر انروفلوکسازین بر روی جامعه میکروبی خاک مورد بررسی قرار نگرفته است و در مورد باکتری‌های مفید خاک مانند *Azotobacter* و *Pseudomonas* هنوز مطالعات کافی انجام نشده است. این باکتری‌ها اعمال حیاتی مهمی همچون تثبیت زیتس نیتروژن اتمسفری و ترشح محرک‌های رشد برای گیاهان انجام می‌دهند و افزایش فعالیت این سه گروه باکتری همراه با سایر باکتری‌های مفید، در حقیقت نشان‌دهنده افزایش کیفیت خاک می‌باشد که با ورود آنتی بیوتیک‌ها به خاک ممکن است کیفیت خاک نیز کاهش یابد و به نظر می‌رسد این موضوع به بررسی بیشتری نیاز دارد. هدف اصلی از این پژوهش تاثیر اضافه نمودن کود مرغی حاوی آنتی بیوتیک انروفلوکسازین به خاک بر جمعیت برخی باکتری‌های مفید خاک مانند *Azotobacter*، *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* می‌باشد. فرضیه موجود این بود که حضور انروفلوکسازین در کود مرغی، سه گروه باکتری مورد مطالعه را تحت تاثیر قرار خواهد داد و جمعیت آنها را کاهش می‌دهد اما با کمپوست نمودن کود مرغی قبل از کاربرد آنها در مزرعه این اتفاق نخواهد افتاد.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه زنجان انجام شد. ابتدا سه نمونه کود مرغی گوشتی تازه از مرغداری پژوهشی واقع در مزرعه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان تهیه شد. در بخشی از مرغ‌ها سطح پایینی (1 mg kg<sup>-1</sup>) از آنتی بیوتیک انروفلوکسازین در برنامه غذایی طیور استفاده شده بود. در بخش دیگر سطح بالایی (50 mg kg<sup>-1</sup>) از آنتی بیوتیک انروفلوکسازین استفاده شده و در بخش آخر نیز هیچگونه آنتی بیوتیکی استفاده نشده بود. انروفلوکسازین از روز بیست و پنجم تولید به مدت ۵ روز همراه با آب آشامیدنی به مرغ‌های گوشتی داده شد و در انتهای روز پنجم فضولات ۱۵ مرغ که به طور تصادفی از بین سایر مرغ‌ها انتخاب شده بود جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌برداری، بخشی از کودهای تهیه شده در آزمایشگاه به روش سلنا و سولنردانس (۲۰۱۶) به صورت هوازی و به مدت ۷۵ روز کمپوست شدند. غلظت آنتی بیوتیک انروفلوکسازین در

نمونه‌های تازه و کمپوست شده به روش سلنا و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. در این روش ۴۴ میلی‌لیتر از محلول بافر (شامل ۱۵ گرم  $K_2HPO_4$ ، ۱۵۰ میلی‌گرم EDTA، ۴ میلی‌لیتر اسید فسفریک غلیظ، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل) به ۲۵ گرم نمونه اضافه شد و به مدت ۹۰ ثانیه روی دستگاه همزن قرار گرفت. پس از آن نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد و دوباره روی دستگاه همزن به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفت. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه با ۳۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره صاف رویی جدا شد. این عمل ۳ مرتبه دیگر نیز تکرار شد و همه عصاره‌ها یکجا جمع و از کاغذ صافی عبور داده شدند تا برای آنالیز آماده شوند (Slana *et al.*, 2014). کود مرغی تهیه شده محتوی ۱۹/۷ درصد کربن آلی، ۶۲/۶ درصد رطوبت اولیه، ۱/۴۷ درصد نیتروژن کل بود و pH آن نیز ۸/۱۱ اندازه‌گیری شد. غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های کود تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح بالای آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۲۶/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت آن در نمونه‌های تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح پایین آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۴/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

در مرحله بعد یک طرح آزمایشی با ۷ تیمار و سه تکرار T1- خاک بدون کاربرد کود مرغی T2- کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کاربرد کود مرغی تازه محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرغی تازه محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده T7- کاربرد کود مرغی محتوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده در خاک بر مبنای طرح کرت‌های به‌طور کامل تصادفی در آزمایشگاه انجام شد.

بدین منظور مقداری نمونه خاک بکر و دست نخورده از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری از محوطه دانشگاه زنجان تهیه شد. نمونه خاک پس از کوبیدن و خشک شدن در هوای آزاد از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس یک کیلوگرم خاک به ظرف‌های مخصوص پلاستیکی با حجم یک و نیم لیتر (قوطی دربدار) ریخته و به هر ظرف با توجه به نوع تیمار، ۱۰ گرم کود مرغی خشک شده در هوای آزاد اضافه و به خوبی مخلوط شد. رطوبت خاک در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به روش وزنی حفظ شده و خاک‌ها به مدت ۴۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در فواصل زمانی هر پنج روز یک‌بار جمعیت *Azotobacter*، *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* به عنوان باکتری‌های مفید خاک در آنها اندازه‌گیری شد. خاک مورد استفاده یک نمونه خاک بکر و دست نخورده بود که هیچگونه آنتی‌بیوتیکی از منابع خارجی دریافت نکرده بود و عملیات کشاورزی نیز روی آن انجام نشده بود. خاک آهکی (۱۵/۴ درصد کربنات کلسیم معادل) و مقدار pH آن ۷/۳۷، مقدار قابلیت هدایت الکتریکی عصاره گل اشباع در آن ۱/۷ دسی‌زیمنس بر متر و مقدار کربن آلی نیز ۰/۲۳ درصد بود. بافت خاک نیز لوم بود.

شمارش باکتری‌های *Azotobacter*

تعداد جمعیت باکتری‌های *Azotobacter* در نمونه‌ها با استفاده از شمارش CFU انجام شد. برای شمارش کل باکتری‌ها ابتدا یک نمونه خاک تازه از تمام نیم‌رخ خاک ۱ هر طرف آزمایشی به وسیله اوگر ۲ مخصوص تهیه شد. سپس ۱۰ گرم از نمونه خاک تازه تهیه شده به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد (۱-۱۰). سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. این محلول به مقدار ۶-۱۰ مرتبه در آب مقطر استریل رقیق شد و از هر رقت ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت *Azotobacter* مانیتول آگار<sup>۳</sup> (DSMZ medium 320) محتوی ۵ گرم گلوکز، ۵ گرم مانیتول، ۰/۱ گرم کلسیم کلراید (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)، ۰/۱ گرم منیزیم سولفات (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)، ۰/۹ گرم دی پتاسیم فسفات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)، ۰/۱ گرم مونوپتاسیم فسفات (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، ۵ گرم کلسیم کربنات (CaCO<sub>3</sub>)، ۰/۱۱ گرم آهن سولفات (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)، ۵ میلی‌گرم سدیم مولیبدات (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)، ۱۵ گرم آگار و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با مقدار pH برابر با ۷/۳ کشت داده شد. کلسیم کربنات در این محیط به عنوان بافر عمل می‌کند و در ته پلیت ته نشین شده و لایه سفید رنگ ماتی ایجاد می‌کند. با رشد باکتری، اسید تولید می‌شود و با کلسیم کربنات واکنش می‌دهد و آن را حل می‌کند و یک هاله شفاف در اطراف و زیر پلیت تشکیل می‌شود که معرف کلونی *Azotobacter* می‌باشد. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاتین به محیط کشت باکتری اضافه شد. پس از یک هفته انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس شمارش کلونی‌ها انجام شد (Davis et al., 2005). پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

شمارش باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens*

تعداد جمعیت باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* در نمونه‌ها با استفاده از شمارش CFU و در محیط کشت مخصوص آن انجام شد. برای شمارش این باکتری‌ها از رقت‌های تهیه شده قبلی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت کینگز بی<sup>۴</sup> (King et al, 1954) محتوی ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲۰ گرم پروتئوز پپتون، ۱/۵ گرم دی‌پتاسیم فسفات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)، ۱/۵ گرم منیزیم سولفات (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۵ گرم آگار در حجم نهایی یک لیتر محیط کشت و pH برابر ۷ استفاده شد. یک گرم دزوکسیکولات نیز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت استفاده گردید. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاتین<sup>۵</sup> به محیط کشت اضافه شد. پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۸

<sup>1</sup> - soil profile

<sup>2</sup> - auger

<sup>3</sup> - *Azotobacter* mannitol agar

<sup>4</sup> - Kings B

<sup>5</sup> - nistatin

درجه سلسیوس در انکوباتور، پلیت‌ها با استفاده از لامپ فرابنفش از نظر وجود کلونی‌هایی با خاصیت پرتو افشان (فلوروسنس) بررسی شدند و پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

### شمارش باکتری‌های *Pseudomonas putida*

شمارش تعداد باکتری‌های *Pseudomonas putida* در نمونه‌ها با استفاده از کشت پلیت انجام شد. برای شمارش این باکتری‌ها از رقت‌های دهدهی تهیه شده به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در ۵ تکرار روی محیط کشت اختصاصی *Pseudomonas putida* محتوی ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، یک گرم سدیم هیپورات ( $C_6H_5CONHCH_2COONa \cdot xH_2O$ )، یک گرم مونوپتاسیم فسفات ( $KH_2PO_4$ )، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )، ۰/۲ گرم پتاسیم کلرید، ۵ گرم سدیم نترات ( $NaNO_3$ )، یک گرم دزوکسیکولات و ۱۵ گرم آگار در حجم نهایی یک لیتر محیط کشت با pH برابر با ۷/۲ استفاده شد. در پایان محیط کشت در اتوکلاو استریل شد. این محیط کشت توسط کاتو و ایتو (۱۹۸۳) برای جداسازی *Pseudomonas putida* از سایر *Pseudomonas*‌ها ارائه شد (Kato and Itoh, 1983). در این محیط کشت، سدیم هیپورات به عنوان تنها منبع کربنی به کار می‌رود که فقط *Pseudomonas putida* قادر به استفاده از آن می‌باشد. از دزوکسیکولات نیز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت استفاده شد. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیستاتین به محیط کشت اضافه گردید. پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس پلیت‌های با تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ در محاسبات مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها بر حسب تعداد واحد کلونی تشکیل دهنده (CFU) گزارش شد.

### اندازه‌گیری بیوماس میکروبی

اندازه‌گیری کربن بیوماس میکروبی نیز به روش تدخین-استخراج<sup>۱</sup> (Vance et al., 1987) در نمونه‌های تهیه شده برای شمارش میکروبی در روزهای ۵، ۱۵، ۲۵ و ۴۵ انجام شد. در این روش نمونه‌های خاک ۱۰۰ گرمی تهیه شده از کل عمق ظرف آزمایشی به مدت ۲۴ ساعت با کلروفورم تدخین و با محلول سولفات پتاسیم استخراج شد. هم‌زمان یک نمونه خاک تدخین نشده نیز با سولفات پتاسیم عصاره‌گیری شد. کربن آلی در عصاره‌های حاصله به روش احتراق تر با دی کرومات پتاسیم تعیین و با استفاده از رابطه ۱ به کربن بیوماس میکروبی تبدیل شد.

$$\text{MBC (mg/kg)} = S \text{ (mg/kg)} - C \text{ (mg/kg)} / 0.35 \quad \text{رابطه ۱}$$

<sup>۱</sup> - Fumigation extraction

در این رابطه<sup>۱</sup> MBC مقدار کربن بیوماس میکروبی، S مقدار کربن آلی در خاک تدخین شده و C مقدار کربن آلی در خاک تدخین نشده، می باشد.

## اندازه گیری تنفس میکروبی خاک

تنفس میکروبی خاک در تیمارهای مورد مطالعه و در زمان های مشابه در ظرف های جداگانه اندازه گیری شد. برای اندازه گیری تنفس میکروبی، گاز کربن دی اکسید متصاعد شده از خاک ناشی از تنفس میکروبی به روش حبس در محلول سدیم هیدروکسید (Anderson and Domsch, 1978) و تیتراسیون با محلول هیدروکلریک اسید اندازه گیری شد. در این روش ۲۵ گرم خاک مرطوب و تازه به یک بشر پلاستیکی منتقل و بشر محتوی خاک داخل یک ظرف پلاستیکی در بدار ۱ لیتری گذاشته شد. درون بشر دیگری هم ۲۰ میلی لیتر از محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار ریخته شد و آن ظرف محتوی هیدروکسید سدیم نیز به ظرف پلاستیکی در کنار خاک منتقل شد. سه ظرف نیز فقط محتوی محلول هیدروکسید سدیم و بدون خاک به عنوان شاهد برای حبس دی اکسید کربن موجود در هوای درون ظرف در نظر گرفته شد. درب ظرف به طور کامل مسدود شد تا تبادل هوای بیرون و درون در آن انجام نشود. سپس برای مدت معین دردمای مناسب (۲۸ درجه سلسیوس) قرار داده شد. در این مدت گاز دی اکسید کربن تولید شده ناشی از تنفس میکروارگانیسم های خاک درون محلول هیدروکسید سدیم حبس شده و غلظت هیدروکسید سدیم در محلول کاهش می یابد. در پایان محتویات محلول هیدروکسید سدیم به وسیله اسید هیدروکلریک (HCl) یک مولار تیترا شد. قبل از تیتراسیون از کلرید باریم به منظور رسوب کربنات باریم استفاده شد. پس از تیتراسیون، ظرف محتوی هیدروکسید سدیم دوبار با یک محلول جدید پر شد و داخل قوطی قرار گرفت تا آزمایش برای روزهای بعد ادامه یابد. تیتراسیون به طور میانگین هر پنج روز یکبار و به مدت ۴۵ روز انجام شد. مقدار تنفس بر حسب میلی گرم گاز دی اکسید کربن بر هر گرم خاک در طول دوره محاسبه و گزارش شد.

## تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه واریانس همه داده ها پس از نرمال سازی در هر سه آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1.3 portable انجام شد و جهت مقایسه میانگین ها آزمون LSD در سطح پنج درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

<sup>۱</sup> - Microbial Boimass Carbon

## نتایج

### غلظت آنروفلوکساسین در کود مرغی

غلظت آنروفلوکساسین در نمونه‌های کود تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح بالای آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۲۶/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت آن در نمونه‌های تهیه شده از مرغ‌هایی که سطح پایین آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده بودند ۴/۲۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. پس از کمپوست نمودن، غلظت آنروفلوکساسین در کود مرغی به ترتیب به ۱۶/۸۵ و ۲/۲۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید که نشان می‌دهد فرایند کمپوست نمودن باعث کاهش غلظت آنروفلوکساسین در کود مرغی می‌شود.

### تاثیر بر جمعیت *Azotobacter* های خاک

تاثیر کاربرد کودهای مرغی بر جمعیت *Azotobacter* های خاک در جدول ۱ دیده می‌شود. جمعیت *Azotobacter* ها در خاک شاهد بدون کاربرد کود مرغی بین ۲۳۴۵ تا ۲۵۶۸ سلول در هر گرم خاک متغیر بود و در طول دوره جمعیت آن تغییر معنی‌داری نداشت. در تیمار دوم با کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک جمعیت *Azotobacter* افزایش یافت و در روز سی‌ام به حداکثر مقدار خود، ۴۱۷۶ سلول در هر گرم خاک رسید که ۷۴ درصد نسبت به روز اول افزایش داشت. در تیمار سوم، کود مرغی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا به خاک اضافه و دیده شد که جمعیت *Azotobacter* از روز دهم کاهش یافت و در روز پانزدهم به کمترین مقدار خود، ۱۷۷۶ سلول در هر گرم خاک رسید که نسبت به روز اول ۲۸ درصد کاهش نشان داد. با گذشت زمان جمعیت دوباره رو به افزایش گذاشت و در پایان نیز جمعیت با روز اول اختلاف معنی‌دار نداشت. در تیمار چهارم که در آن کود مرغی تازه با غلظت پایین آنتی‌بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت *Azotobacter* خاک کاهش یافت که شدت آن کمتر از تیمار سوم بود (۱۳ درصد کاهش نسبت به روز اول) و البته در پایان دوره جمعیت *Azotobacter* بیشتر از مقدار آن در روز اول بود. با توجه با این نتایج مشخص می‌شود که کاربرد کودهای تازه محتوی آنتی‌بیوتیک منجر به کاهش جمعیت *Azotobacter* در خاک می‌شود اگرچه غلظت آنتی‌بیوتیک نیز اهمیت دارد. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده منجر به افزایش جمعیت *Azotobacter* شد ولی تاثیر آن کمتر از کود تازه بود. این نتیجه نشان داد که کود مرغی تازه نسبت به کود مرغی کمپوست شده تاثیر بیشتری در افزایش جمعیت این گروه باکتریایی داشت. در تیمار ششم و هفتم با کاربرد کود مرغی کمپوست شده محتوی آنتی‌بیوتیک دیده شد که جمعیت *Azotobacter* در میانه دوره کاهش یافت (به ترتیب ۲۱/۸ و ۷/۴ درصد کاهش) و در پایان نیز جمعیت آن در تیمار ششم کمتر از روز اول و تیمار هفتم بیشتر از روز اول بود.



جدول ۱: جمعیت *azotobacter* در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی بر حسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	A2345±14a	D2398±12a	A2467±16a	B2388±16a	C2257±14ab	A2467±9a	C2425±17a
۵	A2476±12a	D2489±21a	A2453±22a	B2467±17a	C2311±25a	A2410±18a	C2478±21a
۱۰	A2568±22b	C2783±21a	A2346±24c	A2580±23b	B2583±23b	A2525±25bc	AB2798±23a
۱۵	A2546±23b	C2869±18a	C1776±27d	C2067±21cd	B2640±25b	B1927±18d	CD2244±23c
۲۰	A2448±18b	C2799±27a	BC1827±21c	BC2193±25c	B2580±27ab	B1960±24cd	C2385±18b
۲۵	A2389±16c	B3478±22a	B1967±12d	B2288±15cd	B2767±14b	B2117±15cd	C2480±19c
۳۰	A2431±23d	A4176±21a	AB2278±23d	A2505±25cd	A3210±19b	A2443±22d	B2700±22c
۳۵	A2421±26e	A4127±21a	B2238±18e	A2633±16cd	A3227±24b	A2560±25d	A2867±26c
۴۰	A2489±13d	A4073±22a	A2289±24d	A2753±25cd	A3243±26b	A2548±21d	A2972±27bc
۴۵	A2421±25d	A3945±23a	A2330±20de	A2678±21cd	A3301±24b	A2425±26d	A2904±28c

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کمیوست شده T6- کود مرغی آنتی بیوتیک غلظت بالا و کمیوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی بیوتیک غلظت پایین و کمیوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

### تاثیر بر جمعیت *Pseudomonas fluorescens*

تاثیر کاربرد کودهای مرغی بر جمعیت *Pseudomonas fluorescens* خاک در جدول ۲ دیده می شود. جمعیت *Pseudomonas fluorescens* در خاک شاهد در طول دوره آزمایش بین ۴۴۵۰ تا ۴۸۶۰ سلول در هر گرم خاک متغیر بود که البته با یکدیگر تفاوت معنی دار نداشتند. در تیمار دوم با کاربرد کود مرغی تازه بدون آنتی بیوتیک جمعیت *Pseudomonas fluorescens* افزایش یافت و در روز پانزدهم به حداکثر مقدار خود، ۷۸۳۰ سلول در هر گرم خاک رسید که نسبت به روز اول ۷۳ درصد افزایش نشان داد. در تیمار سوم، کود مرغی تازه حاوی آنتی بیوتیک با غلظت بالا جمعیت این باکتری را از روز پانزدهم به طور قابل ملاحظه ای کاهش داد و تقریباً به نصف مقدار آن (۵۱ درصد) در روز اول رساند و در پایان نیز جمعیت همچنان ۲۳ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار چهارم که در آن کود مرغی تازه با غلظت پایین آنتی بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت باکتری کاهش یافت ولی شدت آن کمتر از تیمار سوم بود (۳۹ درصد کاهش) و کمترین تعداد در روز بیستم دیده شد و البته در پایان دوره نیز جمعیت *Pseudomonas fluorescens* ۵/۶ درصد کمتر از مقدار آن در روز اول بود اما با آن تفاوت معنی دار نداشت. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کمیوست شده منجر به افزایش جمعیت *Pseudomonas fluorescens* شد (۵۸ درصد نسبت به روز اول) ولی تاثیر آن کمتر از کود تازه بود. این نتایج نشان داد که کود مرغی تازه نسبت به کود مرغی کمیوست شده تاثیر بیشتری در افزایش جمعیت *Pseudomonas fluorescens* داشت. در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی محتوی آنتی بیوتیک غلظت بالا و کمیوست شده به روش هوازی دیده شد که جمعیت *Pseudomonas fluorescens* از روز دهم شروع به

کاهش کرد و در روز سی‌ام به حداقل مقدار خود رسید (۲۹/۸ درصد کاهش نسبت به روز اول) و در پایان نیز جمعیت آن ۲۴/۲ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار هفتم جمعیت این باکتری تا روز سی‌ام تفاوت معنی دار نداشت اما پس از آن به طور معنی دار افزایش یافت کاهش یافت در پایان جمعیت آن بیشتر از روز اول بود (۲۶ درصد).

جدول ۲: جمعیت *Pseudomonas fluorescens* در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرگی بر حسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	۴۴۵۰±۳۳۳a	۴۵۱۰±۴۳۳a	۴۳۸۹±۴۶۶a	۴۴۳۸±۳۶۶a	۴۲۸۰±۴۴۶a	۴۳۲۵±۳۳۳a	۴۴۷۸±۴۷۷a
۵	۴۵۲۱±۴۲۲a	۴۷۲۸±۴۱۱a	۴۳۶۷±۲۲۲a	۴۳۷۸±۴۷۷a	۴۴۳۶±۴۵۵a	۴۱۴۵±۳۸ab	۴۳۷۳±۳۸۸a
۱۰	۴۸۶۰±۴۶۶a	۴۸۲۱±۴۱۱a	۴۲۷۸±۳۹۹bc	۴۲۰۰±۴۳bc	۳۹۸۰±۳۳c	۳۷۸۰±۳۵c	۴۴۸۰±۳۹b
۱۵	۴۸۲۲±۴۴b	۵۴۲۰±۴۸a	۵۱۴۶±۴۹e	۳۸۷۰±۳۱d	۴۴۷۰±۳۴bc	۳۵۶۸±۳۸d	۴۲۵۷±۴۳c
۲۰	۴۶۵۰±۴۷c	۷۳۵۰±۴۷a	۲۲۶۷±۲۲ef	۲۶۷۵±۲۷e	۵۴۷۸±۲۶b	۳۴۷۸±۳۴d	۴۵۲۰±۴۸c
۲۵	۴۵۶۷±۴۱c	۷۶۵±۴۲a	۲۳۵۰±۲۱e	۲۹۸۶±۲۵d	۶۳۹۲±۵۱b	۳۱۷۸±۳۵d	۴۷۵۰±۴۹c
۳۰	۴۶۱۰±۳۸d	۷۸۲۰±۴۱a	۲۶۷۸±۲۳f	۳۱۰۰±۲۹e	۶۴۸۹±۴۷b	۳۰۳۵±۳۲e	۵۱۰۰±۴۲c
۳۵	۴۵۸۰±۴۳d	۷۷۸۵±۴۱a	۲۸۹۰±۲۸f	۳۲۴۱۰±۳۶e	۶۴۵۸±۴۳b	۳۳۳۰±۴۵e	۵۴۲۰±۴۶c
۴۰	۴۴۶۷±۴۲d	۷۶۵۱±۴۲a	۳۱۲۷±۳۴de	۳۶۸۰±۳۵d	۶۳۶۹±۴۸b	۳۳۴۶±۳۷d	۵۶۵۰±۴۷c
۴۵	۴۳۸۲±۳۹d	۷۲۸۳±۴۳a	۳۳۶۰±۲۸e	۴۱۸۷±۴۱d	۶۷۸۹±۵۰b	۳۲۷۸±۳۶e	۵۶۷۵±۳۶c

T1- خاک بدون کود مرگی T2- کود مرگی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرگی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرگی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرگی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرگی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرگی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

### تاثیر بر جمعیت *Pseudomonas putida*

تاثیر کاربرد کودهای مرگی بر جمعیت *Pseudomonas putida* خاک در جدول ۳ دیده می‌شود. جمعیت *Pseudomonas putida* در خاک شاهد بدون کاربرد کود مرگی بین ۳۱۶۷ تا ۳۶۳۳ سلول در هر گرم خاک متغیر بود. جمعیت باکتری در روز آخر به طور معنی داری کمتر از سایر روزها بود. کاربرد کود مرگی تازه بدون آنتی‌بیوتیک در تیمار دوم منجر به افزایش معنی دار جمعیت *Pseudomonas putida* شد و در روز بیستم به حداکثر مقدار خود، ۵۱۲۰ سلول در هر گرم خاک رسید که ۵۳ درصد نسبت به روز اول افزایش نشان داد. کاربرد کود مرگی تازه حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا، جمعیت باکتری را از روز دهم کاهش داد و کمترین جمعیت در روز ۲۵ دیده شد که نسبت به روز اول ۱۴/۶ درصد کاهش داشت. در پایان نیز جمعیت همچنان ۱۱/۵ درصد کمتر از روز اول بود. در تیمار چهارم که در آن کود مرگی تازه با غلظت پایین آنتی‌بیوتیک استفاده شده بود نیز جمعیت *Pseudomonas putida* در روز پانزدهم در خاک به کمترین مقدار رسید و ۱۴/۴ درصد کمتر از روز اول بود اما از

روز ۲۵ به بعد رو به افزایش گذاشت و در پایان به ۳۷۲۵ سلول در گرم خاک (۱۱/۳ درصد بیشتر از روز اول) رسید. در تیمار پنجم، کاربرد کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کمپوست شده منجر به افزایش جمعیت باکتری شد و در پایان دوره جمعیت آن به ۴۷۱۳ سلول در هر گرم خاک رسید که مشابه کاربرد کود مرغی تازه بود. این نتایج نشان داد که تاثیر کود مرغی تازه و کود مرغی کمپوست شده بر جمعیت *Pseudomonas putida* تقریباً یکسان بود. در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی محتوی آنتی بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده به روش هوازی دیده شد که جمعیت *Pseudomonas putida* ابتدا اندکی افزایش یافت ولی چند روز بعد در روز پانزدهم دوباره کاهش یافت (هفت درصد) و این جمعیت تا پایان تقریباً به همین شکل باقی ماند. در تیمار هفتم کاربرد کود مرغی محتوی آنتی بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده به روش هوازی تاثیر معنی داری بر جمعیت *Pseudomonas putida* نداشت.

جدول ۳: جمعیت *Pseudomonas putida* در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی بر حسب تعداد سلول در هر گرم خاک.

روز	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
۱	A <sup>۳۳۳۰±۳۶a</sup> B	D <sup>۳۳۴۵±۲۳a</sup>	A <sup>۳۲۵۰±۳۶a</sup>	AB <sup>۳۳۴۷±۲۹a</sup>	C <sup>۳۲۷۴±۳۴a</sup>	B <sup>۳۳۴۸±۲۴a</sup>	A <sup>۳۴۶۸±۳۷a</sup>
۵	A <sup>۳۳۸۶±۳۳a</sup>	D <sup>۳۴۷۶±۲۱a</sup>	A <sup>۳۲۳۶±۳۲a</sup>	B <sup>۳۲۸۴±۲۶a</sup>	C <sup>۳۲۲۸±۲۵a</sup>	AB <sup>۳۴۷۸±۳۱a</sup>	A <sup>۳۳۴۰±۲۸a</sup>
۱۰	A <sup>۳۶۳۳±۴۱a</sup>	D <sup>۳۵۶۸±۳۱a</sup>	A <sup>۳۲۵۸±۲۹bc</sup>	B <sup>۳۱۰۸±۲۹bc</sup>	C <sup>۲۹۴۵±۲۳c</sup>	A <sup>۳۷۶۰±۳۳a</sup>	A <sup>۳۳۱۵±۳۱b</sup>
۱۵	A <sup>۳۶۱۵±۴۲b</sup>	C <sup>۴۱۲۷±۲۸a</sup>	B <sup>۲۸۷۹±۲۹e</sup>	C <sup>۲۸۶۳±۲۱e</sup>	BC <sup>۳۳۰۷±۲۴c</sup>	B <sup>۳۲۲۶±۳۱c</sup>	A <sup>۳۲۷۰±۳۳c</sup>
۲۰	A <sup>۳۴۸۹±۴۱bc</sup> A	A <sup>۵۱۲۰±۲۷a</sup>	B <sup>۲۸۸۰±۲۷d</sup>	B <sup>۳۱۶۵±۳۷c</sup>	B <sup>۳۷۸۰±۲۶b</sup>	B <sup>۳۲۲۵±۳۵c</sup>	A <sup>۳۴۶۹±۲۸bc</sup>
۲۵	A <sup>۳۴۹۷±۲۷c</sup>	A <sup>۵۰۸۰±۳۲a</sup>	B <sup>۲۷۷۵±۲۳e</sup>	B <sup>۳۲۲۰±۳۵d</sup>	B <sup>۳۸۸۹±۳۱b</sup>	BC <sup>۳۱۰۸±۳۰d</sup>	A <sup>۳۵۱۵±۲۹c</sup>
۳۰	A <sup>۳۵۰۵±۳۵c</sup>	A <sup>۵۱۱۰±۲۱a</sup>	B <sup>۲۹۰۰±۲۴e</sup>	B <sup>۳۲۷۰±۲۸c</sup>	A <sup>۴۷۶۹±۲۷b</sup>	B <sup>۳۲۴۸±۳۲c</sup>	A <sup>۳۲۶۸±۳۲cd</sup>
۳۵	A <sup>۳۴۷۸±۳۳b</sup>	AB <sup>۴۸۵۸±۲۱a</sup>	B <sup>۲۸۶۰±۲۵d</sup>	A <sup>۳۵۶۷±۲۱b</sup>	A <sup>۴۷۷۸±۳۳a</sup>	B <sup>۳۲۰۹±۳۵c</sup>	A <sup>۳۳۲۵±۳۶bc</sup>
۴۰	A <sup>۳۲۷۸±۳۲c</sup> B	B <sup>۴۷۶۸±۳۲a</sup>	B <sup>۲۹۷۴±۳۱d</sup>	A <sup>۳۶۷۰±۲۷b</sup>	A <sup>۴۷۶۵±۳۸a</sup>	AB <sup>۳۴۷۶±۳۱b</sup>	A <sup>۳۲۵۰±۲۷c</sup>
۴۵	B <sup>۳۱۶۷±۳۰c</sup>	B <sup>۴۷۶۹±۳۳a</sup>	B <sup>۲۸۷۴±۲۱d</sup>	A <sup>۳۷۲۵±۳۱b</sup>	A <sup>۴۷۱۳±۳۰a</sup>	BC <sup>۳۲۷۰±۳۰c</sup>	A <sup>۳۲۵۵±۲۶c</sup>

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

### تاثیر بر تنفس خاک

نتایج کاربرد کود مرغی در تیمارهای مختلف بر مقدار تنفس جمعی خاک مورد آنالیز در طی دوره ۴۵ روزه در جدول ۴ دیده می شود. به طور کلی مقدار تنفس جمعی روندی رو به افزایش داشت و بیشترین مقدار تنفس جمعی در طول دوره به ویژه ابتدا و انتهای دوره به تیمار سوم با کاربرد کود مرغی تازه حاوی آنتی بیوتیک غلظت بالا تعلق داشت. مقدار تنفس کل دوره

۴۵ روزه نیز در جدول ۴ دیده می‌شود. بیشترین مقدار تنفس در تیمار ششم با کاربرد کود مرغی حاوی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده با ۱۲۷ درصد افزایش نسبت به شاهد دیده شد. مقدار کل تنفس در این تیمار با تیمارهای سوم، چهارم و هفتم تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین مقدار تنفس نیز در تیمار اول و بدون کاربرد کود مرغی دیده شد. مقدار کل تنفس در همه تیمارهای کودی بیشتر از تیمار اول بود.

جدول ۴: مقدار تنفس تجمعی در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی بر حسب میلی‌گرم گاز CO<sub>2</sub> در هر گرم خاک.

تیمار	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۵	۴۵
T1	۰/۷±۰/۱۱d	۶/۰±۰/۳۱d	۹/۹±۰/۸۸c	۱۱/۱±۱/۱b	۱۵/۱±۱/۱b	۱۹/۷±۱/۱c	۲۱/۷±۱/۱c
T2	۷/۶±۰/۳۳bc	۱۵/۵±۰/۶۳b	۲۱/۴±۱/۶a	۲۷/۳±۱/۴a	۳۳/۸±۱/۹a	۳۶/۶±۱/۹b	۴۳/۴±۲/۳b
T3	۱۰/۲±۰/۴۱a	۱۸/۰±۱/۱a	۲۲/۶±۱/۲a	۲۶/۳±۱/۳a	۳۴/۳±۱/۶a	۴۲/۷±۱/۶a	۴۷/۱±۲/۴ab
T4	۸/۱±۰/۳۴b	۱۶/۷±۰/۷۸b	۲۱/۳±۱/۵a	۲۷/۵±۱/۷a	۳۳/۱±۲/۱a	۳۹/۰±۲/۱ab	۴۴/۵±۲/۳b
T5	۵/۶±۰/۲۶c	۱۰/۱±۰/۵۶c	۱۶/۷±۱/۵b	۲۶/۳±۱/۱a	۳۳/۵±۲/۲a	۳۶/۴±۲/۲b	۴۷/۲±۲/۳ab
T6	۵/۷±۰/۲۷c	۱۰/۵±۰/۶۷c	۱۷/۲±۱/۶b	۲۶/۱±۱/۳a	۳۲/۶±۱/۷a	۳۶/۵±۱/۷b	۴۹/۳±۲/۴a
T7	۵/۶±۰/۳۰c	۱۰/۵±۰/۶۰c	۱۷/۳±۱/۶b	۲۷/۱±۱/۴a	۳۳/۴±۲/۴a	۳۵/۹±۲/۴b	۴۸/۹±۲/۵a

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی‌بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرغی تازه آنتی‌بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده T7- کود مرغی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده. حروف یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

### تاثیر بر بیوماس میکروبی

نتایج کاربرد کود مرغی در تیمارهای مختلف بر مقدار کربن بیوماس میکروبی خاک مورد آنالیز در طی دوره ۴۵ روزه در جدول ۵ دیده می‌شود. در روز پنجم بیشترین بیوماس میکروبی به تیمار دوم و چهارم با کاربرد کود دامی تازه بدون آنتی‌بیوتیک و یا حاوی آنتی‌بیوتیک غلظت پایین تعلق داشت که به ترتیب ۹۳ و ۹۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داشتند. پس از آن نیز تیمار سوم، کربن بیوماس میکروبی بالاتری نسبت به بقیه داشت. کمترین بیوماس میکروبی نیز در تیمار اول در خاک شاهد دیده شد. در روز پانزدهم و با گذشت زمان بیشتری از کاربرد کودها، مقدار کربن بیوماس میکروبی نسبت به روز پنجم افزایش یافت و مانند قبل بیشترین مقدار آن در تیمارهای دوم و سوم دیده شد. در روز ۲۵ روند افزایش کربن بیوماس میکروبی همچنان حفظ شد و بیشترین مقدار کربن بیوماس میکروبی در طول دوره در همه تیمارها در این روز دیده شد. ترتیب مقدار کربن بیوماس میکروبی در این روز مانند روز ۱۵ بود. در روز ۴۵ مقدار کربن بیوماس میکروبی نسبت به روز ۲۵ و ۱۵ کمتر شده بود. بیشترین کربن بیوماس میکروبی در تیمارهای دوم، سوم و چهارم دیده شد. سایر تیمارهای کاربرد کود مرغی نیز بدون تفاوت معنی‌دار در بین آنها، در رتبه بعدی قرار داشتند.

جدول ۵: کربن بیوماس میکروبی (mg C/kg Soil) در خاک در تیمارهای مختلف کاربرد کود مرغی.

T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1	
A <sup>۴۸۰±۱۸c</sup>	C <sup>۴۸۳±۱۰c</sup>	D <sup>۴۷۷±۱۵c</sup>	C <sup>۸۳۹±۱۱a</sup>	C <sup>۶۷۳±۲۲b</sup>	D <sup>۸۴۷±۲۳a</sup>	۴۳۵±۱۴cd A	۵
A <sup>۶۱۱±۱۳c</sup>	B <sup>۶۷۳±۱۱c</sup>	C <sup>۶۶۶±۱۴c</sup>	B <sup>۱۲۶۸±۱۶a</sup>	B <sup>۸۷۲±۱۹b</sup>	B <sup>۱۲۴۶±۲۵a</sup>	A <sup>۴۷۸±۱۳d</sup>	۱۵
A <sup>۱۲۶۸±۱۹c</sup>	A <sup>۱۱۲۳±۱۴d</sup>	A <sup>۱۲۸۱±۱۱c</sup>	A <sup>۱۴۶۰±۱۴a</sup>	A <sup>۱۳۴۷±۲۷b</sup>	A <sup>۱۴۷۸±۲۲a</sup>	A <sup>۴۱۳±۱۶e</sup>	۲۵
A <sup>۷۱۲±۱۴b</sup>	B <sup>۷۰۷±۱۲b</sup>	B <sup>۷۲۱±۱۰b</sup>	C <sup>۹۳۶±۱۷a</sup>	B <sup>۹۳۳±۲۱a</sup>	C <sup>۹۳۳±۲۳a</sup>	A <sup>۴۴۳±۱۲c</sup>	۴۵

T1- خاک بدون کود مرغی T2- کود مرغی تازه بدون آنتی بیوتیک T3- کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت بالا T4- کاربرد کود مرغی تازه آنتی بیوتیک غلظت پایین T5- کود مرغی بدون آنتی بیوتیک کمپوست شده T6- کود مرغی آنتی بیوتیک غلظت بالا و کمپوست شده هوازی T7- کود مرغی آنتی بیوتیک غلظت پایین و کمپوست شده هوازی. حروف کوچک یکسان در هر سطر و حروف بزرگ یکسان در هر ستون از نظر آماری در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

## بحث

در مجموع نتایج نشان داد فرایند کمپوست کردن موجب کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها شده است. در تعداد زیادی از پژوهش های پیشین نیز مشخص شده بود که کمپوست کردن موجب کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها در کود دام و طیور می شود (Liu *et al.*, 2018; Slana and Sollner-Dolenc, 2016; Slana *et al.*, 2017) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد و نشان می دهد فرایند کمپوست کردن در دمای مناسب در شرایط آزمایشگاهی قادر به کاهش غلظت (%۳۵ تا %۴۶) آنتی بیوتیک انروفلوکسازین در کود مرغی می باشد.

نتایج این پژوهش در مورد جمعیت گروه های باکتریایی مورد مطالعه نشان داد که کاربرد کود مرغی بدون آنتی بیوتیک بر جمعیت هر سه گروه میکروبی تاثیر مثبت داشت و تاثیر کود تازه (۵۱ تا ۷۴ درصد) بیشتر از کود کمپوست شده (۴۳ تا ۵۸ درصد) بود (جدول ۱ تا ۳). حضور انروفلوکسازین در کود مرغی و کاربرد آن در مزارع منجر به کاهش جمعیت این باکتری ها در خاک ها شد (۱۴ تا ۷۳ درصد) و فرایند کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه شدت تاثیرگذاری آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت (جدول ۱ تا ۳). آنتی بیوتیک های تجزیه نشده در حین فرایند کمپوست نمودن و همچنین حضور متابولیت های آنها در کود کمپوست شده احتمالاً همچنان به عنوان یک مهارکننده رشد باکتری ها عمل نموده و جمعیت آنها را کاهش داده است (Wei *et al.*, 2018). تاثیر منفی آنتی بیوتیک بر جمعیت *Pseudomonas putida* کمتر از *Azotobacter* و *Pseudomonas fluorescens* بود. گروه میکروبی *Pseudomonas fluorescens* بیشتر از دو گروه دیگر نسبت به انروفلوکسازین حساس بود و بیشترین کاهش معنی دار (۷۳ درصد) را نشان داد (جدول ۲). در مورد تاثیر آنتی بیوتیک ها بر این سه گروه باکتریایی در گذشته مطالعه زیادی صورت نگرفته است اما برخی مطالعات پراکنده نشان می دهد که تاثیر آنتی بیوتیک ها بر گروه های میکروبی خاص بسیار متنوع و متفاوت است و به عواملی مانند نوع گونه میکروبی (Hammesfahr *et al.*, 2008)، نوع آنتی بیوتیک (Zielezny *et al.*, 2006)، غلظت آن (Thiele-Bruhn and Beck, 2005) و نوع شرایط خاک (Čermák *et al.*, 2008) بستگی

دارد. وی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین باعث کاهش جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک در خاک می‌شود. در مطالعه‌ای همسفر و همکاران (۲۰۰۸) اثرات سولفادiazin ۱ را بر روی گروه‌های مختلف میکروبی بررسی نمودند و گزارش دادند که تغییر در پروفیل پروتئینی *Pseudomonas* ها و *protobacter* ها در روش الکتروفورز کمتر از باکتری‌های دیگر بود و این احتمالاً به دلیل مقاومت ذاتی سویه‌ها در این دو گروه بود. ژو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که انروفلوکساسین در غلظت‌های پایین موجب کاهش رشد باکتری‌های بیماری‌زا در خاک می‌شود ولی به باکتری‌های مفید آسیب نمی‌رساند. اما در غلظت‌های بالا به باکتری‌های مفید نیز آسیب رسانده و موجب کاهش حاصلخیزی خاک می‌شود (Zhou *et al.*, 2008). در مجموع به نظر می‌رسد در پژوهش ما، از آنجایی که از یک نمونه خاکی استفاده شد که قبلاً هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیکی از منابع خارجی دریافت نکرده بود و همچنین انروفلوکساسین نیز یک آنتی‌بیوتیک مصنوعی می‌باشد، احتمالاً هیچ‌گونه مقاومت میکروبی قبلی در این سه گروه باکتریایی در خاک وجود نداشته و اضافه شدن انروفلوکساسین و متابولیت‌های آن به خاک همراه با کود مرغی به این سه گروه میکروبی مفید در ابتدای دوره آسیب وارد نموده و جمعیت آنها را کاهش داده است اما پس از گذشت زمان کم‌کم مقاومت میکروبی ایجاد شد و در تیمارهای حاوی انروفلوکساسین جمعیت دوباره رو به افزایش گذاشت (جدول ۱ تا ۳)..

نتایج آزمایش تنفس میکروبی نیز مشخص نمود که کاربرد کود مرغی موجب افزایش تنفس میکروبی خاک می‌شود و از آنجا که کود مرغی حاوی کربن آلی و عناصر غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد، این موضوع منطقی به نظر می‌رسد. در این مورد بین کود مرغی تازه و کمپوست شده تفاوت چندانی دیده نشد. حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در کود مرغی مقدار تنفس را چندان تحت تاثیر قرار نداد و حتی سبب افزایش مقدار تنفس (۲۵٪ نسبت به تیمار شاهد متناظر) شد (جدول ۴). نتایج پژوهش‌گران قبلی در این مورد متضاد با یکدیگر می‌باشد (Cui *et al.*, 2014, Näslund *et al.*, 2008). کوی و همکاران (۲۰۱۴) غلظت‌های ۱، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به خاک اضافه و گزارش کردند مقدار تنفس خاک در روزهای اولیه تغییری نسبت به تیمار شاهد نداشت اما از روز نهم، حضور سیپروفلوکساسین مقدار تنفس را افزایش داد که حتی این افزایش تنفس در بالاترین غلظت نیز دیده شد. آنان این احتمال را دادند که میکروارگانیسم‌های مقاوم از خود آنتی‌بیوتیک و یا از میکروارگانیسم‌های مرده به عنوان منبع کربنی استفاده نموده و موجب افزایش تنفس شده‌اند (Cui *et al.*, 2014). بر خلاف این، نسلاند و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند میزان تنفس در خاک محتوی پایرین تحت تاثیر سیپروفلوکساسین کاهش یافت و این کاهش با افزایش غلظت سیپروفلوکساسین شدت پیدا کرد (Näslund *et al.*, 2008). تیله برون و بک (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند تنفس خاک تحت تاثیر سولفادiazin یا اوکسی‌تتراساکلین تغییر نکرد (Thiele-Bruhn and Beck, 2005). کوتزرک و همکاران

(۲۰۰۸) نیز با کاربرد کود دامی آغشته به آنتی‌بیوتیک سولفادیازین، کاهش مقدار تنفس خاک را گزارش نمودند که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، شدت کاهش نیز بیشتر شد (Kotzerke *et al.*, 2008). با این حال در پژوهشی دیگر کونترک و همکاران (۲۰۱۱) کود دامی آغشته به دیفلوکساسین ۱ را به خاک اضافه و گزارش کردند که این عمل تنفس خاک را نسبت به شاهد افزایش داد (Kotzerke *et al.*, 2011).

زیلنزی و همکاران (۲۰۰۶) دو آنتی‌بیوتیک سولفادیازین و کلروتتراسایکلین را به خاک در غلظت‌های مختلف اضافه نمودند و گزارش کردند مقدار تنفس پایه خاک در حضور سولفادیازین و کلروتتراسایکلین در یک دوره ۲۰ روزه تغییر معنی‌داری نداشت. در پژوهش آنان مقدار تنفس برانگیخته در حضور گلوکز تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک سولفادیازین کاهش یافت ولی در حضور کلروتتراسایکلین تغییری نکرد (Zielezny *et al.*, 2006). آنان این عدم تغییر در مقدار تنفس را به غیرفعال شدن سریع کلروتتراسایکلین در خاک‌های لوویسول دانستند. در پژوهش دیگری وکلایک و همکاران (۲۰۰۴) اعلام کردند که تنفس خاک در حضور آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سولفونامید و سولفاکلروپیریدازین در غلظت‌های ۶۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بین ۱/۳ تا ۱/۷ برابر بیشتر از تنفس معمولی خاک شد. این پژوهش‌گران به دلیل استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از خاک در پایان دوره و همچنین عدم وجود فاز تاخیری در رشد میکروبی، استدلال کردند که خود آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک ماده غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار نگرفته‌اند اما دلیل افزایش تنفس نیز برایشان ناشناخته باقی ماند (Vaclavik *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد نوع آنتی‌بیوتیک، نوع جامعه میکروبی خاک و شرایط تغذیه‌ای خاک بر مقدار تنفس خاک تاثیرگذار بوده است و در برخی مواقع منجر به نتایج متضاد می‌شود. در پژوهش ما این احتمال وجود دارد که آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک غیرفعال شده باشند و بر مقدار تنفس تاثیری نداشته باشند. یکی دیگر از دلایل احتمالی ممکن است این باشد که با کاربرد آنتی‌بیوتیک ضد باکتریایی، فعالیت باکتری‌ها کاهش یافته ولی فعالیت قارچ‌های تجزیه کننده مواد آلی افزایش یافته و در نهایت سبب افزایش تنفس شده باشد.

نتایج بیوماس میکروبی نیز نشان داد که کاربرد کود مرغی کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد و تاثیر کود مرغی تازه در این مورد بیشتر بود. وجود آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا در کود مرغی تاثیر منفی در روند افزایشی کربن بیوماس میکروبی به‌ویژه در ابتدای دوره داشت. اگرچه در پایان دوره مقدار کربن بیوماس میکروبی در تیماره ای کود مرغی تازه یکسان بود (جدول ۵). این موضوع نشان داد که در ابتدای دوره وجود آنتی‌بیوتیک در کود می‌تواند موجب تاخیر در رشد برخی میکروارگانیسم‌ها شده و جمعیت‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار دهد. در پژوهشی کولینز و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند اضافه کردن مخلوط اوکسی‌تتراساسکلین و آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم خاک سبب کاهش بیوماس میکروبی

خاک شد (Colinas *et al.*, 1994). با این حال کوردوبا و اسکو (۲۰۰۷) گزارش نمودند اضافه کردن سیپروفلوکساسین به خاک سبب افزایش بیوماس میکروبی شد و علت آن را استفاده از این آنتی‌بیوتیک به عنوان منبع کربن عنوان کردند (Cordova-Kreylos and Scow, 2007).

در مجموع این نتیجه به دست آمد که حضور انروفلوکساسین در کود مرغی و کاربرد آن در خاک‌های کشاورزی، جمعیت سه گروه باکتری مورد مطالعه را کاهش داد. کمپوست نمودن کود مرغی قبل از مصرف نیز تاثیر منفی آنتی‌بیوتیک‌ها بر جمعیت سه گروه باکتری مورد مطالعه را به طور کامل حذف نکرد.

## نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که کمپوست نمودن کود مرغی قبل از کاربرد آن در مزارع موجب کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در کود شده و از ورود آن به خاک‌های کشاورزی و محیط زیست تاحدی جلوگیری می‌کند. نتایج پژوهش همچنین نشان داد که کاربرد کود مرغی تازه و یا کمپوست شده بدون آنتی‌بیوتیک منجر به افزایش جمعیت هر سه گروه میکروبی شد، اما حضور آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در کود مرغی منجر به کاهش جمعیت *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* در خاک شد و فرایند کمپوست کردن کود مرغی نیز اگرچه شدت تاثیرگذاری آن را کمتر کرد اما همچنان کاهش جمعیت وجود داشت. کاربرد کود مرغی همچنین موجب افزایش تنفس میکروبی خاک شد و در این مورد بین کود مرغی تازه و کمپوست شده تفاوت چندانی دیده نشد. حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در کود مرغی سبب افزایش مقدار تنفس شد. کاربرد کود مرغی بدون آنتی‌بیوتیک کربن بیوماس میکروبی را به طور معنی‌داری افزایش داد و تاثیر کود مرغی تازه در این مورد بیشتر بود. وجود آنتی‌بیوتیک با غلظت بالا در کود مرغی تاثیر منفی در روند افزایشی کربن بیوماس میکروبی به‌ویژه در ابتدای دوره داشت. به طور کلی نتایج پژوهش نشان داد که رهاسازی و انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک بر اثر افزودن کود مرغی به مزارع حتی اگر قبل از مصرف کمپوست شده باشد، نیز روی گروه‌های باکتریایی مفید خاک موثر است و باعث کاهش رشد آنها می‌شود و در مورد کاربرد کودهای محتوی آنتی‌بیوتیک در خاک‌ها در طولانی مدت باید بررسی‌های بیشتری انجام شود.

## منابع

- Anderson, J. and Domsch, K. (1978) Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10:207-213.
- Čermák, L., Kopecný, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková, K. and Ságová-Marečková, M. (2008) Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Applied Soil Ecology* 40:348-358.
- Colinas, C., Ingham, E. and Molina, R. (1994) Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides. *Soil Biology and Biochemistry* 26:41-47.



- Cordova-Kreylos, A.L. and Scow, K.M. (2007) Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *The ISME Journal* 1:585.
- Cui, H., Wang, S.P., Fu, J., Zhou, Z.Q., Zhang, N. and Guo, L. (2014) Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils* 50:939-947.
- Davis, K.E., Joseph, S.J. and Janssen, P.H. (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71:826-834.
- Diao, X., Sun, Y., Sun, Z. and Shen, J. (2004). Effects of Apramycin on microbial activity in different types of soil. *Ecology and Environment* 13:565-568.
- Ding, C. and He, J. (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:925-941.
- Ding, G.C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K. and Schloter, M. (2014) Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS One* 9:e92958.
- Fründ, H.C., Schlösser, A. and Westendarp, H. (2000) Effects of tetracycline on the soil microflora determined with microtiter plates and respiration measurement. *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch* 93:244-247.
- Grenni, P., Ancona, V. and Caracciolo, A.B. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal* 136:25-39.
- Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K. and Thiele-Bruhn, S. (2008) Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1583-1591.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4): 579-598
- Hund-Rinke, K., Simon, M. and Lukow, T. (2004) Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. *Journal of Soils and Sediments* 4:11.
- Katoh, K. and Itoh, K. (1983) New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent pigment. *Soil Science and Plant Nutrition* 29:525-532.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B. and Ok, Y.S. (2011) Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, & Soil Pollution* 214:163-174.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Translational Research*, 44(2): 301-307.
- Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, K., Lamshöft, M., Thiele-Bruhn, S., Schloter, M. and Wilke, B.M. (2011) Influence of difloxacin-contaminated manure on microbial community structure and function in soils. *Biology and Fertility of Soils* 47:177-186.
- Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.M. and Schloter, M. (2008) Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environmental Pollution* 153:315-322.
- Kuhlmann, J., Dalhoff, A. and Zeiler, H.J. (2012) *Quinolone antibacterials*. Springer Science & Business Media
- Lewis, K. (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery* 12: 371.
- Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Zhao, J.L., Yang, J.F. and Zhao, L.F. (2009) Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157:1636-1642.
- Liu, H., Pu, C., Yu, X., Sun, Y. and Chen J. (2018) Removal of tetracyclines, sulfonamides, and quinolones by industrial-scale composting and anaerobic digestion processes. *Environmental Science and Pollution Research*:1-10.

- Näslund, J., Hedman, J.E. and Agestrand, C. (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology* 90:223-227.
- Poulsen, P.H., Al-Soud, W.A., Bergmark, L., Magid, J., Hansen, L.H. and Sørensen, S.J. (2013) Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial—Prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. *Soil Biology and Biochemistry* 57:784-793.
- Slana, M., Pahor, V., Cvitkovič Maričič, L. and Sollner-Dolenc, M. (2014) Excretion pattern of enrofloxacin after oral treatment of chicken broilers. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 37:611-614.
- Slana, M. and Sollner-Dolenc, M. (2016) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under various laboratory conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 23:4422-4429.
- Slana, M., Žigon, D. and Sollner-Dolenc, M. (2017) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under field conditions and its residuals effects to the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 24:1-10.
- Thiele-Bruhn, S. and Beck, I.C. (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59:457-465.
- Thiele-Bruhn, S. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166:145-167.
- Vaclavik, E., Halling-Sørensen, B. and Ingerslev, F. (2004) Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere* 56:667-676.
- Vance, E.D., Brookes, P.C. and Jenkinson, D.S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19:703-707.
- Wei, Z., Wang, J., Zhu, L., Wang, J., and Zhu, G. (2018) Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *Scientific reports*, 8(1); 5828
- Westergaard, K., Müller, A., Christensen, S., Bloem, J and Sørensen, S. (2001) Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 33:2061-2071.
- Zarfl, C., Klasmeier, J. and Matthies, M. (2009) A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. *Chemosphere* 77:720-726.
- Zhou, X., Chen, C., Yue, L., Sun, Y., Ding, H. and Liu, Y. (2008) Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26:272-277.
- Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H. and Tappe, W. (2006). Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2372-2380.

## Effect of chicken manure containing Enrofloxacin on soil respiration, microbial biomass, and population of some beneficial bacteria

M. Mohammadzadeh<sup>1</sup>, F. Ghasemian Roudsari<sup>2</sup>, A. Hassani<sup>2\*</sup>, A. Zamani<sup>4</sup>

Received:2018.6.11

Accepted:2019.4.20

### Abstract

The concentration of antibiotics in the soil increases with the addition of fresh or composed chicken manure containing antibiotics and may affect the microbial community of the soil. The purpose of this study is to evaluate the effect of adding chicken manure containing Enrofloxacin to soil on the population of *Azotobacter* spp, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as microbial biomass and respiration of soil. An experiment was conducted in a laboratory for 45 days with 7 treatments and three replications including fresh and composted chicken manure containing Enrofloxacin in two levels of high (26.2 mg kg<sup>-1</sup>) and low (4.23 mg kg<sup>-1</sup>) concentrations and manure without any antibiotic based on a completely randomized design. The results showed that the use of chicken manure containing Enrofloxacin reduced the population of *Azotobacter* spp (28%), *Pseudomonas fluorescens* (73%) and *Pseudomonas putida* (14.6%) in the examined soils. However, the composting of chicken manure, reduces its negative effect, but still leads to a decline in bacteria population. The use of fresh chicken manure led to a 127 percent increase in microbial respiration of the soil compared to the control but between other treatments there was no meaningful difference. The use of chicken manure without antibiotic significantly increased the microbial biomass (95%). The presence of Enrofloxacin in poultry manure had a negative effect on the microbial biomass. In general, the release of antibiotics in the soil due to the use of chicken manure on the farm, even if composted prior to the use of it, reduces growth of soil beneficial bacteria.

**Keywords:** *Azotobacter*, Compost, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*

---

1- M.Sc. Student, Environmental Science. Dept., Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran

2 – Assist. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran

3- Assist. Prof., Soil Sci. Dept., Faculty of Agriculture, Univ. of Zanjan, Iran

\* (Corresponding author: Akbar.Hassani@znu.ac.ir)

4- Assist. Prof., Environmental Science, Faculty of Science, Univ. of Zanjan, Iran

# بررسی کیفیت آب رودخانه زاینده‌رود با استفاده از شاخص‌های بی‌مهرگان کفزی در

فاصله پائیز ۹۶ تا بهار ۹۷

الهه نیکنام<sup>۱</sup>، عاطفه چمنی<sup>۱\*</sup>، محسن نوروزی مبارکه<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۰

## چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی کیفی آب رودخانه زاینده‌رود با استفاده از جوامع بی‌مهرگان کفزی در فاصله پائیز ۹۶ تا بهار ۹۷ می‌باشد. بدین منظور از بالا دست تا پائین دست زاینده‌رود در شش ایستگاه، نمونه‌برداری از رسوب انجام و با استفاده از فرمالین ۴٪ تثبیت شد و با محلول رزینگال رنگ‌آمیزی و بر اساس کلیدهای شناسایی، شناسایی گردید. در فصل بهار، ۸ خانواده متعلق به ۶ راسته، در فصل پائیز، ۱۱ خانواده متعلق به ۷ راسته و در فصل زمستان، ۶ خانواده متعلق به ۴ راسته شناسایی شد. بر اساس همه شاخص‌ها، همه ایستگاه‌ها و همه فصول در رده آلوده قرار می‌گیرند. با توجه به خشکی زاینده‌رود در دهه اخیر، جریان آب موجود در رودخانه بخصوص ایستگاه‌های تصفیه‌خانه و شاخ‌کنار و شریف‌آباد و نیز پساب صنایع، فاضلاب شهرها و روستاهای مجاور، سبب شده است که گونه‌های حساس به آلودگی اکوسیستم حذف و گونه‌های مقاوم به آلودگی غالب شوند.

**واژه‌های کلیدی:** زاینده‌رود، شاخص زیستی، ماکروبتوزها، آلودگی آب

## مقدمه

بی‌مهرگان کفزی یا بنتوزها به کلیه جاندارانی اطلاق می‌گردد که در سطح یا درون رسوبات منابع آبی و نواحی نزدیک بستر آب زندگی می‌کنند و اندازه آن‌ها از ۰/۵ میلی متر بزرگتر است (Rosenberg & Resh, 1993). این موجودات در زنجیره غذایی آبی دارای نقش کلیدی هستند. کفزیان در تولید، رسوب گذاری، شکستن، بازچرخش و برگشت مواد آلی و همچنین به عنوان حلقه اتصال در شبکه‌های غذایی دریاها و همین طور منابع غذایی موجودات بزرگتر از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (نبوی و همکاران، ۱۳۹۴). یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی وضعیت فیزیکی، شیمیایی و زیستی آب، مطالعه جاندارانی است که در آن زندگی می‌کنند. ماکروبتوزها به تغییرات ایجاد شده در پارامترهای محیطی (عمق، سرعت، اندازه بستر، کیفیت آب) (Fathi *et al.*, 2016) همچنین، تجمع آلودگی‌ها در طی زمان واکنش می‌دهند و شرایط کیفی آب در هر منطقه را به دقت ترسیم می‌کنند.

۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان(خوراسگان)، اصفهان، ایران

\* (آدرس نویسنده مسئول: atefehchamani@yahoo.com)

کنند و می‌توان از آن‌ها در ارزیابی و پایش اکوسیستم‌های آبی و بررسی روند تغییرات وضعیت کیفی آب استفاده کرد (Tran *et al.*, 2018). شاخص‌های زیستی بر اساس ماکروبن‌توزها یکی از موثرترین و مفیدترین شاخص‌ها در ارزیابی زیست محیطی اکوسیستم‌ها است که بر اساس حساسیت‌های اکولوژیکی هر تاکسون، مقادیر کمی را ارائه می‌کنند که با استفاده از آن می‌توان کیفیت اکوسیستم محل زیست آنها را پیش‌بینی کرد. بر این اساس موجودات کفزی را می‌توان در چهار گروه حساس به آلودگی، نیمه حساس به آلودگی، نیمه مقاوم و مقاوم به آلودگی تقسیم کرد (Mollazadeh, 2014). در گذشته این شاخص‌ها تنها شامل شاخص‌های تنوع و تراکم مانند شاخص‌های غنا، تنوع و غالبیت (Pielou, 1976) بود. اما در حال حاضر شاخص‌های متنوعی بر اساس میزان مقاومت ماکروبن‌توزها به آلودگی، تدوین شده است و مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر این اساس، شاخص‌هایی مانند EPT (Edegebene *et al.*, 2019), ASPT (Johnson, 2019; Pešić *et al.*, 2019), BMWP (Johnson *et al.*, 2019; Rais *et al.*, 2019) در سال‌های اخیر به فراوانی در مقالات و مطالعات مختلف در سراسر جهان و ایران مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

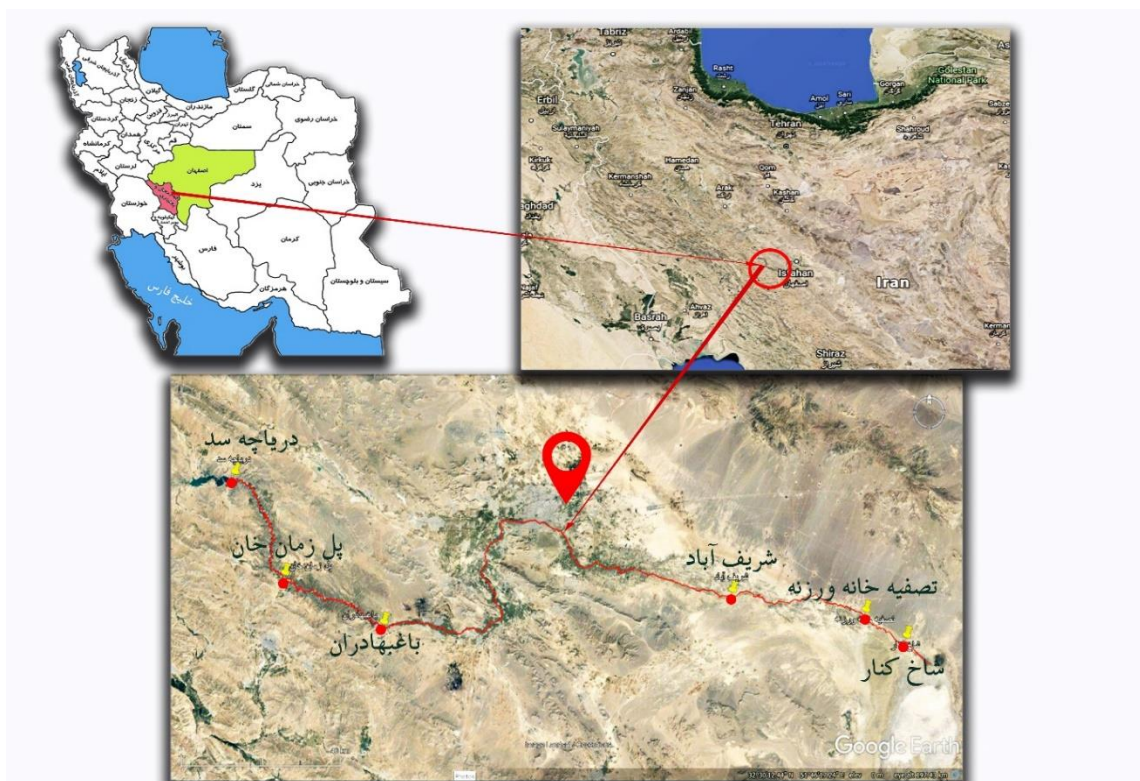
حوزه آبریز زاینده‌رود با مساحت حدود ۴۱۵۰۰ کیلومتر مربع (Babaei *et al.*, 2013)، حوضه‌ی کاملاً بسته‌ای است که هیچ خروجی به دریا ندارد. رودخانه زاینده‌رود مهم‌ترین و حیاتی‌ترین رودخانه منطقه مرکزی ایران (استان اصفهان) است (Safavi *et al.*, 2014) که به طول ۳۵۰ کیلومتر (Nabinejad, 2018)، در امتداد تقریبی غرب-شرق در جریان می‌باشد و آب آبیاری، شرب و صنعت استان اصفهان را که یکی از مهم‌ترین مناطق اقتصادی ایران است، تأمین می‌کند (Salemi & Rust, 2005). رودخانه زاینده‌رود از کوه‌های زاگرس در غرب اصفهان سرچشمه می‌گردد و در تالاب بین‌المللی گاوخونی در شرق اصفهان به پایان می‌رسد (Sanayei *et al.*, 2009). در دهه‌های اخیر، این رودخانه محل تخلیه پساب صنایع مختلف موجود در حاشیه آن همچنین فاضلاب‌های شهرها و روستاهای اطراف آن شده است. به گونه‌ای که حضور طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها در این اکوسیستم، به صورت یک مشکل جدی در کنار معضل خشکسالی و کمبود آب، توجه محققین را به خود جلب نموده و مطالعات گسترده‌ای در این خصوص صورت گرفته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی کیفیت آب رودخانه زاینده‌رود با استفاده از شاخص‌های تنوع زیستی کفزیان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و شناسایی نمونه‌ها

از دریاچه سد زاینده‌رود تا تالاب بین‌المللی گاوخونی، ۶ ایستگاه نمونه‌برداری انتخاب (دریاچه سد زاینده‌رود، پل زمان‌خان و باغبه‌داران در بالادست شهر اصفهان و شریف‌آباد، تصفیه‌خانه ورزش و شاخ‌کنار در پایین‌دست شهر اصفهان) و در هر ایستگاه، نمونه‌برداری از رسوب انجام شد. نمونه‌برداری در ۳ فصل از ۶ ایستگاه مشخص شده انجام گرفت. مشخصات منطقه و مختصات جغرافیایی هر ایستگاه توسط GPS ثبت گردید. نمونه‌ها با فرمالین ۴٪ تثبیت و با محلول رزبنگال رنگ‌آمیزی شد. بعد

از جداسازی و تفکیک ماکروبن‌توزها در آزمایشگاه، به کمک کلیدهای شناسایی موجود (Oscoz *et al.*, 2011; Pescador *et al.*, 2004) مورد شناسایی قرار گرفتند.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

به منظور ارزیابی زیستی کیفیت آب از شاخص (Paisley *et al.*, 2007) BMWP و شاخص ASPT (Washington, 1984) EPT، (Wright *et al.*, 2000) EPT/CHI، شانون‌وینر (Mason, 2002) و مارگالف (Margalef, 1958) استفاده گردید.

**شاخص BMWP:** برای محاسبه این شاخص در هر ایستگاه، ابتدا تعداد خانواده‌های ماکروبن‌توزهای موجود در هر ایستگاه یا فصل مشخص شد. سپس با استفاده از امتیازهای سیستم BMWP (Paisley *et al.*, 2007) مجموع امتیاز BMWP برای هر ایستگاه یا فصل محاسبه و در ۵ گروه کیفی (Mandaville, 2002) طبقه‌بندی گردید. از تقسیم مجموع امتیاز BMWP برای هر ایستگاه یا فصل بر فراوانی افراد شناسایی شده در آنها، شاخص ASPT، محاسبه می‌شود و بر اساس آن، هر ایستگاه با توجه به مقدار محاسبه شده شاخص، در یکی از چهار گروه کیفی آب (Mandaville, 2002) قرار می‌گیرد.

**شاخص EPT:** به تعداد کل افراد خانواده‌های سه راسته پلکوپترا، تریکوپترا و افمروپترا در هر ایستگاه یا فصل گفته می‌شود. به طور کلی افراد خانواده‌های مذکور از نظر اکولوژیکی، حساس بوده و افزایش مقدار کمی آن‌ها بیانگر افزایش کیفیت آب است. بر اساس هر خانواده، امتیاز حساسیت متفاوت است و با توجه به امتیازهای کسب شده بر اساس جداول امتیازدهی موجود، پنج طبقه کیفی آب (Wright *et al.*, 2000)، مشخص گردید.

**شاخص EPT/CHI:** این شاخص با تقسیم تعداد کل افراد خانواده‌های سه راسته پلکوپترا، افمروپترا و تریکوپترا به افراد خانواده شیرونومیده از راسته دیپترا محاسبه می‌شود. فراوانی EPT نسبت به خانواده شیرونومیده نشان‌دهنده تعادل جامعه است، به طور که EPT بیانگر حساسیت به تغییرات محیط زیست بوده در حالی که خانواده شیرونومیده، حساسیت کمتری به تغییرات دارند. جامعه‌ای که دارای شرایط زیستی خوبی باشد، توزیع یکنواختی در میان این چهار گروه نشان می‌دهد در حالی که جوامعی که دارای شمار نامتناسبی از شیرونومیده‌ها باشد، تعادل اکولوژیکی خود را از دست داده‌اند (Coimbra *et al.*, 1996).

**شاخص شانون-وینر:** شاخص شانون-وینر (Cai *et al.*, 2002)، پرکاربردترین شاخص برای ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های ساحلی و دریایی است (Luo *et al.*, 2016) که بر اساس آن، اکوسیستم‌ها در چهار گروه از لحاظ کیفیت آب (Washington, 1984)، طبقه‌بندی می‌شوند.

## نتایج و بحث

داده‌های به دست آمده طی ۳ فصل نمونه‌برداری در ۶ ایستگاه مختلف در پائین‌دست و بالا دست شهر اصفهان با ۳ تکرار جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر این اساس در فصل بهار، ۸ خانواده متعلق به ۶ راسته (جدول ۳)، در فصل پائیز، ۱۱ خانواده متعلق به ۷ راسته (جدول ۱) و در نهایت در فصل زمستان، ۶ خانواده متعلق به ۴ راسته (جدول ۲) مورد شناسایی قرار گرفت.

جدول ۱: گونه‌های شناسایی شده در فصل پائیز

ایستگاه	راسته	خانواده	نام فارسی
باغ بهادران	Ephemeroptera	Baetidae	افمروپتراهای کوچک با شنای قوی
باغ بهادران	Plecoptera	Ptychopteridae	مگس پا بلند فانتوم
باغ بهادران	Diptera	Chironomidae	پشه‌های بی‌آزار
باغ بهادران	Diptera	Ceratopogonidae	پشه‌های گزنده
باغ بهادران	Diptera	Tipulidae	مگس‌های بی‌رنگ
باغ بهادران	Nematoda	Monhysteridae	کرم‌های مویی یا دم اسبی
پل زمان خان	Plecoptera	Ptychopteridae	مگس پا بلند فانتوم
پل زمان خان	Nematoda	Monhysteridae	کرم‌های مویی یا دم اسبی
پل زمان خان	Ephemeroptera	Baetidae	افمروپتراهای کوچک با شنای قوی
پل زمان خان	Diptera	Ceratopogonidae	پشه‌های گزنده
پل زمان خان	Trichoptera	Leptoceridae	تریکوپتراهای غلاف دار شاخ دراز
پل زمان خان	Trichoptera	Brachycentridae	تریکوپتراهای غلاف ساز فاقد برآمدگی
پل زمان خان	Trichoptera	Phycophilidae	تریکوپتراهای با زندگی ازاد
پل زمان خان	Mollusca	Physidae	حلزون و لیمپت‌ها
سد	Diptera	Chironomidae	پشه‌های بی‌آزار
شریف‌آباد	Annelidae	Oligochaeta	کرم‌های خاکی آبی
تصفیه‌خانه	Annelidae	Oligochaeta	کرم‌های خاکی آبی
شاخ کنار	Plecoptera	Ptychopteridae	مگس پا بلند فانتوم
شاخ کنار	Diptera	Chironomidae	پشه‌های بی‌آزار
شاخ کنار	Diptera	Tipulidae	مگس‌های بی‌رنگ



جدول ۲: گونه‌های شناسایی شده در فصل زمستان

نام معمول	خانواده	راسته	ایستگاه
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	باغ بهادران
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	باغ بهادران
پلیکوپتراهای بزرگ	Pteronarcyidae	Plecoptera	باغ بهادران
افمروپتراهای کوچک با شنای قوی	Baetidae	Ephemeroptera	باغ بهادران
حلزون‌ها و لیمپت‌ها	Physidae	Mollusca	باغ بهادران
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	پل زمان خان
افمروپتراهای کوچک با شنای قوی	Baetidae	Ephemeroptera	پل زمان خان
پلیکوپتراهای بزرگ	Pteronarcyidae	Plecoptera	پل زمان خان
افمروپتراهای کوچک با شنای قوی	Baetidae	Ephemeroptera	پل زمان خان
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	پل زمان خان
مگس‌های پابلند فانتوم	Ptychopteridae	Plecoptera	پل زمان خان
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	سد
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	سد
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	شریف‌آباد
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	تصفیه‌خانه
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	تصفیه‌خانه
مگس پابلند فانتوم	Ptychopteridae	Plecoptera	شاخ کنار
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	شاخ کنار

جدول ۳: گونه‌های شناسایی شده در فصل بهار

نام فارسی	خانواده	راسته	ایستگاه
افروپتراهای کوچک با شنای قوی	Baetidae	Ephemeroptera	باغ بهادران
تریکوپتراهای با زندگی آزاد	Phyacophilidae	Trichoptera	باغ بهادران
کرم‌های مویی یا دم اسبی	Monhysteridae	Nematoda	باغ بهادران
دراگون فلائی دم چماقی	Gomphidae	Odonata	باغ بهادران
پشه‌های گزنده	Ceratopogonidae	Diptera	باغ بهادران
افروپتراهای کوچک با شنای قوی	Baetidae	Ephemeroptera	پل زمان خان
پشه‌های گزنده	Ceratopogonidae	Diptera	پل زمان خان
تریکوپتراهای با زندگی آزاد	Phyacophilidae	Trichoptera	پل زمان خان
کرم‌های خاکی آبی	Oligochaeta	Annelidae	سد
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	شریف‌آباد
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	شریف‌آباد
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	تصفیه‌خانه
کرم‌های خاکی آبی	Oligochaeta	Annelidae	تصفیه‌خانه
مگس‌های بی‌رنگ	Tipulidae	Diptera	شاخ کنار
پشه‌های بی‌آزار	Chironomidae	Diptera	شاخ کنار

جدول ۴: شاخص‌های محاسبه شده در فصول مختلف

فصل/شاخص	EPT	EPT/CHIR	BMWP	ASPT	شانون وینر
پائیز	۳	۰/۲۸	۱۱/۶۶	۰/۵۶	۰/۶۴
زمستان	۵/۱۶	۰/۷۶	۱۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۷۱
بهار	۲/۵	۰	۹/۶۶	۰/۲۶	۰/۴۹

طبق جدول (۴)، شاخص EPT در زمستان و BMWP و ASPT در پائیز بیشترین مقدار را دارا هستند. EPT و BMWP

در بهار و ASPT در زمستان کمترین مقدار را دارا هستند.

جدول ۵: شاخص‌های محاسبه شده در ایستگاه‌های مختلف

ایستگاه/شاخص	EPT	EPT/CHIR	BMWP	ASPT	شانون وینر
تصفیه‌خانه	۰	۰	۳/۷	۰/۱۴	۰/۲
باغ بهادران	۶/۶	۰/۶	۲۰/۷	۰/۵۲	۱/۳
سد	۰	۰	۳/۷	۰/۱۸	۰/۱
شریف‌آباد	۰	۰	۳/۵	۰/۰۳	۰/۱
شاخ کنار	۱/۶	۰/۲	۵/۹	۰/۲۵	۰/۶
پل زمان خان	۱۳	۱/۲	۲۵/۶	۰/۹۵	۱/۳

بر اساس شاخص ASPT، همه ایستگاه‌ها (جدول ۵) و همه فصول (جدول ۴) در رده آلودگی آلی شدید قرار می‌گیرند. بر اساس شاخص BMWP، همه ایستگاه‌ها (جدول ۵) دارای آلودگی شدید هستند و در طبقه کیفی خیلی بد قرار می‌گیرند و تنها ایستگاه‌های باغبان‌داران و پل زمان‌خان در طبقه کیفی بد قرار گرفتند. پائیز و زمستان بر اساس شاخص BMW، در طبقه کیفی بد و بهار در طبقه کیفی خیلی بد قرار گرفت (جدول ۴).

بر اساس جدول (۵)، همه ایستگاه‌ها بر اساس شاخص EPT، در دسته فقیر و باغبان‌داران و پل زمان‌خان در دسته فقیر یا ضعیف قرار می‌گیرند. بر اساس جدول (۴)، هر ۳ فصل پائیز، زمستان و بهار بر اساس شاخص EPT در دسته فقیر قرار می‌گیرند. بر اساس جدول (۵)، شاخص شانون‌وینر همه ایستگاه‌ها را در ردیف آلودگی زیاد و تنها ایستگاه‌های باغبان‌داران و پل زمان‌خان را در ردیف آلودگی متوسط قرار می‌دهد. بر اساس جدول (۴)، همه فصول مورد مطالعه نیز بر اساس شاخص شانون‌وینر در ردیف آلودگی زیاد قرار می‌گیرند.

از راسته Diptera خانواده Chironomidae به دلیل انعطاف‌پذیری و مقاومت به تغییرات زیستگاه در ایستگاه‌های پائین‌دست شهر اصفهان از فراوانی بالاتری نسبت به ایستگاه‌های بالادست برخوردار است. این نتایج با مطالعه تاگلیفر و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی رابطه میان پارامترهای محیطی و جامعه ماکروبن‌توزهای آبی (Tagliaferro *et al.*, 2013) مطابقت دارد.

شاخص تنوع شانون‌وینر به عنوان معیاری جهت ارزیابی کیفیت آب مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس این شاخص، بیشترین تنوع در ایستگاه پل زمان‌خان و کمترین آن در ایستگاه شریف‌آباد و سد مشاهده شد. بنابراین می‌توان گفت که بالابودن شاخص تنوع در ایستگاه پل زمان‌خان نسبت به سایر ایستگاه‌ها می‌تواند ناشی از افزایش مواد غذایی قابل دسترس و در نتیجه شکل‌گیری و تجمع گروه‌های جدید برای مصرف آن باشد (Mantel *et al.*, 2010).

قانع و همکاران در ارزیابی زیستی رودخانه چافرود در سال ۱۳۸۵، اختلافات بین ایستگاه‌های مختلف را ناشی از شرایط غذایی بهتر دانسته‌اند که با نتیجه این تحقیق مطابقت دارد و نیز نعمتی و همکاران در ارزیابی کیفیت آب رودخانه زاینده‌رود، علت افزایش این شاخص در بعضی از ایستگاه‌ها را افزایش تعداد میکروزیستگاه‌ها و احتمال رویش گیاهی شدید در ایستگاه‌های مورد نظر دانسته‌اند و منطقه مورد مطالعه را در دو طبقه آلودگی متوسط و آلودگی حساس قرار دادند (Varnosfaderany *et al.*, 2010) که با نتیجه این تحقیق تشابه دارد.

در دریاچه سد زاینده‌رود، به دلیل تغییرات ناشی از احداث سد که باعث کاهش زیستگاه‌های مناسب کفزیان شده است و همچنین تغییرات شدید و فقیر بودن محیط از نظر مواد غذایی، وجود دیواره سد و در نتیجه جلوگیری از توزیع و انتقال کفزیان از مناطق پائین‌دست به این ناحیه، ترکیب جوامع کفزی به شدت کاهش یافته است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۶). این امر منجر به کاهش مقدار شاخص‌های تنوع گردیده است که با نظر (Lessard & Hayes, 2003) نیز تطابق دارد. تغییر در میزان شاخص‌های

زیستی علاوه بر تغییر در زیستگاه می‌تواند به علت تفاوت در چرخه زیستی گونه‌های مختلف کفزیان هم باشد. کاهش میزان شاخص‌های BMWP و ASPT در فصل بهار و زمستان احتمالاً به دلیل افزایش حجم و سرعت جریان آب است که باعث از بین رفتن زیستگاه قابل دسترس و امکان استقرار موجودات شده است. شاخص‌های غنا و درصد EPT در فصل بهار کاهش محسوسی را نشان دادند. بالاترین درصد EPT در ایستگاه‌های مختلف مربوط به فصل زمستان می‌باشد. کاهش شاخص BMWP در طول ایستگاه‌های مورد مطالعه از بالادست تا پائین‌دست رودخانه، نشان‌دهنده یک محیط نامتعادل و دارای عوامل آلاینده است که باعث شده است ترکیب جوامع بی‌مهرگان کفزی به شدت کاهش یابد.

### نتیجه‌گیری

احتمالاً بتوان علت آلودگی شدید رودخانه در طی مسیر را ناشی از این واقعیت دانست که رودخانه زاینده‌رود در طی گذر زمان تحت تاثیر ورود منابع آلاینده از صنایع و کارخانجات مختلف بوده است. با توجه به خشکی زاینده‌رود در دهه اخیر، جریان آب موجود در ایستگاه‌های تصفیه‌خانه و شاخ‌کنار و شریف‌آباد عملاً پساب صنایع، فاضلاب شهرها و روستاهای مجاور و پساب تصفیه‌خانه جنوب اصفهان است که به همین دلیل این اکوسیستم برای گونه‌های حساس به آلودگی و تغییرات محیط مناسب نیست و باعث حذف آنها از اکوسیستم و حضور و غلبه گونه‌های مقاوم به آلودگی شده است.

### منابع

- ابراهیمی دستگردی، ه.، ابراهیمی، ع.، فاخران اصفهانی، س. (۱۳۹۶). اثر سد زاینده‌رود بر جوامع بزرگ بی‌مهرگان کفزی و کیفیت آب رودخانه زاینده‌رود با استفاده از شاخص‌های زیستی ASPT و BMWP. بوم‌شناسی کاربردی، ۶(۲): ۶۶-۵۵
- قانع، ا.، احمدی، م. ر.، اسماعیلی، ع.، میرزاجانی، ع. (۱۳۸۵). ارزیابی زیستی رودخانه چافرود (استان گیلان) با استفاده از ساختار جمعیت ماکروبنتوز. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۰(۱): ۲۴۷-۲۵۸.
- نبوی، ن.، پازوکی، ج.، نبوی، ب. م. (۱۳۹۴). بررسی تنوع گونه‌ای و الگوی پراکنش کفزیان آب‌های ناحیه ساحلی بحرکان (خلیج فارس). اقیانوس‌شناسی، ۲۲(۶): ۱۳۶-۱۲۹.

Babaei, H., Araghinejad, S. and Hoorfar, A. (2013). Developing a new method for spatial assessment of drought vulnerability (case study: Zayandeh Rood river basin in Iran). *Water and Environment Journal*, 27(1): 50-57.

Cai, L., Ma, L., Gao, Y., Zheng, T. and Lin, P. (2002). Analysis on assessing criterion for polluted situation using species diversity index of marine macrofauna. *Journal of Xiamen University. Natural science*, 41(5): 641-646.

Coimbra, C., Graça, M. and Cortes, R. (1996). The effects of a basic effluent on macroinvertebrate community structure in a temporary Mediterranean river. *Environmental Pollution*, 94(3): 301-307.

Edegebene, A., Elakhame, L., Arimoro, F. and Osimen, E. (2019). Qualitative habitat evaluation index and some selected macroinvertebrate taxa metrics as a diagnostic tool for assessing pollution loads in a municipal river in north central Nigeria. *Tropical Freshwater Biology*, 28(1): 1-16.

- Fathi, P., Ebrahimi, E., Esmaeili, A. and Mirghafari, N. (2016). Bioassessment of Choghakhor Wetland using Benthic Macroinvertebrates. *Iranian Journal of Applied Ecology*, 5(15): 77-90. doi:10.18869/acadpub.ijae.5.15.77
- Johnson, A. C. (2019). Is freshwater macroinvertebrate biodiversity being harmed by synthetic chemicals in municipal wastewater? *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 11: 8-12.
- Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Edwards, F. K., Scarlett, P. M., Vincent, H. M. and von der Ohe, P. (2019). What Works? The Influence Of Changing Wastewater Treatment Type, Including Tertiary Granular Activated Charcoal On Downstream Macroinvertebrate Biodiversity Over Time. *Environmental toxicology and chemistry*. 38(8): 1820-1832.
- Lessard, J. L. and Hayes, D. B. (2003). Effects of elevated water temperature on fish and macroinvertebrate communities below small dams. *River research and applications*, 19(7): 721-732.
- Luo, X., Sun, K., Yang, J., Song, W. and Cui, W. (2016). A comparison of the applicability of the Shannon-Wiener index, AMBI and M-AMBI indices for assessing benthic habitat health in the Huanghe (Yellow River) Estuary and adjacent areas. *Acta Oceanologica Sinica*, 35(6): 50-58.
- Mandaville, S. (2002). Benthic macroinvertebrates in freshwaters: Taxa tolerance values, metrics, and protocols: Citeseer.
- Mantel, S. K., Hughes, D. A. and Muller, N. W. (2010). Ecological impacts of small dams on South African rivers Part 1: Drivers of change—water quantity and quality. *SA Journal of Radiology*, 36(3).
- Margalef, R. (1958). Information theory in biology. *General Systems Yearbook*, 3: 36-71.
- Mason, C. F. (2002). *Biology of freshwater pollution*: Pearson Education.
- Mollazadeh, N. (2014). Bioassessment of Marbor Stream quality via biological index of macro-benthos fauna. *Wetland Ecobiology*, 6(1): 47-56.
- Nabinejad, A. (2018). Aquatic Birds' Serology in Zayنده Rood River for NDV and AIV. *Iranian Journal of Allergy, Asthma & Immunology*, 17: 201-202.
- Oscoz, J., Galicia, D. and Miranda, R. (2011). *Identification guide of freshwater macroinvertebrates of Spain*: Springer Science & Business Media.
- Paisley, M., Trigg, D. and Walley, W. (2007). Revision and testing of BMWP scores. Paper presented at the Final report SNIFFER project WFD72a. Scotland and Northern Ireland Forum for Environmental Research (SNIFFER), Edinburgh.
- Pescador, M. L., Rasmussen, A. K. and Harris, S. C. (2004). *Identification manual for the caddisfly (Trichoptera) larvae of Florida*. Revised Edition. State of Florida, Department of Environmental Protection.
- Pešić, V., Dmitrović, D., Savić, A., Milošević, Đ., Zawal, A., Vukašinović-Pešić, V. and Von Fumetti, S. (2019). Application of macroinvertebrate multimetrics as a measure of the impact of anthropogenic modification of spring habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(3): 341-352.
- Pielou, E. C. (1976). *Ecological diversity*. New York.
- Rais, A., Afandhi, A. and Prasetya, B. (2019). Analysis of Water Pollution in Tertiary Ditch using Macroinvertebrate in Songka Village of Palopo City. *Indonesian Journal of Environment and Sustainable Development*, 10(1): 9-13.
- Rosenberg, D. M. and Resh, V. H. (1993). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* (1ed.): Springer US.
- Safavi, H. R., Esfahani, M. K. and Zamani, A. R. (2014). Integrated index for assessment of vulnerability to drought, case study: Zayandehrood River Basin, Iran. *Water resources management*, 28(6): 1671-1688.

- Salemi, H. R. and Rust, H. M. (2005). An Overview of the Hydrology of the Zayandeh Rud Basin, Iran. *Journal of Water and Wastewater ( in persian )*, 15(2): 2-13.
- Sanayei, Y., Ismail, N. and Talebi, S. (2009). Determination of heavy metals in Zayandeh Rood river, Isfahan-Iran. *World Applied Sciences Journal*, 6(9):1209-1214.
- Tagliaferro, M., Miserendino, M. L., Liberoff, A., Quiroga, A. and Pascual, M. (2013). Dams in the last large free-flowing rivers of Patagonia, the Santa Cruz River, environmental features, and macroinvertebrate community. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 43(6): 500-509.
- Tran, T. T., Le, H. D. and Ngo, X. Q. (2018). Comparison of the Shannon-wiener, Ambi, and M-AMBI index for Assessing Sediment Ecological Quality in Organic Shrimp Farming Ponds, Nam Can District, Ca Mau Province. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 34(3): 16-20.
- van Egmond, E. M., van Bodegom, P. M., Berg, M. P., Wijsman, J. W., Leewis, L., Janssen, G. M. and Aerts, R. (2018). A mega-nourishment creates novel habitat for intertidal macroinvertebrates by enhancing habitat relief of the sandy beach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 207: 232-241.
- Varnosfaderany, M. N., Ebrahimi, E., Mirghaffary, N. and Safyanian, A. (2010). Biological assessment of the Zayandeh Rud River, Iran, using benthic macroinvertebrates. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 40(3): 226-232.
- Washington, H. (1984). Diversity, biotic and similarity indices: a review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, 18(6): 653-694.
- Wright, J. F., Sutcliffe, D. W. and Furse, M. T. (2000). Assessing the biological quality of fresh waters. RIVPACS and other techniques. Freshwater Biological Association, Ambleside, England.

## **The water quality of Zayandeh-Rood river with Macrobenthos biodiversity indexes in autumn 2017 to Spring 2018**

E. Niknam<sup>1</sup>, A. Chamani<sup>1\*</sup>, M. Nourouzi Mobarake<sup>1</sup>

**Received:2018.5.13**

**Accepted:2019.7.1**

### **Abstract**

This study aimed to perform a qualitative analysis of Zayandeh-Rood River water using benthic invertebrate communities in autumn 2017 to Spring 2018. To do so, we selected 6 stations and 3 sediment samples were collected in each station. Sediment samples were fixated, and various animals were identified according to fauna benthic identification keys. Finally, in spring, 8 family belonged to 6 order; in autumn 11 family belonged to 7 order and in winter 6 family belonged to 4 order were identified. According to all indices, in all stations and all seasons, the quality of Zayandeh-Rood water placed in polluted class. Regarding the Zayandeh-Rood drought, during the last decade, the flow of water in the river especially in the wastewater treatment plant station, Shakh-kenar and Sharif Abad and also the industrial wastewater, sewage of the adjacent cities and villages, causes species resistant to pollution have become dominant in the river.

**Keywords:** biological index, Macrobenthos, water pollution, Zayandeh-Rood River

---

1-Environmental sciences Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

\*(Corresponding Author: atefehchamani@yahoo.com)

## Content

### **Isolation and identification of bovine mastitis bacteria in cow`s dairy in Isfahan**

S. Amiri Fahliyani, K. Beheshti Maal, F. Ghandehari.....22

### **Biosystematic study of marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) (Pallas, 1771) In wetland habitats of Aleshtar (Lorestan province)**

A. jazayeri, f. Papahn, A. Hatami.....37

### **Effects of astaxanthin, red and orange pepper on growth, coloration, hematological and immunology factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*)**

M. KasAlipour, H. Khara, A .Sadeghpour.....57

### **Effects of *Carum carvi* L. on Antioxidant status and oxidative stress parameters in rats exposed to 1, 2-dimethyl hydrazine**

A. Dadkhah, F. Fatemi, S. Dini.....75

### **Study of contents of some secondary metabolites and allelopathic effects of various organs of *Fumaria parviflora* weed on *Avena ludoviciana***

A. Ataei., E. Gholamalipour Alamdari., Z. Avarseji., A. Rahemi Karizaki .....96

### **The effect of hardening treatments on chilling stress tolerance of cucumber seedlings**

F. Ghanbari , S. Kordi..... 113

### **The effect of nano silver on elements of saffron corms under salinity condition**

A. karimi jafari , M. hoseinzadeh namin.....128

### **Comparison of phenolic, flavonoid compounds and antioxidative properties of *Mentha spicata* L. and *Mentha longifolia* L. 's extracts by different extraction methods**

N. Mohammadkhani , J. Abbaszadeh.....143

### **Effect of chicken manure containing Enrofloxacin on soil respiration, microbial biomass, and population of some beneficial bacteria**

M. Mohammadzadeh, F. Ghasemian Roudsari, A. Hassani, A. Zamani ..... 163

### **The water quality of Zayandeh-Rood river with Macroinvertebrates biodiversity indexes in autumn 2017 to Spring 2018**

E. Niknam, A.Chamani, M.Nourouzi.....175



Journal of Applied Biology  
summer2019

**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. Eftekhari, 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, Assistant 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: Banafsheh Mohammadi**

**Printing and Binding: Scientists Peak Publications**

**Circulation: 10 copies**

**Publication Frequency: Quarterly**

**Price: 10000 Rls**

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

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

**Tel/Fax: 021- 85692205**

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

**ISSN: 2251-7901**

**Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir**