



مجله زیست‌شناسی کاربردی

بهار ۱۳۹۹

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

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

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

اعضای هیأت تحریریه

دکتر فرشته افتخار، دانشیار دانشگاه شهید بهشتی

دکتر منیژه پاکروان، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران

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

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر طاهره فلسفی ممقانی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عدرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار فارسی و انگلیسی: 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 / ۸۹/۳/۱۱ - در تاریخ ۸/۹/۸۹ منتشر می‌گردد.

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

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

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

۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

Email: [Oolomepaieh@gmail.com](mailto:Oolomepaieh@gmail.com)

# راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

## هدف

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

## موضوعات مرتبط با مجله

مجله مقالاتی را که نتیجه‌ی تحقیقات در زمینه‌ی زیست‌شناسی کاربردی است 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 چکیده‌ی 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 به جز سایت ارسال شوند، در جلسه هیئت تحریریه بررسی نخواهند شد. تمامی مراحل داوری نیز از طریق سایت مجله قابل پیگیری است.
- نگارندگان همزمان با ارسال مقاله، فرم تعهدنامه را در سایت مجله، تکمیل و پس از امضای تمام نگارندگان و اسکن فرم، آن را به همراه مقاله از طریق سایت مجله ارسال نمایند.
- در مقاله‌های ارسالی باید تمامی نکات مربوط به شیوه صحیح نگارش از جمله اصول نقطه‌گذاری، 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 شماره‌گذاری فرمول‌ها).
- در متن مقاله، علامت % با کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جداول و شکل‌ها که علامت % در سمت چپ اعداد قرار گیرد).
- در متن مقاله (به جز جداول، شکل‌ها و چکیده‌ی انگلیسی که بر اساس سال میلادی بیان می‌شوند)، سال شمسی برای مقالات فارسی و سال میلادی برای مقالات انگلیسی بیان شوند.
- اسامی علمی (از جمله نام گیاهان، جانوران، میکروب‌ها) باید بر اساس سیستم دوفامی طبق جدیدترین طبقه‌بندی‌های 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  $21 \times 29/7$  سانتی‌متر ( $A^4$ ) با حاشیه  $2/5$  سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن  $1/5$  (به جز جداول، شکل‌ها و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم شماره گذاری شود و در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
- تعداد صفحات قابل قبول مقاله، حداکثر ۱۵ صفحه می‌باشد. شماره هر صفحه در وسط و پایین صفحه و با قلم نازنین معمولی و فونت ۱۲ باشد.
- قلم فارسی مورد استفاده، نازنین و قلم انگلیسی Times New Roman باشد. منظور از قلم توپر، Bold و قلم نازک، غیر Bold است.

- اندازه قلم انگلیسی در تمام موارد، دو سایز از قلم فارسی کوچکتر است.

- ابتدای هر پاراگراف به صورت تورفته (Indent) به اندازه  $1/27$  سانتی‌متر باشد.

## تدوین مقاله با شرح جزییات

- عناوین (اختیاری)، منابع و Abstract انگلیسی.
- عناوین اصلی فارسی: راست چین، ۱۴ توپر، انگلیسی: چپ چین، ۱۲ توپر
- پس از عناوین اصلی، نیازی به استفاده از دو نقطه (: ) نیست. مانند مقدمه (نه مقدمه:).
- سایر عناوین، عناوین درجه دوم و سوم محسوب می‌شوند.
- پس از عناوین اصلی و درجه دوم، ادامه متن از سطر جدید آغاز شود. اما عناوین درجه سوم، با دو نقطه (: ) از مطلب جدا شوند.
- اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه‌گیری کلی، سپاسگزاری
- تمام عناوین اعم از اصلی، درجه دوم و سوم، توپر باشند.
- ۱- عنوان مقاله: فارسی: وسط چین، ۱۴ نازنین توپر، انگلیسی: وسط چین، Times new Roman ۱۲ توپر
- ۲- نام نگارندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ توپر، با ویرگول از هم جدا شوند. شماره هر نگارنده، ۱۱ توپر در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)، درج علامت ستاره (\*) در سمت راست و بالای (superscript) نام نگارنده مسئول مکاتبه، انگلیسی: ۹ توپر با ویرگول از هم جدا شوند. قبل از آخرین نگارنده از حرف ربط and استفاده شود. شماره هر نگارنده در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)،
- ۳- آدرس نویسندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ نازک، انگلیسی: وسط چین، ۹ نازک در پاورقی

- ۴- چکیده: فارسی: ۱۲ نازک و ایتالیک تنها در یک پاراگراف، حداکثر 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، 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 به دست آمده (نتیجه) را به راحتی 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 ۳ خط افقی رسم شود. (دو خط نشان دهنده سر تیتیر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول) و بقیه‌ی خطوط عمودی و افقی غیر فعال شوند.  
- تمامی اعداد و متن درون جداول و شکل‌ها، انگلیسی (وسط چین، ۱۰ نازک) باشد. اعداد در صورت اعشاری بودن، تنها تا دو رقم اعشار ادامه داشته باشد.  
- عنوان جدول (در بالای جدول) و شکل (در پایین شکل) به زبان فارسی باشد. عنوان وسط چین ۱۱ توپر (Bold)  
- زیرنویس و علائم اختصاری زیر جداول و شکل‌ها، فارسی نازنین ۸ نازک باشد.  
- شکل‌ها در جای مناسب در متن ارائه شود.  
- کادر اطراف شکل‌ها حذف شود.
- ۹- سپاسگزاری: اختیاری است، نازنین ۱۲ معمولی.
- ۱۰- منابع: ۱۲ معمولی.
- تمام منابع پایان مقاله، بدون شماره باشند، بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشند.  
- عنوان مجله‌ها کامل نوشته شوند.  
(برای استفاده از نام‌های اختصاری استاندارد یا کامل مجلات علمی، به سامانه مجلات مربوطه مراجعه شود.  
- بین حروف اختصاری نام‌های اول یک نگارنده، فاصله نباشد (مثال: A.D.C).  
- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده‌اند، به جای ذکر سال، از عبارت under publishing استفاده شود.

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

### نشریات

الف) با یک نویسنده: نام خانوادگی، نام (ها). (سال انتشار) عنوان مقاله. عنوان نشریه، جلد (شماره): شماره صفحات.  
Wilson, R.G.J. (1981) Weed control in established dryland Alfalfa (*Medicago sativa*). Weed science 29: 615-618.

ب) با دو نویسنده:

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

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

Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998) Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posremergrnce herbicides. Weed Technology 3: 424-428.

### کتاب

الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار) نام کتاب. ناشر، تعداد صفحات.

ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار)، نام کتاب، ذکر تعداد چاپها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک است و 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، طریقه‌ی 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 بی‌نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود:

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

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

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

Agriculture and Agri-Food Canada. (1999) Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division. [http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean\\_e.html](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.

- ارزیابی کارایی شاخص‌های عملکرد چشم‌انداز (LFA) به‌منظور برآورد تنوع گیاهی در مراتع کیاسر مازندران  
سیده محدثه احسانی، رضا تمرتاش، غلامعلی حشمتی، اسماعیل شیدای کرکج..... ۹
- مطالعه‌ی قدرت مهارتی ترکیبات بیس ایندولی سنتتیک بر فرآیند فیبریلاسیون آمیلوئیدی با استفاده از روش‌های  
شبیه‌سازی مولکولی  
کاوه خدیاری، پرویز عبدالمالکی..... ۲۴
- بررسی افزایش تولید اسید سیتریک توسط جدایه‌های جهش یافته‌ی بومی *آسپرژیلوس نایجر*  
سید محمد رضا خوشرو..... ۴۶
- بررسی تنوع گونه‌های گیاهی در طول گرادیان ارتفاعی کوه نوا، کرمانشاه  
محمد مهدی دهشیری..... ۶۱
- کاربرد روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی احیای زیستی سلنات به نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp. Strain*  
TR-6  
عطیه سادات رضوی، پریسا تاجر محمد قزوینی، جواد حامدی..... ۷۵
- اثر سفیدبالک گلخانه‌ی *Trialeurodes vaporariorum* تیمار شده با قارچ *Beauveria bassiana* بر نمو، طول عمر و  
تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae)  
مرجان سیدی..... ۸۹
- افزایش مقاومت گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) به شوری خاک، تحت اثر تنظیم-کننده‌های سالیسیلیک اسید و  
پنکونازول  
فاطمه شکی، حسن ابراهیم زاده معبود، وحید نیکنام..... ۱۰۰
- بررسی عوامل محیطی موثر بر خصوصیات گلابی وحشی (*Pyrus syriaca Boiss*) در جنگل زردلان ایلام  
حجت اله فتحی، جعفر حسین زاده..... ۱۲۰

اصلاح جهشی به منظور افزایش توان تجمع کادمیوم در درختچه گز در مرحله کالوس

پروین کریمی، مینا تقی زاده، موسی سلگی.....۱۲۹

کاربرد بیوچار و اسید هیومیک برای مقاومت به تنش خشکی در گل آهار

سپیده کشاورز فرد، موسی سلگی، حسین باقری، ایمان شهر جردی.....۱۴۹



## ارزیابی کارایی شاخص‌های عملکرد چشم‌انداز (LFA) به منظور برآورد تنوع گیاهی در مراتع

### کیاسر مازندران

سیده محدثه احسانی<sup>۱</sup>، رضا تمرناش<sup>۲\*</sup>، غلامعلی حشمتی<sup>۳</sup>، اسماعیل شیدای کرکج<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۰

### چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی میزان کارایی روش LFA برای پیش‌بینی میزان شاخص‌های تنوع گونه‌ای می‌باشد. نمونه‌برداری بر روی صد و چهل لکه گیاهی و با استفاده از صد و چهل پلات یک مترمربعی در طول چهارده ترانسکت و به صورت تصادفی - سیستماتیک صورت گرفت. بر طبق دستورالعمل روش LFA، شاخص‌های نهایی نفوذپذیری خاک، چرخه‌ی مواد غذایی و پایداری خاک محاسبه شدند. برای تعیین تشابه بین شاخص‌های تنوع، پارامترهای سطحی خاک و شاخص‌های نهایی از آنالیز خوشه‌بندی، در محیط نرم‌افزار PAST استفاده گردید. نتایج نشان داد که در سطح یک درصد ( $P \leq 0.01$ ) شاخص تنوع شانون توسط پارامتر ارتفاع از سطح دریا، شاخص سیمپسون توسط پارامتر چرخه مواد غذایی و شاخص غنا توسط هر دو پارامتر ارتفاع از سطح دریا و چرخه مواد غذایی قابل پیش‌بینی می‌باشد. به نظر می‌رسد روش LFA با مورد نظر قرار دادن برخی از پارامترهای سطحی خاک و امتیازدهی به آن‌ها می‌تواند شاخص‌هایی نهایی ایجاد نماید که عملکرد اکوسیستم را نمایش دهند.

**واژه‌های کلیدی:** پارامترهای سطحی خاک، چرخه‌ی عناصر غذایی، شاخص غنا، لکه‌گیاهی

### مقدمه

پوشش گیاهی از منابع حساس اکوسیستم‌ها است و تحت تأثیر عوامل محیطی از قبیل اقلیم، خاک و پستی و بلندی قرار می‌گیرد و نابودی آن‌ها خسارات جبران‌ناپذیری را برای نسل‌های کنونی و آینده در پی خواهد داشت (Ludwig & Tongway, 1995؛ Heidarian *et al.*, 2011). برای اعمال مدیریت علمی و صحیح بر اکوسیستم‌های مرتعی، داشتن اطلاعاتی از اکوسیستم به عنوان شاخص‌های سلامت و کارکرد اکوسیستم مورد نیاز است. از آنجایی که یک اکوسیستم مرتعی سیستمی پیچیده به شمار می‌رود، جای شگفتی نیست اگر نتوان به آسانی شاخص‌های مناسب اکولوژیکی را یافت که اطلاعات منسجمی را درباره وضعیت

۱- دانشجوی دکتری علوم مرتع، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

\* (نویسنده مسئول: reza\_tamartash@yahoo.com)

۳- استاد، گروه مدیریت مرتع، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

یا سلامتی اکوسیستم به‌دست دهد (Tongway & Smith, 1989). روش تجزیه و تحلیل عملکرد چشم‌انداز طبیعی (LFA) که توسط Tongway و Hindley (2004) ارائه گردید، یک شیوه‌ی ارزیابی کیفی پتانسیل و توانمندی اکوسیستم‌های طبیعی است و برای تعیین عملکرد اکولوژیکی (عکس‌العمل گیاهان و زیستگاه)، استفاده می‌شود.

این شیوه از شاخص‌های متعدد مربوط به سطح خاک که به سرعت نیز در عرصه قابل اندازه‌گیری می‌باشد، مانند پوشش سطح خاک، پوشش یقه گیاهان، پوشش و منشاء لاشبرگ، پوشش نهانزادان، میزان شکنندگی پوسته، شدت و نوع فرسایش، مواد رسوبی و پستی و بلندی سطح خاک تشکیل شده است و در اقلیم‌های مختلف، شامل مناطق خشک مراتع استرالیا (Karfs, 2002)، (Ludwig & Tongway, 1995) (Tongway & Hindley, 2003) و همچنین جنگل‌های مجاور استوا با میزان بارش سالیانه ۴۰۰ میلی‌متر (Toranjzar et al. 2009) در ارزیابی مرتع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از سویی تنوع گیاهی مراتع نیز به عنوان یک اصل در برقراری پایداری اکوسیستم‌ها مطرح می‌باشد. با توجه به اینکه اطلاع از شاخص‌های تنوع در مرتع با اهمیت می‌باشد، لذا اکولوژیست‌ها به دنبال روش‌هایی می‌گردند که به طور سریع از وضعیت مرتع آگاهی یابند. این روش اثر فعالیت‌های مدیریتی را بر اساس ویژگی‌های عملکردی مرتع از قبیل نفوذپذیری، چرخه‌ی مواد غذایی و پایداری خاک، پایش می‌کند (Tongway et al., 1989). چراغیان و همکاران (۱۳۹۷) با استفاده از روش LFA، تاثیر عملیات اصلاحی مختلف بر شاخص‌های اکولوژیک سطح مرتع را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در اثر فعالیت‌های مدیریتی اعمال شده در مرتع، شاخص‌ها و ویژگی‌های کارکردی مرتع تغییر یافته‌اند. بطوریکه سه مشخصه کارکردی (پایداری، نفوذپذیری و چرخه عناصر غذایی) در قطعات مورد بررسی تفاوت معنی‌دار نشان دادند. Yari و همکاران (2012) به بررسی شاخص‌های سطح خاک و ویژگی‌های عملکردی مرتع با استفاده از روش تحلیل عملکرد چشم‌انداز در مراتع سرچاه‌های بزرگ پرداختند. نتایج نشان داد که بین تمامی یازده شاخص سطح خاک به جز شکل‌های فرسایش و پوشش کریپتوگام<sup>۱</sup>، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بنابراین بین سه شاخص عملکردی مرتع در سه منطقه مذکور نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین روش LFA توسط محققان بسیاری در کشور ایران، برای بررسی و تجزیه و تحلیل اکوسیستم‌های مرتعی (Abedi, & Arzani, 2004) و (Soudi, 1993) و بررسی تأثیر فعالیت‌های مدیریتی بر روی ویژگی‌های سلامت مرتع، ویژگی عملکردی پایداری خاک و رویشگاه مورد استفاده قرار گرفته است و سلامت گیاهان را نیز با استفاده از شاخص‌های اکولوژیک برآورد نمودند. Ehsani و همکاران (2015) در بررسی اثر برخی از عوامل محیطی بر پراکنش گونه‌ای با استفاده از روش تجزیه و تحلیل عملکرد چشم‌انداز (LFA)<sup>۲</sup> نیز به این نتیجه دست یافتند که ارتفاع از سطح دریا، پایداری خاک و درصد شیب مهمترین فاکتورهای تاثیرگذار بر پراکنش پوشش گیاهی می‌باشند. از طرفی تنوع زیستی از مفاهیم مهم در بوم‌شناسی است و نقش مهمی در سلامت، تولید و ارزیابی اکوسیستم دارد اما

<sup>1</sup> Cryptogam cover

<sup>2</sup> Landscape Function Analysis (تجزیه و تحلیل عملکرد چشم‌انداز)

هنوز میزان درک اهمیت تنوع زیستی جزئی است و به تحقیقات علمی بیشتری نیاز دارد (Mesdaghi & Rashtian, 2005) و (Meymandi nezhad, 1992). بر اساس عقیده‌ی بسیاری از محققین تنوع گونه‌ای بالا، معادل پایداری سامانه‌های اکولوژیک در نظر گرفته شده است (Fancy *et al.*, 2009).

از طرفی بیان شده است که پایداری و سلامت اکوسیستم طبیعی وابسته به غنا و تنوع گونه‌ای است و با تخریب زیستگاه‌های طبیعی، تنوع بیولوژیکی و به تبع آن غنای گونه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین حفظ تنوع زیستی در اکوسیستم‌های طبیعی جزء اهداف نهایی مدیریت منابع به شمار می‌آید (Ghahraman *et al.*, 2001). شاخص‌های وضعیت سطح خاک از فرایندهای زمین ریختی از جمله فرسایش، تشکیل پوسته خاک، تجزیه لاشبرگ و نیز بررسی همبستگی داده‌های مشاهده شده در عرصه یا اندازه‌گیری شده تحت شرایط کنترل بوجود آمدند و برای ارائه اطلاعات دقیق‌تر توسعه داده شدند (Karimzadeh *et al.*, 2012). مرور مطالعات انجام یافته در خصوص استفاده از روش LFA در ارزیابی مراتع نشان می‌دهد که این روش توانایی مناسبی در ارزیابی اکوسیستم‌های طبیعی و مخصوصاً مراتع دارد ولی سوالی که مطرح می‌شود این است که آیا روش LFA توانایی خوبی در پیش‌بینی تنوع گیاهی مرتع نیز دارد یا نه؟ بنابراین با توجه به استفاده گسترده از روش LFA، در این تحقیق سعی شده است تا شاخص‌های یازده‌گانه LFA و پارامترهای محیطی چون، ارتفاع از سطح دریا و درصد شیب نیز به عنوان پارامترهای کمکی مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود میزان کارایی این روش برای پیش‌بینی تنوع در این منطقه یا مناطقی با شرایط اکولوژیک، خاکی و اقلیمی مشابه چه قدر است و تا چه حد استفاده از روش LFA می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های مدیریتی مرتع مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایی که شاخص‌های سه‌گانه نهایی روش LFA شامل چرخه‌ی عناصر غذایی، نفوذپذیری و پایداری به عنوان شاخص‌های عملکرد بهتر اکوسیستم مطرح هستند و افزایش آنها در ارتباط مستقیم با بهبود پوشش گیاهی و شاخص‌های تنوع می‌باشند؛ لذا فرض تحقیق این است که شاخص‌های مذکور با شاخص‌های تنوع دارای ارتباط مستقیم معنی‌دار هستند.

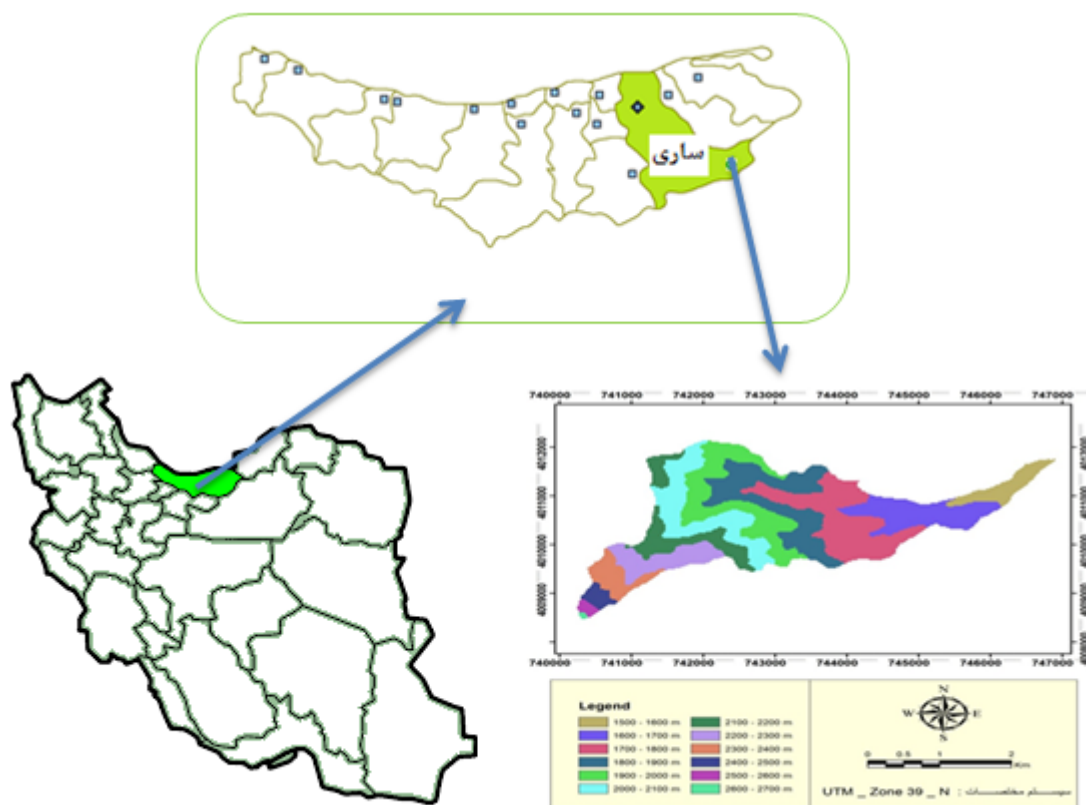
## مواد و روش‌ها

### منطقه‌ی مورد مطالعه

منطقه ولویه‌ی کیاسر با مساحتی معادل ۲۳۶۵ هکتار و با طول جغرافیایی  $40^{\circ} 53'$  تا  $44^{\circ} 53'$  شرقی و عرض جغرافیایی  $11^{\circ} 36'$  تا  $13^{\circ} 36'$  شمالی، در ۲۵ کیلومتری جنوب شرقی کیاسر واقع شده است. منطقه ولویه دارای آب و هوای نیمه خشک سرد می‌باشد و دارای حداقل ارتفاع ۱۴۰۰ و حداکثر ۲۵۰۰ متر از سطح دریای آزاد است. همچنین میزان بارندگی سالانه‌ی منطقه ۲۵۶/۵ میلی‌متر در سال است. میانگین درجه حرارت سالانه‌ی آن ۱۱/۶ درجه سانتی‌گراد و میانگین حداقل و حداکثر سالانه برابر ۳/۷ و ۱۹/۵ درجه سانتی‌گراد است. بافت خاک از نوع لومی می‌باشد و عمق آن در مناطق کم شیب و مسطح

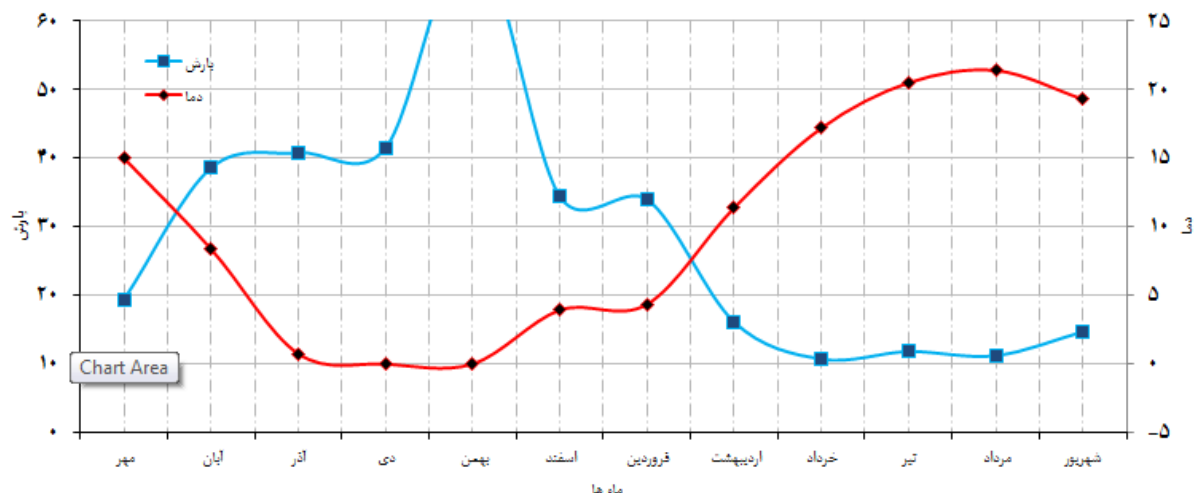
۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر و در ارتفاعات ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر همراه سنگ و سنگریزه است. همچنین متوسط شیب منطقه حدود ۲۵ درصد می‌باشد (Aghajashkori, 2013). نزدیکترین ایستگاه به منطقه‌ی مورد مطالعه، ایستگاه هواشناسی تلمادره در فاصله هفت کیلومتری از منطقه‌ی مورد نظر است. در این ایستگاه بیشترین میزان تبخیر در فصل تابستان و کمترین میزان تبخیر در زمستان رخ داده است. متوسط تبخیر فصلی ایستگاه تلمادره در تابستان ۵۸۸/۳۸ میلی‌متر و در زمستان ۱۲/۲۷ میلی‌متر است. همچنین بیشترین دمای متوسط ماهانه مربوط به مردادماه با ۲۱/۴۲ درجه و کمترین دمای متوسط ماهانه مربوط به بهمن ماه با ۳/۷۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

پوشش گیاهی منطقه بیشتر به صورت گندمیان<sup>۱</sup> و دارای گونه‌های گندمی همراه مانند *Festuca ovina* L. است. *Festuca arundinacea* Lilj, *Dactylis glomerata* L., *Lolium perenne* L., *Lolium rigidum* Gaudin.



شکل ۱: نقشه موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه

<sup>۱</sup> Grass



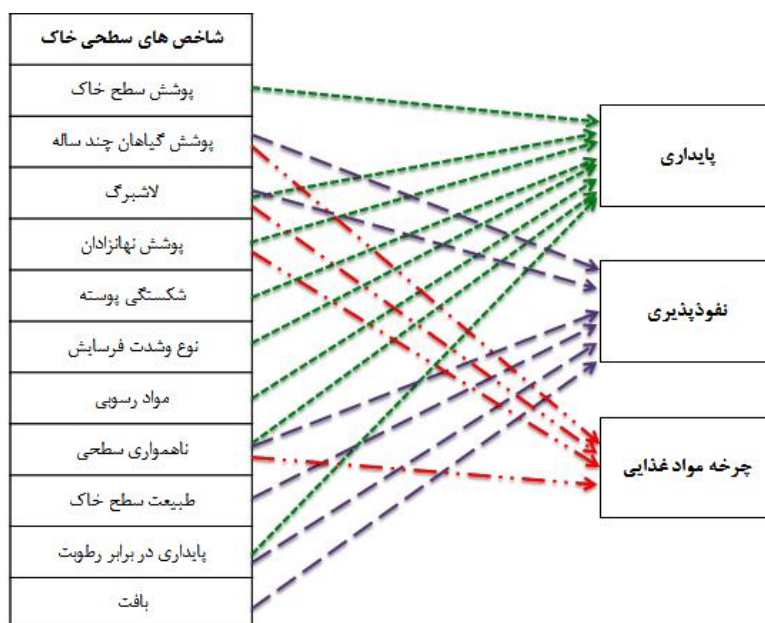
شکل ۲: منحنی آمبروترمیک ایستگاه هواشناسی تلمادره

### روش نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در منطقه مورد مطالعه به صورت تصادفی - سیستماتیک و در امتداد شیب غالب منطقه، با استفاده از ۱۴۰ پلات یک متر مربعی در طول ۱۴ ترانسکت ۵۰ متری، به طوری که فواصل ترانسکت‌ها از یکدیگر ۲۰۰ متر بود، انجام گردید. با توجه به فرم غالب رویشی مرتع که عمدتاً گندمیان بود و نیز درصد بالای پوشش گیاهی براساس منابع علمی و روابط آماری توصیه شده برای مراتع (اوشیب نتاج و همکاران، ۱۳۹۰ و آقاسی و همکاران، ۱۳۸۵)، اندازه پلات یک متر مربعی و ترانسکت ۵۰ متری در نظر گرفته شد و برای تعیین تعداد پلات مورد نظر از رابطه  $N = \frac{t^2 s^2}{d^2}$  استفاده شد که در آن N: اندازه نمونه، t: جدول استیودنت با توجه به درجه آزادی (df = n-1) و  $\alpha = 5\%$  و d: خطای تخمین می‌باشد.

ضمن اینکه به شروط مطرح در روش رگرسیون نیز توجه شد، این روش نقش اصلی تعیین‌کننده در تعداد مشاهده و یا نمونه در این تحقیق را داشته است. از آنجایی که فرم غالب رویشی در مرتع گندمیان بود و سایر فرم‌های رویشی فراوانی کمتری داشتند لذا فرم رویشی غالب به عنوان لکه‌های غالب مورد نظر ثبت داده‌ها قرار گرفت. برای این منظور بر روی هر ترانسکت، طول و عرض قطعات اکولوژیک فرم رویشی علف گندمی و فضای بین لکه‌ای شامل خاک لخت اندازه‌گیری شد. از هر یک از این قطعات تعداد پنج تکرار تعیین و ۱۱ پارامتر خاک سطحی شامل پوشش سطح خاک (پوشش سطحی مانع از تخریب خاک توسط جریان سطحی، شامل ۵ طبقه)، پوشش یقه‌ی گیاهان (درصد پوشش تاجی و طوقه‌ای، شامل چهار طبقه)، پوشش و منشأ لاشبرگ (درصد بقایای گیاهان قابل تبدیل به هوموس، شامل شش طبقه)، پوشش نهانزادان (جلبک‌ها، خزه‌ای‌ها، قارچ‌ها و سرخس‌ها، شامل چهار طبقه)، میزان شکنندگی پوسته (ارزیابی شکنندگی سله سطح خاک، شامل چهار طبقه)، شدت و نوع فرسایش (ارزیابی فرسایش و هدر رفت خاک و شدت فعالیت، شامل چهار طبقه)، مواد رسوبی (ارزیابی مواد پوشش‌دار، شامل چهار طبقه)، پستی و بلندی سطح خاک (ارزیابی پستی بلندی‌های کوچک سطح خاک، شامل پنج طبقه)، طبیعت سطح خاک

(استحکام لایه سطحی خاک در مقابل ضربه‌های وارده از قبیل فشار سم دام و ضربه قطرات باران، شامل پنج طبقه)، آزمون پایداری در برابر رطوبت (ارزیابی توانایی سله سطح خاک در مقابل رطوبت، شامل چهار طبقه) و بافت خاک (تعیین بافت خاک تا عمق پنج سانتی‌متر از طریق لمس کردن، شامل چهار طبقه) طبق دستورالعمل (Tongway *et al.*, 1989) ارزیابی و امتیازدهی شدند. در شکل ۱ شاخص‌های سطحی خاک، برای بررسی ویژگی‌های عملکردی پایداری خاک، نفوذپذیری و چرخه‌ی مواد غذایی خاک بر اساس روش تحلیل عملکرد چشم‌انداز آورده شده است (شکل ۱).



شکل ۳: شاخص‌های سطحی خاک و مشارکت آنها در تبیین ویژگی‌های عملکردی مرتع (Tongway & Hindly, 2004)

سپس مقادیر مولفه‌های مختلف تنوع گونه‌ای با استفاده از شاخص غیرهمگنی شانون (رابطه ۱)، شاخص یکنواختی سیمپسون (رابطه ۲) و شاخص غنای گونه‌ای نیز از طریق شمارش تعداد گونه گیاهی برای کل منطقه مورد مطالعه محاسبه گردید (Magurran, 2004).

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad \text{رابطه ۱}$$

$$H = \sum_{i=1}^s \frac{P_i^2}{s} \quad \text{رابطه ۲}$$

S: تعداد گونه، n: فراوانی افراد در نمونه و  $n_i$  فراوانی افراد در گونه  $i$  می‌باشد. همچنین  $P_i$ : نسبت افراد یا وفور گونه  $i$  ام که بر حسب نسبتی از کل پوشش بیان می‌شود.  $\ln$  لگاریتم.

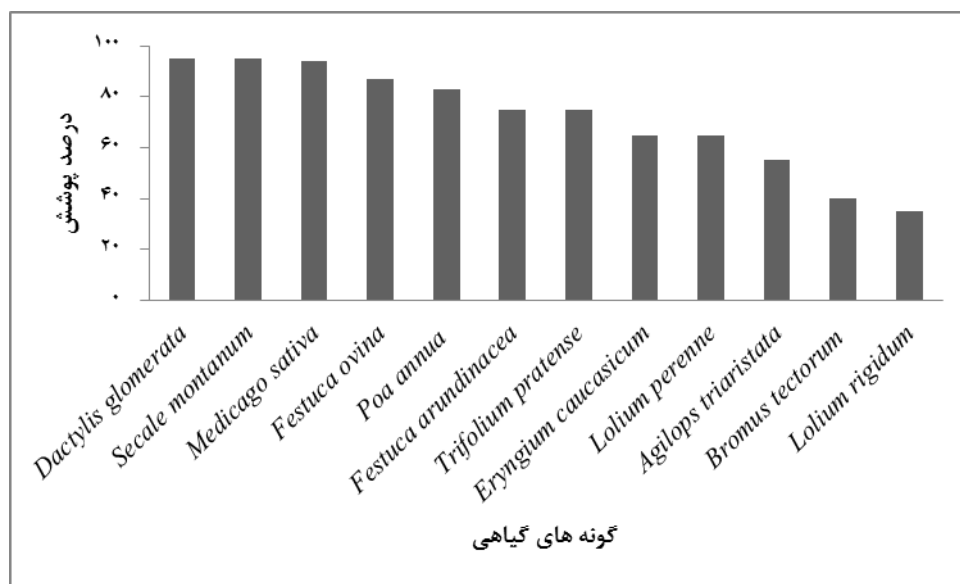
### تجزیه و تحلیل آماری

سه ویژگی عملکردی شامل پایداری، چرخه‌ی عناصر غذایی و نفوذپذیری، با استفاده از نرم‌افزار LFA بر اساس داده‌های حاصل از نمونه‌برداری صحرائی برای صد و چهل لکه گندمی به‌دست آمد. پس از در نظر گرفتن شروط لازم نظیر هم‌خطی

نداشتن پارامترهای مستقل، نرمال بودن متغیرهای وابسته، همگن بودن باقیمانده‌ها و نرمال بودن توزیع خطاها از رگرسیون گام به گام برای بررسی ارتباط بین شاخص‌های مختلف تنوع و غنا با پارامترهای نفوذپذیری، چرخه عناصر غذایی، پایداری، ارتفاع و شیب در محیط نرم‌افزاری Minitab نسخه ۱۶ استفاده شد. همچنین برای تعیین سطح تشابه و اینکه کدام یک از شاخص‌های تنوع و غنا با شاخص‌های سطحی خاک و در نهایت شاخص‌های نهایی LFA در بالاترین سطح تشابه و در یک گروه قرار می‌گیرند، از آنالیز خوشه‌بندی با روش ward و فاصله اقلیدوسی در محیط نرم‌افزاری PAST استفاده گردید. خاطر نشان می‌سازد انجام رگرسیون با استفاده از صد و چهل مشاهده که همان داده‌های لکه‌ها بود، صورت پذیرفت.

## نتایج و بحث

در مجموع هفتاد و هشت گونه‌ی گیاهی از بیست تیره در منطقه‌ی مورد مطالعه که دارای پوشش مرتعی می‌باشد، شناسایی شده است. خانواده‌های *Poaceae* با بیست و سه درصد، *Leguminosae* با نوزده درصد، *Labiatae* با چهارده درصد، *Compositae* با یازده درصد و *Rosaceae* با پنج درصد بیشترین فراوانی را در منطقه‌ی مورد مطالعه داشتند. با توجه به شکل ۲ بیشترین درصد پوشش گیاهی مربوط به گونه‌های *Dactylis glomerata* و *Secale montanum* با نود و پنج درصد پوشش و کمترین درصد پوشش مربوط به گونه‌ی *Lolium rigidum* با سی و پنج درصد پوشش می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴: درصد پوشش برخی گونه‌های غالب موجود در منطقه

نتایج حاصل از آماره‌های توصیفی نشان می‌دهد که ارتفاع از سطح دریا و شیب با میزان ۲۰۶/۲۷ و ۱۴/۴۰ به ترتیب دارای بیشترین میزان انحراف معیار می‌باشد و پس از آن پارامترهای مربوط به پایداری خاک و نفوذپذیری خاک قرار دارند.

همچنین در بین شاخص‌های سطحی خاک، قطعه‌ی اکولوژیک خاک لخت و شاخص پوشش نهانزادان با ۰/۶۵، دارای کمترین میانگین می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج آماره‌های توصیفی داده‌ها در منطقه‌ی مورد مطالعه

S.D	S.e	Mean	Parameters	S.D	S.e	Mean	Parameters
1.03	0.08	2.17	bs.SS	0.92	0.07	2.58	Shannon
1.20	0.10	3.16	bs.SR	0.26	0.02	0.26	Simpson
0.92	0.07	1.70	bs.ST	1.63	0.13	3.73	Richness
1.22	0.10	2.32	bs.TE	206.27	17.42	1850.2	El
1.97	0.08	3.23	veg.SC	14.40	1.21	3.92	Sl
0.82	0.07	2.57	veg.CC	6.58	0.55	49.11	St
0.32	0.02	1.12	veg.LC	3.31	0.28	25.25	In
0.76	0.06	1.80	veg.CRY	2.74	0.23	18.10	Nu
1.29	0.10	1.97	veg.CRU	0.69	0.05	1.40	bs.SC
1.04	0.08	2.95	veg.ER	0.57	0.04	1.26	bs.CC
0.16	0.01	3.97	veg.DE	0.16	0.01	1.02	bs.LC
0.85	0.07	2.47	veg.SS	0.84	0.07	0.65	bs.CRY
0.89	0.07	3.62	veg.SR	0.83	0.07	1.82	bs.CRU
0.98	0.08	2.08	veg.ST	0.77	0.06	1.63	bs.ER
0.87	0.07	3.05	veg.TE	0.39	0.03	3.93	bs.DE

Shanon: شاخص شانون؛ Simpson: شاخص سیمپسون؛ Richness: شاخص غنا؛ El: ارتفاع؛ Sl: شیب؛ St: پایداری؛ In:

نفوذپذیری؛ Nu: چرخه عناصر غذایی؛ Bs.SC: پوشش سطح خاک در خاک لخت؛ Bs.CC: پوشش گیاهان چند ساله در خاک لخت؛ Bs.Lc: پوشش لاشبرگ در خاک لخت؛ Bs.CRY: پوشش نهانزادان در خاک لخت؛ Bs.CRU: شکستگی پوسته در خاک لخت؛ bs.ER: نوع و شدت فرسایش در خاک لخت؛ bs.DE: مواد رسوبی در خاک لخت؛ bs.SS: ناهمواری سطحی در خاک لخت؛ bs.SR: طبیعت سطح خاک در خاک لخت؛ bs.ST: پایداری در برابر رطوبت در خاک لخت؛ bs.TE: بافت در خاک لخت؛ veg.SC: پوشش سطح خاک در فرم رویشی گندمی؛ veg.CC: پوشش گیاهان چند ساله در فرم رویشی گندمی؛ veg.LC: پوشش لاشبرگ در فرم رویشی گندمی؛ veg.CRY: پوشش نهانزادان در فرم رویشی گندمی؛ veg.CRU: شکستگی پوسته در فرم رویشی گندمی؛ veg.ER: نوع و شدت فرسایش در فرم رویشی گندمی؛ veg.DE: مواد رسوبی در فرم رویشی گندمی؛ veg.SS: ناهمواری سطحی در فرم رویشی گندمی؛ veg.SR: طبیعت سطح خاک در فرم رویشی گندمی؛ veg.ST: پوشش لاشبرگ در فرم رویشی گندمی؛ veg.TE: بافت خاک در فرم رویشی گندمی، S.D انحراف معیار؛ S.e اشتباه از معیار

نتایج رگرسیون گام به گام در جدول ۳ بین شاخص تنوع شانون و پنج پارامتر نهایی (ارتفاع، شیب، پایداری، نفوذپذیری و چرخه عناصر غذایی) نشان می‌دهد در سطح اطمینان یک درصد، ۳۳ درصد تغییرات شاخص تنوع شانون توسط پارامتر ارتفاع قابل پیش‌بینی و تبیین است. در خصوص بقیه پارامترهای پنج گانه، مشاهده می‌شود که وارد مدل نهایی رگرسیون گام به گام نشده‌اند. علاوه بر این در سطح اطمینان یک درصد، ۱۸ درصد تغییرات شاخص سیمپسون توسط پارامتر Nu (چرخه عناصر غذایی) قابل پیش‌بینی است و پارامترهای (ارتفاع، شیب، پایداری و نفوذپذیری) وارد مدل نهایی رگرسیون گام به گام نشده‌اند. رگرسیون گام به گام نشان می‌دهد مدل برآورد میزان غنا در دو مرحله انجام شده‌اند و در مرحله نهایی مشخص شده است در سطح اطمینان یک درصد، ۳۰ درصد تغییرات شاخص غنا توسط پارامتر ارتفاع (El) و چرخه‌ی عناصر غذایی (Nu) قابل پیش‌بینی است. پارامترهای (شیب، پایداری و نفوذپذیری) وارد مدل نهایی رگرسیون گام به گام نشده‌اند. همچنین با توجه به ضرایب بتای



استاندارد مشاهده می شود نقش ارتفاع با مقدار ۰/۲۹ در پیش بینی میزان شاخص غنا بیشتر از نقش شاخص Nu با مقدار ۰/۱۶ می باشد (جدول ۳).

جدول ۲: پارامترهای رگرسیون گام به گام بین شاخص های تنوع و پارامترهای نهایی LFA

t- value	Sig	F	R adjusted	R	Beta	B	Parameters	Diversity and Richness index
-0.35	0.72					-0.23	Constant	Shannon index
4.22	0.00	17.81	0.3	0.33	0.33	0.01	Elevation	
-0.35	0.72					-0.05	Constant	Simpson index
2.17	0.03	4.73	0.16	0.18	0.18	0.01	Nutrient cycle	
-1.41	0.15					-2.32	Constant	Richness index
3.53	0.001	10.18	0.25	0.30	0.29	0.01	Elevation	
1.97	0.05	7.16			0.16	0.09	Nutrient cycle	

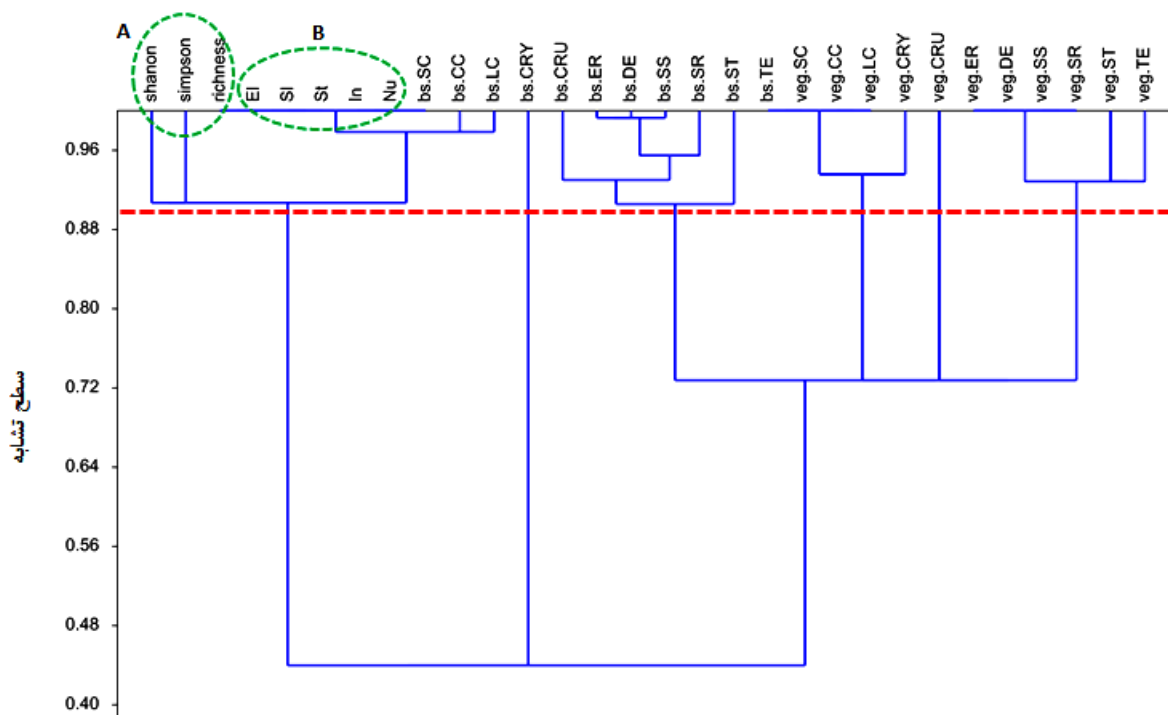
مدل رگرسیون نهایی برای هر یک از شاخص های تنوع به صورت زیر به دست آمده است:

$$\text{EL} = 0.002 \times \text{شاخص شانون}$$

$$\text{Nu} = 0.017 \times \text{شاخص سیمپسون}$$

$$\text{Nu} = 0.002 \times \text{EL} + 0.098 \times \text{شاخص غنا}$$

با توجه به نمودار خوشه بندی حاصله مشاهده می شود شاخص های تنوع در سطح شباهت ۹۰ درصد (۰/۹) با شاخص های نهایی حاصل از LFA در یک خوشه قرار گرفته است (قسمت A و B شکل ۲). لذا به نظر می رسد روش LFA با مورد نظر قرار دادن برخی از پارامترهای سطحی خاک (شاخص های اولیه یازده گانه) و امتیازدهی به آنها می تواند شاخص های نهایی ایجاد نماید. این شاخص ها می توانند در نهایت عملکرد اکوسیستم را به خوبی نمایش دهند به طوری که شاخص های مذکور دارای بیشترین تشابه باشند. در این بین مشاهده می شود شاخص غنا نسبت به دو شاخص تنوع شانون و سیمپسون خیلی بهتر عمل کرده است و با شاخص های نهایی LFA در سطح بالایی از تشابه، گروه بندی و خوشه بندی می گردد. لذا می توان ادعا نمود شاخص های LFA می تواند در سطح بالایی از اعتماد، نماینده و بیانگر تنوع اکوسیستم باشد. لذا کاربرد روش LFA در طرح های پایش تنوع زیستی و مخصوصاً غنای گونه می تواند به عنوان یکی از روش های ارزیابی وضعیت سلامت و همچنین غنای گیاهی مرتع، مفید و کارا باشد. همچنین شاخص های bs.LC، bs.CC، bs.SC از شاخص هایی بوده اند که از لحاظ تغییرات با شاخص های نهایی LFA شباهت بالایی نسبت به سایر شاخص های اولیه امتیازدهی شده، دارند (شکل ۲).



شکل ۵: نتایج آنالیز خوشه بندی شاخص‌های اولیه امتیازدهی به فضای لکه و بین لکه در ارتباط به شاخص‌های مختلف تنوع

بهره‌برداری پایدار و درازمدت از مراتع و قضاوت در مورد تغییرات مرتع با توجه به اینکه مراتع عرصه‌ی گسترده‌ای از منابع طبیعی کشور هستند و دارای تنوع زیادی می‌باشند، ضرورت پیدا می‌کند. مطالعات عملکرد مرتع امکان قضاوت در مورد اثر فعالیت‌های مدیریتی را با استفاده از تعدادی شاخص‌های ساده فراهم نموده است (Toranjzar *et al.*, 2009). Wilson (1986) با توجه به سخت بودن ارزیابی مستقیم عملکرد مرتع، با استفاده از شاخص‌های سطح خاک در قالب مدل LFA می‌توان بر این مشکل فائق آمد. Pyke و همکاران (2002) و Tongway (2004) نیز به این موضوع اشاره کرده‌اند.

با وجود اینکه غنای گیاهی و تنوع گیاهی و یکنواختی به عنوان شاخص‌های سلامت اکوسیستم توسط محققان مختلف مطرح شده‌اند (Fancy *et al.*, 2009) اما شاخص‌های مذکور در مقایسه با شاخص‌های عملکردی و ساختاری در اکولوژی مراتع، مدل‌های اکولوژیکی حال و انتقال و مدل‌های ارزیابی سلامت مرتع کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Pellant *et al.*, 2005).

از طرفی با توجه به ضرایب بتای حاصل از رگرسیون گام به گام و با توجه به مدل حاصل از رگرسیون گام به گام می‌توان بیان نمود که ارتفاع از سطح دریا و چرخه‌ی مواد غذایی مهمترین عواملی بودند که بر شاخص‌های مختلف تنوع تاثیر داشتند. به‌طوری‌که در شاخص تنوع شانون پارامتر ارتفاع، شاخص تنوع سیمپسون پارامتر چرخه‌ی عناصر غذایی و در شاخص غنا ارتفاع و چرخه‌ی عناصر وارد مدل شدند. ارتفاع از سطح دریا، عوامل دیگر مانند اقلیم و حتی عوامل مربوط به خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به این که منطقه‌ی مورد مطالعه یک منطقه بیلاقی می‌باشد، می‌توان بیان نمود که عامل ارتفاع به طور مستقیم با تاثیر بر عوامل محیطی دیگر مانند میزان بارندگی و دما و به طور غیر مستقیم از راه تاثیر در تشکیل خاک بر

جامعه‌های گیاهی منطقه تاثیر می‌گذارد (Moghaddam, 2006). از طرفی در پی فشردگی خاک در اثر چرای دام، کاهش پستی و بلندی خاک و نیز کاهش پوشش گیاهی، سبب شده است نفوذپذیری در خاک کاهش یابد (Bridge *et al.*, 1983) و وارد مدل نهایی رگرسیون نشود. احتمالاً وجود پوشش کریپتوگام و لاشبرگ در سطح خاک سبب شده است که میزان عناصر غذایی خاک افزایش یابد و براساس شاخص سیمپسون و غنا وارد مدل نهایی رگرسیون شود.

یکی از عوامل مخرب و آسیب‌رسان به مراتع، حضور دام و چرای بیش از حد می‌باشد، به طوری که انجام اقدامات مدیریتی باعث تغییر در خصوصیات سطحی خاک و همچنین ویژگی‌های عملکردی مرتع می‌شود (عرب سربیزن و همکاران، ۱۳۹۵). در این رابطه ارزانی و همکاران (2008) چرای دام را عامل کاهش پایداری عنوان کردند و این عامل باعث عملکرد مشابه لکه‌های مختلف گیاهی با یکدیگر شده است. از طرفی با چرای بیش از حد در فصول پاییز و زمستان مقدار ناچیز گیاهان غیر خوشخوراک به جا مانده نیز چرای می‌شوند و درصد پوشش به شدت تنزل می‌یابد. Jori و همکاران (2009) نیز در مقایسه شاخص‌های تنوع و غنا در ارزیابی سلامت مراتع دریافتند، تنوع در اکوسیستم‌های مرتعی با وضعیت فقیر و یا خوب تا عالی کاهش می‌یابد و تنها در وضعیت متوسط با توجه به چرای سبک در این مراتع تنوع افزایش می‌یابد. همچنین Moridi و همکاران (2008) با مطالعه‌ی رابطه تنوع تولید و وضعیت در گراسلندها و بوته‌زارهای زاگرس به این نتیجه رسیدند که تغییرات تنوع، تغییرات پوشش را به دنبال خواهد داشت و چون تشخیص کمی وضعیت مرتع در درجه‌ی اول بر روی ترکیب پوشش گیاهی پایه‌گذاری شده است پس تنوع می‌تواند تا حدودی بیانگر وضعیت مرتع باشد. چرای شدید دام با کاهش پوشش گیاهی، از ورود بقایای گیاهی به خاک جلوگیری می‌کند، در نتیجه دینامیک ماده آلی خاک که یکی از مهمترین منابع تأمین کننده‌ی ازت، فسفر و گوگرد خاک در مرتع طبیعی به‌شمار می‌آید را تحت تأثیر قرار می‌دهد و هر گونه کاهش در ورود مواد آلی موجب اختلال در فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده می‌شود. به نحوی که با تغییر نوع و فرم گیاهان، به علت متفاوت بودن نوع و حجم ریشه‌ی گیاهان و ترشحات ریشه‌ای، ویژگی‌های شیمیایی خاک تغییر خواهد کرد (Heydarian *et al.*, 2011). لکه‌های گیاهی با کاهش میزان رواناب باعث افزایش نفوذ آب داخل خاک، رشد گیاهان و فعالیت بیولوژیکی به علت فعالیت میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Dawes-Gromadzki & Spain 2003). در این منطقه به نظر می‌رسد چرای دام تأثیر مخربی بر لکه‌های گیاهی گذاشته است. به طوری که Zhao و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی زمین آماری، تغییرپذیری خصوصیات خاک تحت شدت‌های چرای، کاهش کربن آلی خاک و از بین رفتن همگنی خصوصیات خاک را تحت چرای سنگین در مراتع استپی مونگولیا گزارش کردند.

با توجه به نمودار حاصل از خوشه‌بندی می‌توان دریافت که شاخص‌های تشابه شانون، سیمپسون و غنای گونه‌ای با شاخص‌های حاصل از LFA که شامل پایداری، نفوذپذیری و چرخه‌ی عناصر غذایی می‌باشد در سطح تشابه ۹۰ درصد در یک گروه قرار گرفته‌اند. با توجه به (شکل ۲) شاخص‌های تنوع در یک گروه قرار می‌گیرند و موقعیت یکسانی دارند که مربوط به پوشش گیاهی است و شاخص‌های حاصل از LFA نیز در یک گروه قرار می‌گیرند و می‌توانند به صورت مستقل نیز عمل کنند.

برای بررسی وضعیت مرتع باید علاوه بر شاخص‌های تنوع از شاخص‌های LFA نیز با توجه به اینکه در یک گروه بزرگتری قرار می‌گیرند، استفاده گردد. پارامترهای یازده‌گانه نیز در گروه مجزایی قرار گرفتند که اینها نیز یک جنبه از اکوسیستم و ساختاریافتگی را نشان می‌دهند. لذا از آنجایی که تعداد این پارامترها زیاد می‌باشد، می‌توان از آنها برای برآورد پارامترهای نهایی LFA شامل پایداری، نفوذپذیری و چرخه‌ی عناصر غذایی، استفاده نمود و با شاخص‌های تنوع در یک گروه قرار داد. به‌منظور برآورد شاخص‌های تنوع از پارامترهای نهایی LFA استفاده می‌شود. بنابراین می‌توان بیان نمود روش تجزیه و تحلیل عملکرد چشم‌انداز با در نظر گرفتن پارامترهای یازده‌گانه سطحی خاک، عملکرد اکوسیستم را به خوبی نمایش می‌دهد. همچنین شاخص غنا نسبت به دو شاخص دیگر با شاخص‌های نهایی حاصل از LFA (پایداری، نفوذپذیری و چرخه‌ی عناصر غذایی) در سطح بالایی از خوشه‌بندی قرار دارد که می‌تواند در سطح بالایی از اعتماد نماینده و بیانگر تنوع اکوسیستم باشد. پس می‌توان چنین بیان نمود که، استفاده از روش LFA و ارائه شاخص‌های سه‌گانه سطح خاک برای اکوسیستم مرتعی مورد مطالعه بیانگر وجود تشابه با شاخص‌های تنوع می‌باشد، بنابراین شاخص‌های LFA نماینده‌ی خوبی از تنوع گونه‌ای یک اکوسیستم است. همچنین کاربرد این روش آسان و عوامل ارزیابی سطح خاک ساده و سریع است و به خوبی اثر فعالیت‌های مدیریتی را براساس ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ارزیابی می‌کند که موید نظر (Arzani *et al.*, 2008)، (Tongway & Hindley, 2004) و (Wilson, 1986) می‌باشد.

## نتیجه‌گیری کلی

کاربرد روش LFA در طرح‌های پایش تنوع زیستی و مخصوصاً غنای گونه می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های ارزیابی وضعیت سلامت و همچنین غنای گیاهی مرتع مفید و کارا باشد. بنابراین ضمن اینکه شاخص‌های تنوع و غنا مفسر خوبی برای وضعیت سلامتی مراتع بیلاقی کیاسر می‌باشند، شاخص‌های تنوع شانون و سیمپسون نیز می‌توانند برای ارزیابی وضعیت اکوسیستم طبیعی برای مناطق مشابه در نظر گرفته شوند. لذا روش ارزیابی اکوسیستم طبیعی (LFA) می‌تواند الگوی ارزشمندی برای افزایش توانمندی متخصصین در دستیابی ساده‌تر به معرفی شاخص‌های کیفی یک عرصه مرتعی باشد.

## منابع

- آقاسی، م.ج.، بهمنیار، م.ع. و اکبرزاده، م. ۱۳۸۵. مقایسه اثرات قرق و پخش آب بر روی پارامترهای پوشش گیاهی و خاک در مراتع کیاسر استان مازندران. علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۳(۴): ۷۳-۸۴.
- اوشیب‌نجاج، م. شکرچی، ح. اکبرزاده، م. و کشاورزی، م. (۱۳۹۰). مطالعه ات اکولوژی گونه *Lolium rigidium* در استان مازندران. زیست‌شناسی گیاهی، ۳(۱۰): ۳۷-۴۶.

چراغیان، ع. دهداری، س. فرجی، م. و آریاپور، ع. (۱۳۹۷). بررسی تاثیر عملیات اصلاحی مختلف بر شاخص‌های اکولوژیک سلامت مرتع با استفاده از روش LFA. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان، ۲۵(۲): ۴۵۴ - ۴۶۴.

عرب سر بیژن، م. ابراهیمی، م. و آجرلو، م. (۱۳۹۵). بررسی شاخص‌های سطح خاک و ویژگی‌های عملکردی مرتع با استفاده از روش LFA. فصلنامه تحقیقات مرتع و بیابان، ۲۳(۲): ۳۷۳ - ۳۸۲.

Abedi, M., and Arzani, H., 2004. Determination of Rangeland Health Attributes by using Ecological Indicators: new approach in rangeland analysis and assessment. *Journal of Rangeland and Forest*, 56: 5-24.

Arzani, H., Abedi, M., Shahriyari, A. and GHorbani, M. 2008. Investigation of soil surface indicators changes and rangeland functional attributes and rangeland plow. *Researches range and Desert*. 14(1): 68- 79.

Aghajanashkori, P., 2013. Watershed comprehensive plan. B.SC. Thesis, Sari agriculture and natural resource. 104p.

Bridge, B. J., Mott, J. J. and winter, W. H., 1983. Improvement in soil structure resulting from sown Pastures on degraded areas in the dry savanna woodlands of northern Australia. *Australian Journal of Soil Research*, 21: 83-90.

Dawes-Gromadzki, T., and Spain, A., 2003. Seasonal Patterns in the Activity and Species Richness of Surface Foraging Termites (Isoptera) At Paper Baits in a Tropical Australian Savanna. *Journal of Tropical Ecology*, 19:1-8.

Ehsani, S. M. Heshmati, G. and Tamartash, R. 2015. Effect of some environmental factors on plant distribution using LFA method, *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 6(1): 62-68.

Fancy, s. G. Gross, j. E. and Carter. S. L. 2009. Monitoring the condition of naturalresources in US national parks. *Environmental Monitoring and Assessment* 151:161-174.

Ghahraman, A., Miravodi, H. and Zahedipour, H. 2001. Study of plant diversity in plant communication in Arak. 2th Congress of range and rangeland in Iran, University of Tehran, 523-532.

Heydarian, M., Naghipour, A., and Tavakkoli, H. 2011. Effect of grazing on vegetation and soils in rangeland Bojnord. 17: 243- 255.

Jori, M.H., Temzad, B., Shokri, M and Banihashemi, B. 2009. The comparison richness and diversity indictors on evaluation of mountain rangeland health (case study: Ramsar). *Journal of rangeland*, 2(4): 244- 356.

Karfs, R., 2002. Rangeland monitoring in tropical savanna grasslands, Northern Territory, Australia: relationships between temporal satellite data and ground data. Master's Thesis, Research School of Tropical Environment Studies and Geography, James Cook University, Townsville, Australia.

Karimzadeh A., Jafarian, Z. Ghorbani, J. and Akbarzadeh, M. 2012. Analysis of the relationship between speciesdiversity and environmental factors using multivariate analysis (Case Study: Sorkhdeh Rangelands of Semnan, Iran). *Journal of Range and Watershed Management*. 65(1): 131-143.

Ludwig, J.A., and Tongway, D.J. 1995. Spatial 2Irganization of landscapes and its function in semiarid woodlands, Australia. *Landscape Ecology* 10: 51-63.

Magurran, A.E. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Scientific, Oxford, 322 p.

Mesdaghi, M., and Rashtian, A. 2005. Study of Component floristic and species richness in yekkeh chenar summer rangeland of Golestan Province. *Journal of Agricultural science and natural resource*, 12(1):27-36.

- Meymandi nezhad, M., 1992. Ecological foundation. University of Tehran press, 808p.
- Moghaddam M.R., 2006. Ecology of terrestrial plant. University of Tehran Press, 701p.
- Moridi, T., Karami, P., Shokri, M and Jori, M.H. 2008. The relationship between diversity and production in Grassland and Shurnland. *Journal of rangeland*, 1: 1- 10.
- Pellant, M., P. Shaver, D.A. Pyke, and J.E. Herrick. 2005. Interpreting indicators of rangeland health, version 4. Technical Reference 1734-6, USDI, BLM, National Sci. And Tech Center, Denver, Colo. 21-Mar-02. 122p.
- Pyke, D.A., Herrick, J.E., Shaver, P.A., and Pellant, M. 2002. Rangeland health attributes and indicators for qualitative assessment. *J. Range Manage.* 55: 584-597.
- Soudi, P. 1993. Living treasure saving earth's threatened biodiversity. Department of the Environment, 53P.
- Tongway, D.J. and Hindley. N. 2003. Indicators of ecosystem rehabilitation success: stagetwo, verification of EFA indicators. Final report to the Australian center for miningenvironmental research. Produced by the center for mined land rehabilitation, University of Queensland, and Brisbane and CSIRO sustainable ecosystems. Canberra, Australia. 66p.
- Tongway, D.J. and Hindley, N.L. 2004. Landscape Function Analysis: Procedures for Monitoring and Assessing Landscapes with Special Reference to Mine Sites and Rangelands, Version 3.1. Published on CD by CSIRO Sustainable Ecosystems, Canberra, Australia, 158 p.
- Tongway, D.J. and Smith, E.L. 1989. Soil surface features as indicators of rangeland site productivity. *J. Aus. Range.*, (11): 15-20.
- Tongway, D.J., Ludwig, J.A., and Whitford, W.G. 1989. Mulga log mounds: fertile patches in the semi-arid woodlands of eastern Australia. *Australian Journal of Ecology* 14: 263-268.
- Toranjzar, H., Abedi, M., Ahmadi, A. and Ahmadi, Z.2009. Assessment of rangeland condition (health) in Meyghan desert of Arak. *Journal of Rangeland*, 3:259–271.
- Wilson. A.D. 1986. The monitoring of change in range land condition: A multivatic site potential approach. Pp: 517\_521 in *Range lands:A Resource under sieg*,proceeding of the second international Range Lands congress Australia Academy of science. p: 517\_521.
- Yari, R., Tavili, A. and Zare, S., 2012. Investigation on soil surface indicators and rangeland functional attributes by Landscape Function Analysis (LFA) (Case study: Sarchah Amari Birjand). *Iranian journal of Range and Desert Research*, 18(4): 624-636.
- Zhao, R., Zhou, H. Qian, Y.and Zhang, J. 2007. Interrelations between plant communities and environmental factors of wetlands and surrounding lands in mid and lower reaches of Tarim River. *Journal Applied Ecology*, 17(6): 955-60.

**Evaluation of the Efficiency of Landscape Function Analyze (LFA) to Estimate Plant Diversity  
in Kiasar rangeland of Mazandaran province of Iran**

**S. M. Ehsani<sup>1</sup>, R. Tamartash<sup>2\*</sup>, Gh. Heshmati<sup>3</sup>, E. Sheidai Karkaj<sup>4</sup>**

**Received:2019.2.2**

**Accepted:2019.9.1**

**Abstract**

This study aimed to evaluate the efficiency of the LFA method to predict the species diversity indices. Sampling was carried out using 140 plots of 1 m<sup>2</sup> along 14 transects based on a randomly-systematic design and so, the final indexes of soil infiltration, nutrient cycle and soil stability were calculated. Also, the cluster analysis was applied to determine the similarity among the diversity indices, soil surface parameters and final indices by using PAST software. The results showed that at the level of 1 percentage ( $P \leq 0.01$ ), the Shannon diversity and Simpson indice were predicted by altitude from the sea level and nutrient cycle parameter, respectively and, richness indice was predicted by these two parameters. It seems that the LFA method can create the final indices by considering and scoring some of the surface parameters of the soil (eleventh indices) and these indices can finally display the ecosystem's performance.

**Keywords:** Nutrient cycle, Patch , Richness index ,Soil surface parameters.

---

1- Ph.D. Candidate in Range Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2-Associate Professor, Department of Range and Watershed Management Sari Agriculture Science and Natural Resource University, Iran.

\*(corresponding author: reza\_tamartash@yahoo.com)

3-Professor, Department of Range Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4-Assistant professor, Department of Range and Watershed Management, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

## مطالعه‌ی قدرت مهاری ترکیبات بیس ایندولی سنتتیک بر فرآیند فیبریلاسیون آمیلوئیدی با

### استفاده از روش‌های شبیه‌سازی مولکولی

کاوه خدایاری<sup>۱</sup>، پرویز عبدالمالکی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۰

## چکیده

تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی به دلیل ایجاد بیماری‌هایی مانند آلزایمر، پارکینسون، و دیابت نوع ۲، مورد توجه محققان است. از جمله مهارکننده‌های مهم، حلقه‌های ایندولی می‌باشند. مطالعات تجربی بر روی دو نوع ترکیب بیس ایندولی نشان داده است که ترکیب بیس ایندولیل ۲-متیل فنیل متان (BI2MPM) مهارکننده‌ی فیبریلاسیون آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم است. اما ترکیب بیس ایندولیل ۳-نیترو فنیل متان (BI3NPM) قدرت مهاری چندانی ندارد. در این مطالعه با استفاده از روش‌های داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، میانکنش این دو لیگاند با پروتئین مدل شده‌ی آمیلوئیدی بررسی شد. روش داکینگ مولکولی تمایلی مشابه اما با جایگاه اتصال متفاوت برای دو لیگاند نشان داد. اما نتایج دینامیک مولکولی نشان داد که لیگاند BI2MPM با تخریب عمده‌ی ساختار بنای هسته‌های اولیه، موجب کاهش میانکنش بین آن‌ها و با افزایش تغییرات ساختاری در رشته‌های بتا باعث ناپایداری و توقف رشد فیبریل‌اسیون می‌گردد. اما ترکیب BI3NPM تغییرات اندکی بر ساختار هسته‌های فیبریلی اعمال می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری‌های آمیلوئیدی، حلقه ایندول، دینامیک مولکولی، ساختار بتا، میانکنش‌های پای.

## مقدمه

یکی از عمده‌ترین و مهم‌ترین حالات غیرطبیعی و غیرعملکردی پروتئین تجمع آن‌ها به صورت اشکال و خصوصیات منحصر به فرد است. طی این فرایند مولکول پروتئین ساختار طبیعی خود را طی فرآیندهای پیچیده‌ی تاشدن صحیح<sup>۳</sup>، برای عملکرد کاملاً اختصاصی از دست می‌دهد و به حالت غیرطبیعی در می‌آید. این مولکول‌های غیرطبیعی می‌توانند به هم متصل شوند و به سه شکل فیبریل (تجمعات منظم)، آمورف (تجمعات نامنظم) و الیگومرهای محلول درآیند. در این پروسه عوامل محرک فیزیکی و شیمیایی با ایجاد تغییرات جزئی در ساختمان پروتئین، قسمت‌هایی از آن را تغییر می‌دهند و یا تاخوردگی

۱- دانشجوی دکتری بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-استاد، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول (Parviz@modares.ac.ir)



اشتباهی را متحمل می‌شوند و آن را در جهت فرآیند تجمع<sup>۱</sup> هدایت می‌کنند. این ساختارهای تجمع یافته‌ی منظم پروتئینی، عموماً آمیلوئید<sup>۲</sup> نامیده می‌شوند. امروزه مطالعه‌ی تجمع غیرطبیعی پروتئین‌ها و تشکیلات آمیلوئیدی و همچنین مکانیزم‌های احتمالی تشکیل آنها به علت اهمیت آنها در درک و شناخت بسیاری از بیماری‌ها، مورد توجه محققان قرار گرفته است. از مهم‌ترین بیماری‌هایی که در ارتباط مستقیم با این نوع از اختلالات ساختاری پروتئین‌ها می‌توان به آن اشاره کرد بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون، و بیماری‌های دیگری چون آمیلوئیدوز سیستمیک و دیابت نوع ۲ هستند. نکته جالبی در مورد این نوع بیماری‌ها وجود دارد؛ پروتئین‌هایی که تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌دهند صرف‌نظر از اینکه دارای کدام نوع از ساختارهای دوم پروتئینی ( $\alpha$ ,  $\beta$  و یا ترکیبی از آنها) هستند در هنگام تجمع تبدیل به صفحات بتا می‌شوند. در مراحل بعدی پروتوفیلامنت‌ها از کنار هم قرارگرفتن این صفحات بتا، ایجاد می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود تشکیل کمپلکس‌های فراساختاری<sup>۳</sup> را به صورت فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌دهند که طویل و بدون شاخه‌اند و به صورت کلاف‌های در هم پیچیده درون یا بیرون سلول رسوب پیدا می‌کنند (Obici *et al.*, 2005; Chiti & Dobson, 2006; Buxbaum, 2003). علاوه بر قدرت بیماری‌زایی تجمعات آمیلوئیدی، به دلیل اینکه امروزه پپتیدها و پروتئین‌ها طیف وسیعی از داروها را تشکیل می‌دهند فرآیند تجمع پروتئین در مراحل مختلف تولید صنعتی این نوع از داروها اختلال ایجاد می‌کند (Shukla *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Dische *et al.*, 1998; Espargaro *et al.*, 2008). به عنوان مثال می‌توان به تخریب ساختار طبیعی و تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در هنگام نگهداری آن‌ها و یا مصرف طولانی مدت داروهای پروتئینی اشاره کرد (Kueltzo *et al.*, 2008). از این رو مطالعه روی ساختار پروتئین‌های مستعد تجمع و شرایط ایجاد آنها و نیز مهار آنها به منظور درمان بیماری‌های مرتبط، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. براساس مطالعات، شرایط ویژه‌ای مثل دمای بالا، فشار زیاد، pH پایین و یا حضور غلظت‌های ملایمی از حلال‌های آلی به واسطه‌ی جزئی ساختار پروتئین‌ها کمک می‌کنند و آنها را برای تجمع مستعد می‌سازند. تشکیل مولکول‌های فراساختاری تجمع یافته باعث آسیب و سمیت سلولی می‌گردند و به مرور، سلول را در جهت آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) پیش می‌برند (Jahn *et al.*, 2006; Tipping *et al.*, 2015).

امروزه راهکارهای درمانی و مهارکننده‌ی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بر روی ترکیباتی تمرکز کرده است که قادرند فرآیند تشکیل را مهار یا حداقل در آن تاخیر ایجاد کنند و یا باعث معکوس کردن این فرآیند شوند و بدین صورت راهکار درمانی برای بیمارهای مستعد تجمع، ایجاد نمایند (Abedini *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2014; Baranczak & Kelly, 2016). امروزه ابزارهای محاسباتی نیز به‌طور گسترده‌ای برای بررسی مشکلات ناشی از تجمع پروتئینی به کار گرفته شده‌اند. محدودیت‌های روشهای تجربی موجب ظهور نوآوری‌هایی در روش‌های محاسبات کامپیوتری شده و از ترکیب این دو روش درک عمیق‌تری از

<sup>1</sup> Aggregation

<sup>2</sup> Amyloid

<sup>3</sup> Super Structure

تغییرات ساختاری پروتئین‌ها و شناخت مکانیزم‌های مولکولی دخیل در فرآیند تجمع پروتئینی، حاصل شده است (Sharma *et al.*, 2006; Nguyen & Hall, 2006; Klimov & Thirumalai, 2004). در دهه‌ی اخیر مطالعات زیادی بر روی تجمع پروتئینی پپتیدهای کوتاه (Klimov & Thirumalai, 2004)، پپتیدهای با اندازه متوسط از جمله پپتید A $\beta$  (Buchete *et al.*, 2005)،  $\beta$  میکروگلوبولین (Park & Saven, 2006; Armen & Daggett, 2005; Deng *et al.*, 2006) و پروتئین‌های بزرگتر (DeMarco & Daggett, 2004) با استفاده از روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شده است.

در این میان انواع مختلف قطعات پپتیدی A $\beta$  به طور وسیعی با این روش‌ها بررسی شدند و پیش‌بینی‌های مفیدی برای درک مکانیزم تجمع آمیلوئیدی ارائه داده‌اند (Han & Wu, 2005; Nelson *et al.*, 2005). الگوریتم‌های اولیه‌ای که در دو دهه‌ی اخیر توسعه داده شده‌اند تنها با در نظر گرفتن خصوصیات فیزیکوشیمیایی آمینواسیدها (مانند تغییرات محتوی آب‌گریزی پروتئین یا تمایل به فرارگیری آمینواسیدها در ساختارهای دوم بتا که معماری اصلی فیبریل‌های آمیلوئیدی را تشکیل می‌دهند) قادر بودند که تمایل به تجمع پروتئین‌ها را در سطوح مختلف از جمله توالی، ساختار کلی پروتئین، نقاط مستعد تجمع و در نهایت در سطح ساختار سوم آمیلوئیدها بررسی کنند (Tiwari *et al.*, 2005; Chiti *et al.*, 2003).

در این میان، کیتی (Chiti, 2003) و همکاران اولین تلاش‌ها را برای بررسی ارتباط بین توالی پروتئین با میزان تمایل به تجمع انجام دادند. آن‌ها یک معادله خطی توسعه دادند که می‌توانست تغییرات بار کلی و هیدروفوبیسیته رزیدوهای جهش‌یافته نسبت به انواع طبیعی را اندازه‌گیری و از این طریق سرعت تجمع پروتئین‌ها را پیش‌بینی کند (Chiti *et al.*, 2003). بعد از آنها گروه کافلیش (Cafilisch, 2004) با توسعه‌ی بیشتر معادله، تاثیر عوامل دیگری مانند سطح ناحیه‌ی در دسترس، ممان دو قطبی و تغییرات آروماتیسیتیه رزیدوها را نیز در معادله در نظر گرفتند (Tartaglia *et al.*, 2004; Tartaglia *et al.*, 2005). این مدل‌ها قادر بودند نقش توالی پروتئین بر روی فرآیند تجمع را نسبتاً خوب پیش‌بینی کنند. مدل‌های دیگر مانند TANGO، به جای در نظر گرفتن پروتئین به صورت کلی، توانایی تجمع یک پپتید در درون پروتئین را مد نظر قرار دادند (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004). این الگوریتم میزان تمایل هر رزیدو را نسبت به فرارگیری در چهار حالت مارپیچ<sup>۱</sup>، دور<sup>۲</sup>، تاننده<sup>۳</sup> و تجمع‌یافته<sup>۴</sup> محاسبه می‌کند و بدین صورت قابلیت پیش‌بینی میزان تمایل تجمع را بهبود می‌دهد. این قابلیت بعدها در الگوریتم WALTZ با میزان خطای کمتری توسعه داده شد (Maurer-Stroh *et al.*, 2010). با وجود بهبود این مدل‌ها در توانایی پیش‌بینی میزان تمایل به تجمع در پروتئین‌های مختلف، هنوز یک سری از چالش‌ها به قوت خود باقی ماندند (Nelson *et al.*, 2005; Neudecker *et al.*, 2012). در ادامه‌ی این تلاش‌ها، روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی All-Atom توانستند خصوصیات اتمی دقیقی از

<sup>1</sup> Helix

<sup>2</sup> Turn

<sup>3</sup> Unfolded

<sup>4</sup> Aggregated

مراحل اولیه‌ی تجمع و بد تاشدگی پروتئین‌ها را آشکار سازند (Ding et al., 2005; Wang et al., 2009). این شبیه‌سازی‌ها با کمک قدرت محاسباتی کامپیوترهای امروزی اگرچه توانستند جزئیات دقیقی از میانکنش‌ها و تغییرات دینامیک اتم‌ها در مولکول‌های پروتئینی فراهم کنند اما در شبیه‌سازی سیستم‌ها در مقیاس‌های زمانی طولانی‌تر و پلی‌پپتیدهای بزرگتر دارای محدودیت بودند. برای مدل‌سازی چنین سیستم‌هایی در مقیاس زمانی بالا، یک مدل ساده‌سازی شده با نام Coarse-Grain Molecular Dynamics توسعه پیدا کرده است. در این روش چندین اتم با هم به صورت یک ذره در نظر گرفته می‌شوند و بدین صورت بار محاسباتی سیستم کاهش می‌یابد و امکان شبیه‌سازی در مدت زمان طولانی‌تری امکان‌پذیر می‌شود (Wu & Shea, 2011). امروزه روشهای مدل‌سازی Multi-Scale از قابلیت‌های هر دو روش All-atom و Coarse-grain برای انجام شبیه‌سازی‌های تجمع پروتئینی در مقیاس زمانی طولانی و با دقت بالا استفاده می‌کنند (Ayton et al., 2007; Tozzini, 2010; Brancolini & Tozzini, 2019).

در سال‌های اخیر ترکیبات مهارکننده‌ی مختلفی با استفاده از روشهای تجربی و شبیه‌سازی بررسی شده‌اند که با استفاده از مکانیزم‌های متفاوتی مانع از تشکیل فیبریل‌ها می‌شوند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند ترکیباتی که دارای بخش‌های حلقوی در ساختمان خود هستند می‌توانند با ایجاد تداخل در اندرکنش‌های پای-پای رشته‌های آمیلوئیدی، باعث مهار تشکیل و یا تجزیه آن‌ها گردند. این امر باعث شده است که مطالعات زیادی بر روی انواع ترکیبات با منشا گیاهی که عمدتاً دارای بخش‌های آروماتیک هستند، صورت گیرد. تاکنون تاثیر گیاهانی همچون زردچوبه، سیر، دارچین، جینکو، جینسینگ، چای سبز و ترکیباتی نظیر دوبوتامین، آپومورفین، کاتکسین، رسوراترول، اسید تانیک، کافئین و رزماریک اسید بر روی مهار فرآیند فیبریلاسیون مشخص شده است (Park et al., 2008; Gupta & Rao, 2007; Park & Kim, 2002; Chauhan, 2006; Tohda, 2006; Ko et al., 2007; Porat et al., 2006). گزارش‌های دیگری نیز مبنی بر اثر مهار ترکیبات آلی کوچک بر روی تشکیل فیبریل‌ها در پروتئین‌های مختلف وجود دارد. یکی از مهمترین این مولکول‌ها مشتقات ایندولی هستند که به دلیل خصوصیات آنتی آمیلوئیدی، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مشتقات ایندولی می‌توانند به پروتئین‌ها اتصال یافته و نوع ساختار و حتی گروه‌های عاملی متصل به آن‌ها می‌توانند در این اتصال اهمیت زیادی داشته باشند (Morshedi et al., 2007). با توجه به اهمیت حلقه‌های ایندولی و اثبات نقش آن‌ها در مهار فرآیند فیبریلاسیون آمیلوئیدی، رامشینی و همکاران چند نوع از ترکیبات سنتزی بیس ایندولی را که دارای دو حلقه ایندول و هر کدام دارای استخلاف‌های متفاوتی در ساختمان خود هستند بر روی فیبریلاسیون لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان پروتئین مدل بررسی کرده‌اند (Ramshini et al., 2016). اهمیت این مطالعه بدان جهت است که این ترکیبات هم از نظر دارا بودن دو حلقه ی ایندولی و هم از نظر تفاوت در گروه‌های عاملی مختلف متصل، بررسی شده‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که نوع و جایگاه هر استخلاف می‌تواند کاملاً بر میزان اثر مهارکنندگی آن و نحوه اندرکنش با پروتئین موثر باشد. در ادامه‌ی این مطالعه و در راستای بررسی دقیق‌تر نتایج تجربی بدست آمده، بر آن شدیم که با استفاده از ابزارهای

داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به بررسی دقیق‌تر مکانیزم احتمالی اثر این ترکیبات بر روی پروتئین مدل آمیلوئیدی پردازیم.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی فایل‌ها

در مطالعه‌ی انجام شده توسط رامشینی و همکاران، از پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL)<sup>۱</sup> استفاده شده که تحت شرایط دمایی بالا و pH پایین یک بازشدگی جزئی در ساختار اتفاق افتاده است و از این طریق وارد فاز تجمع می‌شود. بنای فضایی طبیعی این آنزیم (PDB code: 2VB1) یک بنای فضایی بتا-دور-بتا و شامل ۱۲۹ آمینواسید است که توالی ۱۶ رزیدویی ۴۹-۶۴ آن به شدت مستعد تجمع می‌باشد. به دلیل اینکه ساختارهای آمیلوئیدی متشکل از این آنزیم تاکنون کریستالوگرافی نشده‌اند لذا فایل PDB آن موجود نیست. بنابراین مدل هسته آمیلوئیدی با استفاده از چهار عدد توالی ۱۶ رزیدویی ۴۹-۶۴ این پروتئین که در حالت بنای فضایی  $\beta$  هستند به وسیله نرم افزارهای (VMD) Visual Molecular Dynamic v1.9 و AutoDock v4.0 و Discovery Studio Visualizer (DSV) v 16/1/0 تولید و بهینه شد. از این مدل به عنوان گیرنده<sup>۲</sup> در داکینگ مولکولی برای پیش‌بینی حالت‌های محتمل اتصال لیگاندها به هسته‌های مدل آمیلوئیدی استفاده شد (Ramazzotti *et al.*, 2016).

### تولید و بهینه‌سازی لیگاندها

لیگاندهای مطالعه شده توسط رامشینی و همکاران، ترکیبات بیس ایندولی دارای گروه‌های استخلافی مختلف هستند که ساختار پایه‌ای همه آن‌ها متشکل از دو حلقه ایندولی می‌باشند. این ترکیبات از واکنش جانشینی الکترون دوستی حلقه ایندول با آلدهیدهای حلقوی و یا استیل آلدهیدها تحت شرایط بدون حلال و با واکنش کاتالیزوری هتروفولیک اسید تولید می‌شوند (Tayebie *et al.*, 2013). از بین این ساختارها ترکیب شماره ۵ تحت عنوان بیس ایندولیل (۲-متیل فنیل) متان (BI2MPM) به عنوان لیگاند مهاری و ترکیب شماره ۳ تحت عنوان بیس ایندولیل (۳-نیترو فنیل) متان (BI3NPM) به عنوان لیگاند غیرمهاری در فرآیند فیبریلاسیون آمیلوئیدی انتخاب شدند. ساختار سه بعدی این دو لیگاند با استفاده از نرم افزار HyperChem v8.0.6<sup>۳</sup> طراحی و بهینه گردید.

<sup>1</sup> Hen Egg White Lysozyme

<sup>2</sup> Receptor

<sup>3</sup> HyperChem(TM) Professional 8.0, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

## داکینگ مولکولی

برای بررسی جایگاه‌های احتمالی اتصال لیگاندها به هسته‌های آمیلوئیدی، با استفاده از نرم افزار AutoDock Vina نسخه ۱,۱، داکینگ انجام شد (Trott & Olson, 2010). مرکز grid بر روی مرکز گیرنده تعریف شد و یک جعبه به حجم  $\text{\AA}^3$   $70 \times 70 \times 70$  برای پوشش کامل گیرنده، تعریف گردید. تنظیمات مربوطه بر روی تعداد ۱۰۰ حالت بنای فضایی تصادفی هر یک با ۱۰۰ حالت داک شونده‌ی مختلف و در محدوده انرژی  $\pm 3 \text{ kcal/mol}$  تنظیم گردید. ساختار گیرنده یا همان هسته‌های آمیلوئیدی به صورت صلب<sup>۱</sup> و لیگاندهای شماره ۵ و ۳ به ترتیب با سه و چهار پیوند قابل چرخش در نظر گرفته شد. این شبیه‌سازی بنای فضایی‌هایی از لیگاندها را که دارای بالاترین انرژی اتصال به پروتئین هستند، بر حسب واحد انرژی کیلوکالری بر مول مرتب می‌کند. این محتمل‌ترین بنای فضایی‌ها و رزیدوهای درگیر در پاکت اتصالی گیرنده از نظر نوع و خصوصیات میانکنش‌های موجود، مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفت.

## شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی بهترین حالت محتمل کمپلکس لیگاند-پروتئین بدست آمده از داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار گرومکس نسخه ۵,۱,۴ انجام شد (Abraham *et al.*, 2019). سپس در راستای الگوبرداری از مکانیزم ایجاد و رشد رشته‌های پروتوفیبریلی آمیلوئیدی، از کنار هم قرار دادن دو هسته آمیلوئیدی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای سه حالت هسته‌های آمیلوئیدی تنها، هسته‌های آمیلوئیدی+BI2MPM و هسته‌های آمیلوئیدی+BI3NPM انجام شد. میدان نیروی استفاده شده GROMOS54a7 (Schmid *et al.*, 2011) و مدل آب SPC<sup>۲</sup> (Berendsen *et al.*, 1981) انتخاب شد. فایل توپولوژی لیگاندها و بارهای جزئی اتم‌های آن‌ها با استفاده از سرور ATB<sup>۳</sup> (Malde *et al.*, 2011) تولید شد. دما به صورت تدریجی از صفر تا ۳۳۲ درجه کلون و به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه با استفاده از الگوریتم V-rescale افزایش یافت (Cheng & Merz, 1996; Parrinello & Rahman, 2008; Mor *et al.*, 2008; Lingeneil *et al.*, 2008). سپس با استفاده از الگوریتم Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981) در مدت زمان یک نانوثانیه فشار سیستم بر روی یک بار ثابت نگه داشته شد. میانکنش‌های الکترواستاتیک دوربرد به وسیله روش PME<sup>۴</sup> (Darden *et al.*, 1993) محاسبه گردید. الگوریتم LINCS (Hess *et al.*, 1997) برای اعمال محدودیت بر روی طول پیوندها اعمال شد. سیستم در یک جعبه دوازده وجهی قرار گرفته و در نهایت ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در جعبه محتوی آب و ۰,۱۵ میلی‌مولار از یون‌های سدیم و کلر برای خنثی‌سازی محیط جعبه شبیه‌سازی، استفاده

<sup>1</sup> Rigid

<sup>2</sup> The flexible three-site simple point-charge water model

<sup>3</sup> Automated Topology Builder

<sup>4</sup> Particle Mesh Ewald

شد. معادلات حرکت با الگوریتم Leap-frog (Van.Gunsteren & Berendsen, 1988) انجام شد. در انتهای شبیه‌سازی، تعداد ۱۰۰۰ فریم از سه حالت شبیه‌سازی انجام شده برای آنالیز انتخاب شد.

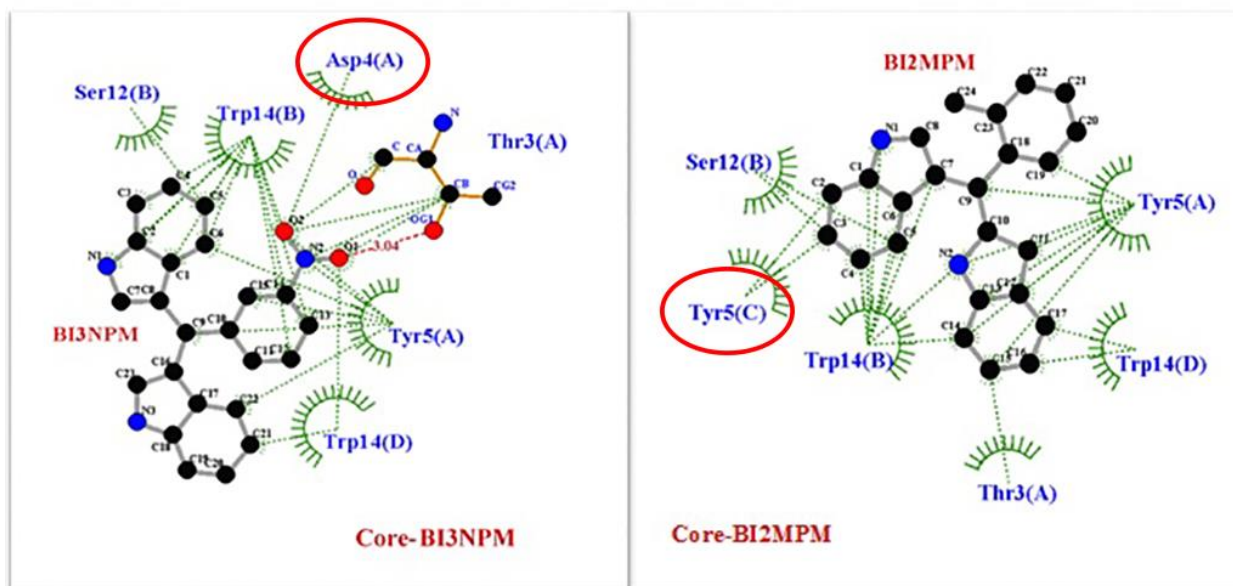
## نتایج و بحث

### نتایج داکینگ

در این پژوهش چنان‌که اشاره شد، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بر روی توالی مستعد تجمع ۴۹-۶۴ از پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ صورت گرفت. با تولید ساختار بتا به صورت ناموازی از ۴ رشته از این توالی آمینواسیدی که به عنوان پروتئین هدف یا هسته‌های اولیه آمیلوئیدی در نظر گرفته شدند، میزان تمایل هر کدام از لیگاندها و جایگاه ترجیحی اتصال آنها مورد بررسی قرار گرفت. پایین‌ترین انرژی اتصال به‌دست آمده برای لیگاند BI2MPM برابر  $-6/1$  kcal/mol و برای لیگاند BI3NPM برابر  $-6/5$  kcal/mol است. اگرچه انرژی اتصال این دو نوع لیگاند به پروتئین بسیار نزدیک به هم می‌باشد اما در آزمون‌های تجربی که برای بررسی مهار پروسه فیبریلاسیون آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم انجام شده است این دو نوع لیگاند رفتار کاملاً متمایزی از خود نشان داده‌اند. بدین‌صورت که لیگاند بیس ایندولیل (۲-متیل فنیل) متان یا به اختصار BI2MPM کاملاً پروسه تشکیل فیبریل‌ها را مهار می‌کند و لیگاند بیس ایندولیل (۳-نیترو فنیل) متان یا به اختصار BI3NPM فاقد هر گونه قدرت مهار کنندگی در فرآیند مذکور است. بنابراین مسلم است که علاوه بر انرژی اتصال صرف، عوامل دیگری نیز دخیل باشند. جایگاه اتصال هر دو لیگاند بر روی هسته شامل ناحیه‌ای با شش نوع رزیدو است که دو کمپلکس در یک نوع رزیدو با هم تفاوت دارند. رزیدوهای مشترک Thr3(A)، Tyr5(A)، Ser12(B)، Trp14(D) و رزیدوهای متفاوت در لیگاند BI2MPM، Tyr5(C) و در لیگاند BI3NPM، Asp4(A) است. در شکل ۱ نتایج به‌دست آمده از آنالیز با نرم‌افزار LigPlot (Laskowski & Swindells, 2011) به خوبی موقعیت آمینواسیدی اطراف لیگاندها را در دو نوع کمپلکس نشان می‌دهد. آنچه در این جا اهمیت دارد این است که لیگاند BI3NPM به دلیل داشتن گروه قطبی نیترو ( $\text{NO}_2$ ) تمایل بیشتری به میانکنش با رزیدوهای قطبی تر دارد. چنانچه که می‌بینیم برهمکنش با رزیدوی آسپارات شماره ۴ از رشته‌ی A که جزء آمینواسیدهای قطبی محسوب می‌شود یک پیوند هیدروژنی با طول پیوند ۳/۰۴ آنگستروم تشکیل داده است. این پیوند قطبی می‌تواند شاخص آب‌گریزی جایگاه اتصال را تا حدودی کاهش دهد. این شاخص با استفاده از ابزار Prot Param (Gasteiger *et al.*, 2005) از سرور ExPASy نیز محاسبه شد. رزیدوهای جایگاه اتصال لیگاند در کمپلکس پروتئین-BI2MPM و پروتئین-BI3NPM به ترتیب شامل TYSWYW و TDYSW هستند که مقدار شاخص GRAVY<sup>۱</sup> هر کدام به ترتیب با استفاده از ابزار Prot Param برابر ۰/۹۸- و ۱/۳۵- به‌دست آمد. عدد منفی پایین‌تر مربوط به رزیدوهای پاکت اتصالی در کمپلکس پروتئین-BI3NPM مویید این نکته است که خصوصیت آب‌گریزی کمتری نسبت

<sup>۱</sup> Grand average of hydrophobicity

به کمپلکس دیگر دارد. این امر به دلیل حضور آمینو اسید اسپارتیک اسید در آن جایگاه است که به طور ذاتی قطبی است و تمایل کمتری به حضور در محیط غیرقطبی دارد. بنابراین جایگاه اتصال لیگاند BI3NPM به پروتئین تا حدودی آب‌گریزی کمتری از لیگاند BI2MPM دارد و این به دلیل وجود گروه نیترو با یک اتم نیتروژن و دو اتم هیدروژن است که تمایل کمتری را به ایجاد میانکنش‌های آب‌گریز در این لیگاند القا می‌کند.



شکل ۱: جایگاه اتصال دو نوع لیگاند بر روی پروتئین مدل هسته‌ای آمیلوئیدی با استفاده از نرم افزار LigPlot ترسیم شده است. دو جایگاه اتصال در یک نوع رزیدو با هم اختلاف دارند که با دایره‌ی قرمز رنگ نشان داده شده است.

قبلا اشاره شد که ساختار هر دو لیگاند علاوه بر بخش حلقوی فنیلی و گروه استخلافی متفاوت متصل به آن، دارای دو گروه حلقوی ایندولی هستند که این گروه‌های ایندولی نقش مهمی در ایجاد میانکنش‌های آب‌گریز به خصوص میانکنش‌های آب‌گریز ناشی از الکترونهای پای این حلقه‌ها دارند. به طور کلی این میانکنش‌های کلیدی بین لیگاند و ماکرومولکول شامل پیوندهای هیدروژنی، فشردگی  $\pi$ - $\pi$  حلقه‌ها، میانکنش‌های  $\pi$ -کاتیون، اثرات آب‌گریز، پیوندهای هالوژنی و پل‌های نمکی هستند (Kukic & Nielsen, 2010; Neves-Petersen & Petersen, 2003). در ساختارهای حلقوی به دلیل چگالی الکترونی بالای ناشی از الکترون‌های اتم‌های تشکیل دهنده حلقه‌ها، انواع مختلفی از میانکنش‌ها از جمله میانکنش‌های فشردگی پای-پای<sup>۱</sup>، میانکنش‌های کاتیون-پای<sup>۲</sup>، میانکنش‌های آنیون-پای<sup>۳</sup>، میانکنش‌های پای-CH و غیره می‌توانند تشکیل شوند (McGaughey *et al.*, 1998). همچنین با وجود رزیدوهای دارای بخش‌های آروماتیک مانند فنیل آلانین، تایروزین و تریپتوفان در پروتئین‌ها، تشکیل میانکنش‌های ناشی از الکترون‌های  $\pi$  حلقه‌ها نقش مهمی در اتصالات برگشت‌پذیر با لیگاند ایفا می‌کنند. با بررسی میانکنش‌های فشردگی پای-پای در دو کمپلکس مورد مطالعه‌ی ما، می‌توانیم به نحوه‌ی شکل‌گیری و خصوصیات این نوع از

<sup>1</sup>  $\pi$ - $\pi$ -Stacking

<sup>2</sup> Cation- $\pi$  Interactions

<sup>3</sup> Anion- $\pi$  Interactions

میانکنش‌ها بین حلقه‌های لیگاندها با رزیدوهای حلقوی پروتئین دست یابیم. با استفاده از نرم افزار DSV<sup>۱</sup> انواع میانکنش‌های بین لیگاندها و پروتئین و موقعیت اتصالی بررسی شد. در جداول شماره یک و دو، نوع و خصوصیات میانکنش‌های بین لیگاندهای BI2MPM و BI3NPM با رشته‌های بتای مدل آمیلوئیدی آورده شده است. شکل ۲ نیز نمای شماتیکی از رزیدوهای درگیر در مدل هسته آمیلوئیدی با دو لیگاند و نحوه‌ی میانکنش آنها را نشان می‌دهد.

**جدول ۱: انواع میانکنش‌های ایجاد شده بین لیگاند مهاری BI2MPM با هسته‌ی پروتئینی و خصوصیات آنها. منظور از اتم دهنده و گیرنده، دو اتم شرکت کننده در یک میانکنش می باشد.**

گروه	نام پیوند	نوع پیوند	اتم دهنده	اتم گیرنده	طول پیوند	زاویه تتا*	زاویه گاما**
Lig-Trp14B	پیوند هیدروژنی	هیدروژن-Pi	H2-لیگاند	Trp14B-Pi	2/75	11/76	-
Lig-Tyr5A	آب‌گریز	Pi-Pi T-shaped	Tyr5A	لیگاند	5/85	25/49	75/34
Lig-Trp14B	آب‌گریز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	4/53	60/54	55/74
Lig-Trp14B	آب‌گریز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	5/29	27/48	71/63
Lig-Trp14B	آب‌گریز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	4/82	13/34	71/63

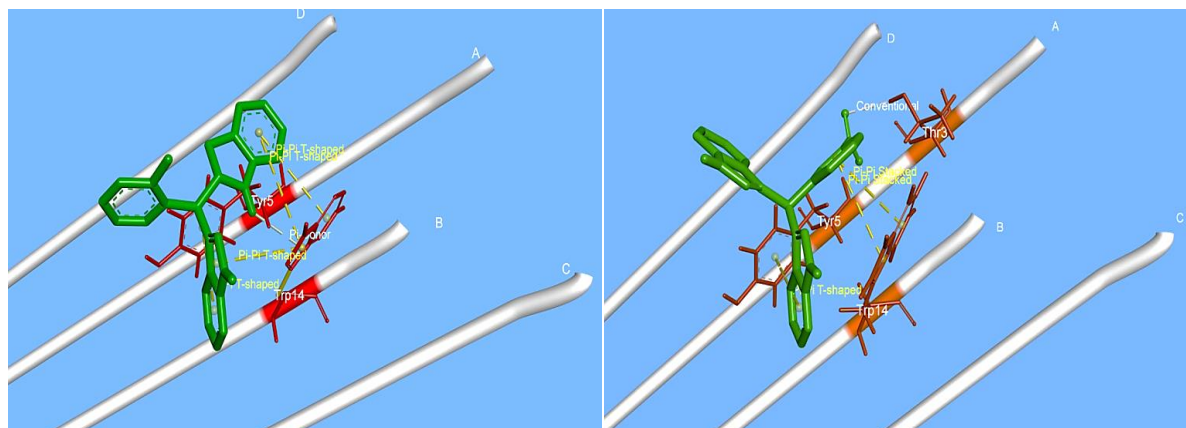
\*زاویه تتا( $\theta$ ) زاویه بین محور متصل کننده دو مرکز جرم با صفحه حلقه آروماتیک در پروتئین \*\*زاویه گاما( $\square$ ) زاویه بین دو صفحه آروماتیک

**جدول ۲: انواع میانکنش‌های ایجاد شده بین لیگاند مهاری BI3NPM با هسته‌ی پروتئینی و خصوصیات آنها**

گروه	نام پیوند	نوع پیوند	اتم دهنده	اتم گیرنده	طول پیوند	زاویه تتا	زاویه گاما
Lig-Thr3A	پیوند هیدروژنی	پیوند هیدروژنی	A:THR3:HG1	Ligand:O1	2/46	-	-
Lig-Trp14B	آب‌گریز	Pi-Pi Stacked	B:TRP14	لیگاند	4/54	35/2	28/03
Lig-Trp14B	آب‌گریز	Pi-Pi Stacked	B:TRP14	لیگاند	4/34	31.35	28/04
Lig-Tyr5A	آب‌گریز	Pi-Pi T-shaped	A:TYR5	لیگاند	5/21	28/12	66/16

<sup>1</sup> Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, [Discovery Studio Visualizer], [2016], San Diego)





شکل ۲: رزیدوهای درگیر و نحوه میانکنش آن‌ها با لیگاند BI2MPM (سمت چپ) و لیگاند BI3NPM (سمت راست) با هسته‌ی مدل آمیلوئیدی.

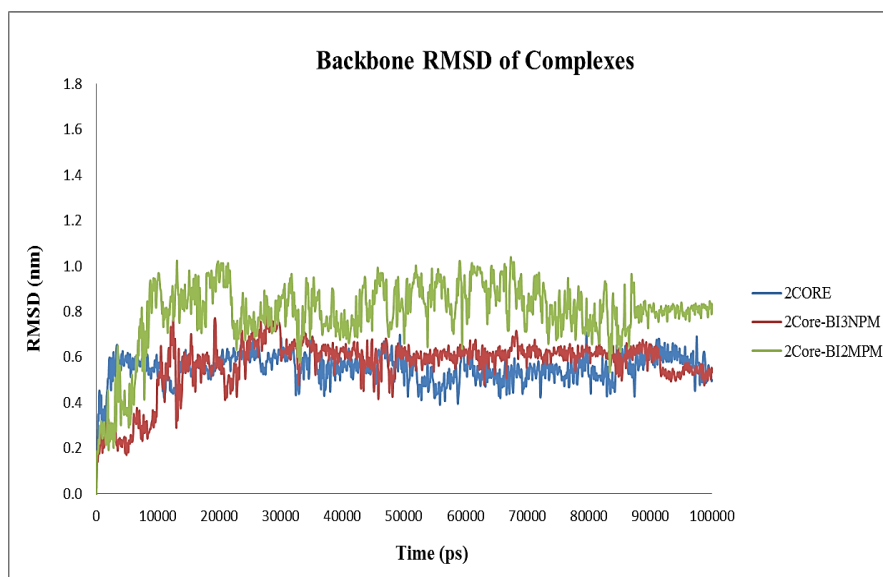
با توجه به جدول میانکنش‌ها و شکل ۲ مشخص می‌شود که لیگاند BI2MPM با برقرار کردن چهار میانکنش پای-پای از نوع T شکل با دو رزیدوی تیروزین شماره ۵ از رشته‌ی A و تریپتوفان شماره ۱۴ از رشته‌ی B و یک میانکنش هیدروژنی از نوع پای-هیدروژن با تریپتوفان شماره ۱۴ از رشته‌ی B به ساختار پروتئین اتصال یافته است. اما لیگاند BI3NPM با استفاده از استخلاف قطبی نیترو متصل به حلقه‌ی فنیل خود، یک پیوند هیدروژنی با رزیدوی ترئونین شماره ۳ از رشته‌ی A برقرار کرده است. علاوه بر این، دو میانکنش آب‌گریز از نوع فشردگی پای-پای بین لیگاند و رزیدوی تریپتوفان شماره ۱۴ از رشته‌ی B و یک نوع میانکنش آب‌گریز از نوع T شکل با رزیدوی تیروزین شماره ۵ از رشته‌ی A برقرار کرده است. لیگاند BI2MPM دارای تعداد میانکنش‌های آب‌گریز بیشتری از لیگاند دیگر است. از طرفی عمده‌ی میانکنش‌های ایجاد شده توسط لیگاند BI3NPM میانکنش‌های پای از نوع face-to-face هستند که به طور کلی فراوانی کمتری در درشت‌مولکول‌های زیستی دارند. دلیل فراوانی کم این نوع از میانکنش‌ها و نامطلوب بودن آنها با توجه به مدل الکترواستاتیکی هانتر و سندرز (Hunter and Sanders, 2001)، از طریق دافعه‌ی غالب ایجاد شده بین الکترون‌های پای دو حلقه و در نهایت کاهش قدرت میانکنش بین آن‌ها قابل توجیه است (Hunter *et al.*, 1990, Hunter *et al.*, 2001). البته در این میان نقش گروه‌های متصل به حلقه‌ها نیز مهم است. گروه‌های دارای اتم‌های دارای خاصیت بالای کشندگی الکترون می‌توانند چگالی الکترونی حلقه را کاهش دهند و از این طریق، میانکنش بین دو حلقه را مطلوب‌تر کنند (Waters, 2002). از طرف دیگر با توجه به این مدل، الکترون‌های پای و سیستم‌های متصل با سیگما، جدا در نظر گرفته می‌شوند؛ مانند بنزن که یک توزیع نامتقارن از بار دارد؛ بدین‌صورت که چگالی الکترونی بالاتر در روی حلقه و چگالی الکترونی پایین‌تر در لبه‌های حلقه قرار می‌گیرد. بنابراین میانکنش‌های جاذبه‌ای مطلوب پای-پای نتیجه‌ی برهم‌کنش‌های جاذبه‌ای پای-سیگما هستند که بر دافعه‌های پای-پای غلبه می‌کنند؛ به این دلیل که بنای فضایی‌های T شکل، هر دو نوع اثر جاذبه و دافعه را همزمان با هم و با توجه به جهت‌گیری‌های مختلف موجب می‌شوند و با انرژی بالاتری با هم‌دیگر میانکنش دارند. محاسبات انرژی برای دایمر بنزن نیز نشان داده‌اند که انرژی اتصال دو حلقه در حالت میانکنش نوع face-to-face تقریباً

برابر با  $1/48 \text{ kcal/mol}$  - و در حالت میانکنش پای از نوع T شکل تقریباً برابر  $2/46 \text{ kcal/mol}$  - می‌باشد ( Tsuzuki *et al.*, 2002). در اینجا نیز با توجه به این که عمده میانکنش‌های لیگاند BI2MPM با پروتئین از نوع T شکل هستند، اتصال این لیگاند به نواحی آب‌گریز پروتئین با مطلوبیت بالاتری نسبت به لیگاند BI3NPM برقرار شده است. همان‌طور که اشاره شد دو نوع لیگاند، رفتار کاملاً متفاوتی در مهار تجمع هسته‌های پروتئینی به سمت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی دارند. از طرف دیگر تنها با مقایسه‌ی جایگاه اتصال نمی‌توان رفتار متفاوت لیگاندها را توجیه کرد. بنابراین برای بررسی دقیق‌تر مکانیزم مولکولی میانکنش این لیگاندها با پروتئین، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در طول زمان برای تجزیه و تحلیل نتایج رفتاری لیگاندها استفاده شد.

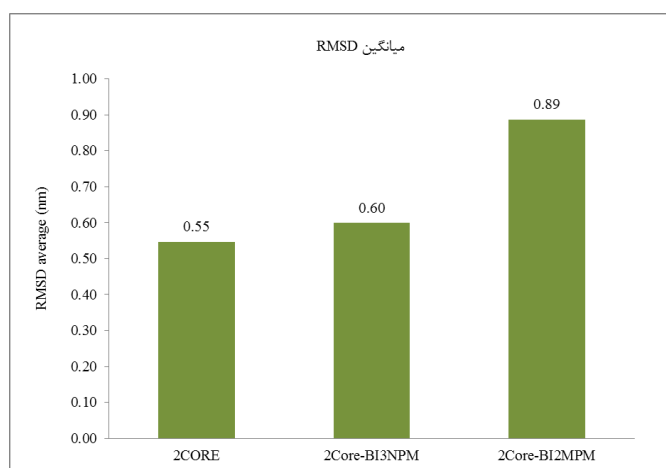
### نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

#### آنالیز RMSD

اولین و مهم‌ترین فاکتور صحت انجام شبیه‌سازی نمودار میانگین مربعات خطا یا همان RMSD است که نشان می‌دهد تغییرات سیستم بعد از مدت زمان مورد نظر به چه صورت تغییر کرده است. در شکل ۳ نمودار میانگین مربعات خطای هر کدام از کمپلکس‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تغییرات ساختاری القا شده به گیرنده در کمپلکس دارای لیگاند مهاری BI2MPM بیشتر از دو حالت دیگر است. همچنین در بخش‌های قبلی دیده شد که لیگاند مهاری BI2MPM نسبت به لیگاند غیرمهاری BI3NPM با ایجاد تغییرات عمیق‌تر ساختاری در هسته‌های پیش‌ساز آمیلوئیدی، باعث تخریب بخش عمده‌ای از ساختارهای بتای رشته‌ها گردید. آنالیز میانگین RMSD رشته‌های بتای تشکیل‌دهنده‌ی هسته‌های آمیلوئیدی نیز در راستای تایید این اثر انجام شد. مشخص گردید که لیگاند مهاری BI2MPM با میانگین RMSD برابر  $0/89$  نانومتر، باعث افزایش نوسانات ساختاری و تداخل در پایداری می‌شود. اما لیگاند غیر مهاری BI3NPM با تغییر جزئی در میزان میانگین RMSD  $0/6$  نانومتر نسبت به  $0/55$  نانومتر در حالت بدون لیگاند، تاثیر چندانی بر روی پایداری ساختار هسته‌ها ندارد. بنابراین مشخص است که هر چه رشته‌های بتا میانگین RMSD پایین‌تری داشته باشند پایدارترند و در جهت رشد رشته‌های پرتوفیبریلی پیش‌ساز آمیلوئید پیش می‌روند. بنابراین اولین مرحله برای مهار رشد ساختارهای پیش‌ساز آمیلوئیدی، تداخل در پایداری زیر واحدهای رشته‌ای بتای آنهاست که می‌تواند توانایی دارویی مهمی برای لیگاندها ایجاد کند. شکل ۴ میانگین RMSD را برای سه حالت شبیه‌سازی شده نشان می‌دهد.



شکل ۳: نمودار میانگین مربعات خطا یا RMSD سه نوع کمپلکس شبیه سازی شده که میزان تغییرات ساختاری آن‌ها را در طول ۱۰۰ نانوثانیه از شبیه سازی نشان می‌دهد. کمپلکس دارای لیگاند BI2MPM تغییرات ساختاری شدیدتری در طول زمان از خود نشان داده است.



شکل ۴: میانگین RMSD دو لیگاند بر روی هسته‌های آمیلوئیدی در مقایسه با هسته‌های فاقد لیگاند. همان‌طور که مشخص است افزایش قابل توجه در RMSD کمپلکس پروتئین-BI2MPM نسبت به لیگاند دیگر در مقایسه با کمپلکس پروتئینی بدون لیگاند، تغییرات ساختاری بیشتری در زیرواحدهای بتای هسته‌ها اعمال می‌کند و آنها را در راستای تخریب و اختلال در رشد فیبریل‌ها پیش می‌برد.

#### آنالیز درصد ساختار دوم بتا

در ادامه‌ی مطالعه از بنای فضایی‌های اتصال‌ی لیگاندها به پروتئین که از داکینگ مولکولی به دست آمد سه حالت شبیه سازی انجام شد. حالت اول دو هسته در کنار هم و بدون حضور لیگاند با دو حالت دیگر که در هر کدام یکی از لیگاندها بین هسته‌ها حضور دارند مقایسه شد. همان‌طور که اغلب نتایج تجربی نشان داده‌اند، یکی از مهمترین خصوصیات پروتئین‌های تجمع‌یافته‌ی آمیلوئیدی وجود ساختارهای عمده‌ی بتا است که از کنار هم قرار گرفتن آن‌ها، رشد آن‌ها به صورت کمپلکس‌های

فراساختاری ممکن می‌شود. بنابراین مقایسه تغییرات القا شده بر روی ساختار بتا در طول زمان شبیه‌سازی نشانگر مهمی برای توانایی تخریبی لیگاندها بر روی ساختار بتا است. آنالیز درصد ساختار دوم بتا در هر سه حالت شبیه‌سازی نشان داد که بعد از مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه از ابتدای شبیه‌سازی، کمپلکس پروتئینی بدون لیگاند ۴۳ درصد از ساختار دوم بتای خود را حفظ می‌کند، در حالی که کمپلکس پروتئین-BI3NPM دارای ۳۹ درصد و کمپلکس پروتئین-BI2MPM دارای ۲۵ درصد ساختار بتا است. این امر موید این مطلب است که لیگاند غیرمهاری BI3NPM تاثیر چندانی بر درصد ساختار بتای هسته‌های پروتئینی نداشته است، در حالی که وجود لیگاند مهاری BI2MPM تا حدود زیادی میزان حضور رزیدوها در ساختارهای بتا را کاهش داده است (شکل ۵).

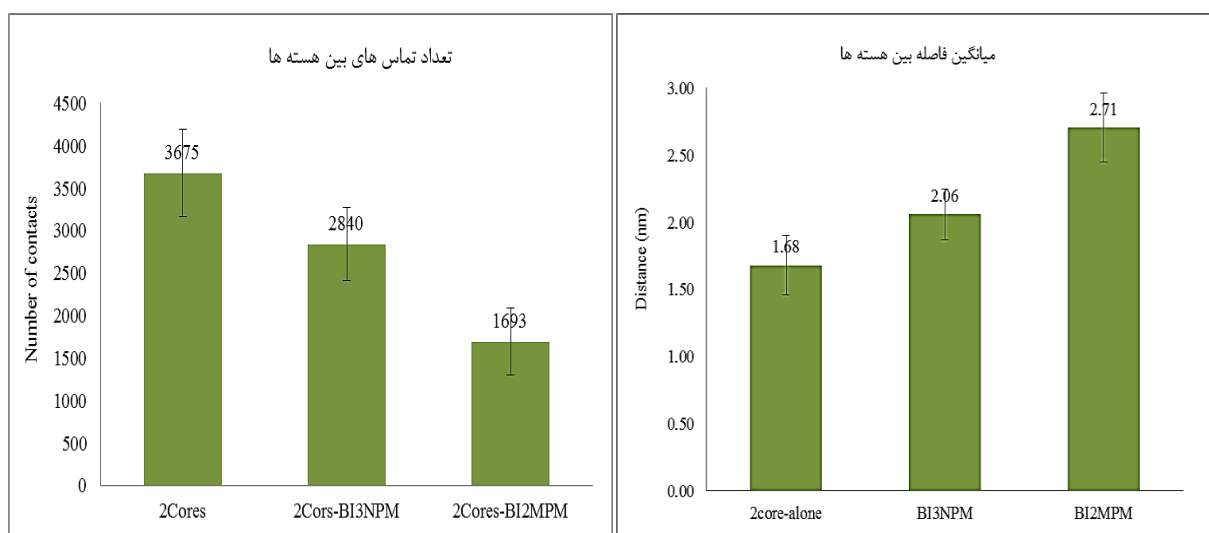


شکل ۵: میزان درصد ساختار بتا در حالت‌های بدون حضور لیگاند و با حضور دو لیگاند بعد از ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. کاهش عمده ساختار بتا در حضور لیگاند BI2MPM نسبت به لیگاند BI3NPM نشان دهنده قدرت مهاری در فرآیند رشد هسته‌های فیبریلی است.

#### آنالیز فاصله بین هسته‌ها

در یک بررسی دیگر، فاصله‌ی ایجاد شده بین مرکز جرم دو هسته‌ی پروتئینی را به منظور مقایسه‌ی نحوه عملکرد دو نوع لیگاند در ایجاد فاصله‌ی بین هسته‌های آمیلوئیدی مورد ارزیابی قرار دادیم. با آنالیز فاصله‌ی بین دو هسته در طول ۱۰۰ نانوثانیه تفاوت معنی‌داری در فاصله‌ی مرکز جرم دو هسته دیده شد. میانگین فاصله‌ی به وجود آمده بین دو هسته در ۴۰ نانوثانیه‌ی انتهایی از کل زمان ۱۰۰ نانوثانیه‌ی شبیه‌سازی، نشان داد که لیگاند مهاری BI2MPM قادر است فاصله‌ی بین صفحات هسته‌ها را از  $1/68$  نانومتر به  $2/71$  نانومتر افزایش دهد. این امر موید این مطلب است که این لیگاند قادر است با افزایش فاصله‌ی بین هسته‌ها احتمال میانکنش آن‌ها با همدیگر را کاهش دهد و مانع رشد آن‌ها در کنار یکدیگر شود. این در حالی است که لیگاند

غیر مهاری BI3NPM با ایجاد فاصله‌ی تقریباً دو نانومتری، قدرت کمتری در ایجاد فاصله بین هسته‌ها دارد (شکل ۶ راست). در راستای تایید این افزایش فاصله، با استفاده از ابزارهای آنالیز تراژکتوری شبیه‌سازی در گرومکس، تعداد تماس‌های بین دو هسته در حالت دو هسته‌ی تنها با حالت‌های حضور لیگاندها در بین هسته‌ها مقایسه شد. با استفاده از ابزار gmx mindist از پکیج gromacs تعداد تماس‌های بین هسته‌ها در فاصله کمتر از شش آنگستروم محاسبه گردید. نتایج این آنالیز نشان داد که تعداد تماس‌های بین دو هسته در حالتی که لیگاند مهاری BI2MPM حضور دارد بسیار کمتر از لیگاند BI3NPM است. این نتیجه، تصدیق‌کننده‌ی وجود فاصله‌ی بیشتر هسته‌ها در حضور این لیگاند است. در حالی که لیگاند غیرمهاری BI3NPM به این دلیل که قادر نیست فاصله‌ی قابل توجهی بین هسته‌ها ایجاد کند تعداد تماس‌هایی تقریباً نزدیک به حالت دو هسته‌ی بدون لیگاند دارد (شکل ۶ چپ).

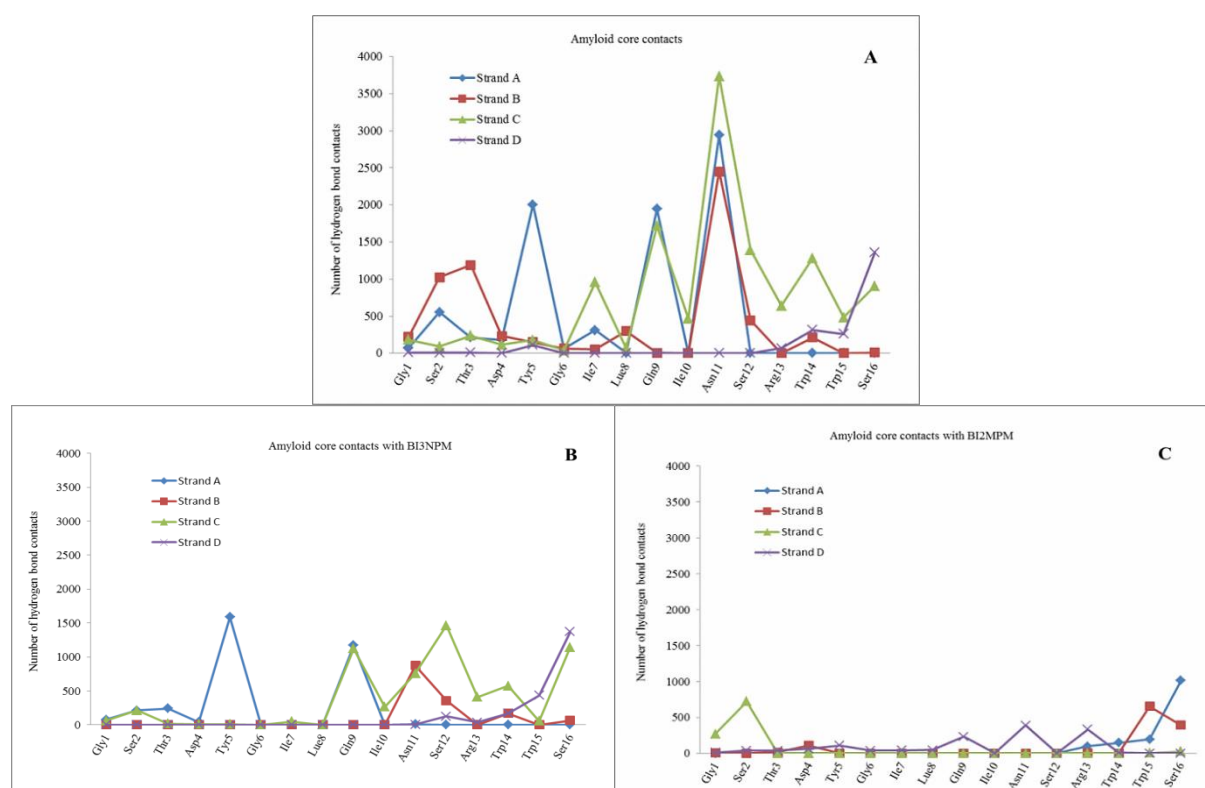


شکل ۶: راست: میانگین فاصله بین مرکز جرم هسته‌های پروتئینی در فاصله زمانی ۶۰-۱۰۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در سه حالت دو هسته‌ی پروتئینی تنها بدون حضور لیگاند (2Cores)، هسته‌ی پروتئینی با حضور لیگاند BI3NPM و هسته‌ی پروتئینی با حضور لیگاند BI2MPM. چپ: تعداد تماس‌های ایجاد شده بین دو هسته در سه حالت مذکور در فاصله زمانی ۴۰ نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی.

### نقشه‌ی پیوندهای هیدروژنی

معیار مهم دیگری که نشان می‌دهد میانکنش لیگاند با هسته‌ها می‌تواند باعث تداخل در میانکنش بین هسته‌های پروتئینی پیش‌ساز پروتوفیبریل‌ها و در نهایت عدم رشد آنها گردد تعداد پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین هسته‌هاست. در حالتی که لیگاند حضور ندارد، رزیدوهای رشته‌های بتای دو هسته‌ی مجاور هم قادرند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی به استحکام ساختار آمیلوئیدی کمک کنند. این پیوندها در کنار میانکنش‌های فشردگی پای ناشی از حلقه‌های رزیدوهای آروماتیک، باعث استحکام ساختارهای پیش‌ساز فیبریلی می‌شوند. در این راستا نقشه‌ی پیوند هیدروژنی یک هسته‌ی چهار رشته‌ای بتا با هسته‌ی مشابه دیگر نشان داد که در طول مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه تعداد ۲۹۲۲۸ پیوند هیدروژنی بین رزیدوهای دو هسته تشکیل

می‌شود که رزیدوهای ASN11 در اکثر رشته‌ها و GLN9 در رشته‌های A و C و همچنین TYR5 رشته‌ی A با ایجاد بیشترین تعداد پیوندهای هیدروژنی مسئول اصلی پایداری در مدل هسته‌ی آمیلوئیدی هستند. این در حالی است که تعداد میانکنش هسته‌ها با هم‌دیگر در حضور لیگاند BI3NPM به ۱۳۰۹۵ و در حضور لیگاند BI2MPM به ۴۹۵۶ عدد می‌رسد (شکل ۷). ترجیح توالی ناحیه SER16-GLN9 در هر کدام از رشته‌ها برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی تا حد زیادی در حضور لیگاند BI3NPM حفظ می‌شود. اما در حضور لیگاند BI2MPM اکثر رزیدوهای هر چهار رشته، تمایل زیادی به ایجاد پیوند هیدروژنی ندارند. بنابراین ثابت می‌شود که توانایی لیگاند مهاری BI2MPM در ایجاد فاصله‌ی بیشتر بین هسته‌های آمیلوئیدی، دلیل اصلی تشکیل تعداد کم پیوند هیدروژنی و ناپایداری متعاقب هسته‌ها می‌باشد.



شکل ۷: نقشه‌ی پیوند هیدروژنی بین هسته‌های آمیلوئیدی چهار رشته‌ای برای سه حالت (A) دو هسته بدون حضور لیگاند، (B) در حضور لیگاند BI3NPM و (C) در حضور لیگاند BI2MPM. رزیدوهای ASN11، GLN9 و TYR5 با ایجاد بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی با هسته آمیلوئیدی دوم، میانکنش قوی بین هسته‌ها برقرار می‌کنند. در حالت‌های حضور لیگاند، به دلیل ایجاد فاصله‌ی بین هسته‌ها تعداد پیوندهای هیدروژنی کمتری بین هسته‌ها تشکیل شده است.

## نتیجه‌گیری کلی

در تمامی آنالیزهای انجام شده بر روی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس‌های مذکور، تفاوت معنی‌داری بین رفتار دو لیگاند در اندرکنش با هسته‌های پروتئینی دیده شد. همان‌طور که اشاره شد تفاوت ساختار مولکولی دو لیگاند تنها در گروه عاملی متصل به حلقه‌ی بنزن آنهاست که در لیگاند BI2MPM (که توانایی مهار پروسه فیبریلاسیون دارد) یک گروه متیل و در

لیگاند BI3NPM (که هیچ قدرت مهاری در این پروسه از خود نشان نمی‌دهد) یک گروه نیترو بر روی حلقه‌ی بنزن قرار دارد. بقیه‌ی ساختار، دو گروه ایندول متصل در دو طرف حلقه بنزن مرکزی هستند که ثابت شده است این حلقه‌های ایندولی با ساختاری حلقوی و مشابه با گروه ایندول آمینواسید تریپتوفان، توانایی مهار فیبریل‌اسیون آمیلوئیدی را دارند. مطالعات انجام شده توسط داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی پروتئین مدل هسته‌های اولیه پیش‌ساز آمیلوئید، در راستای تایید آزمایشات تجربی اثرات این لیگاندها بر روی تجمع آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم است. روش داکینگ مولکولی جایگاه‌های متفاوتی برای دو نوع لیگاند بر روی پروتئین نشان داد که اتصال لیگاندها به این جایگاه‌ها عمدتاً با واسطه میانکنش‌های غیرکوالانی صورت می‌گیرد. تحقیقات فراوانی بر روی این میانکنش‌های غیرکوالانی به دلیل اهمیت آنها در موارد تشخیص مولکولی و کاربردهای عملی اکتشاف دارو انجام گرفته است. مشخص شده است که ترکیبات فعال دارویی یک قدرت کافی و اختصاصی برای اتصال لیگاند به گیرنده‌ی هدف را دارند و این اختصاصی بودن اتصال، ناشی از مناسب بودن خصوصیات شیمیایی لیگاند برای اتصال غیرکوالانی با گیرنده هدفش است (Chen & Kurgan, 2009; Zhou *et al.*, 2012; Gallina *et al.*, 2014). این نوع اتصالات برگشت‌پذیر، ضعیف و دارای تنوع زیادی است و غالباً بین لیگاندهای کوچک دارویی و زنجیره‌های جانبی رزیدوهای پاکت اتصال پروتئین تشکیل می‌شوند. یکی از مهمترین میانکنش‌های تشکیل شونده بین حلقه‌های آروماتیک چه بین لیگاند و پروتئین و چه بین خود رزیدوها در داخل پروتئین، میانکنش‌های فشردگی پای-پای یا  $\pi$ -Stacking هستند (Sinnokort *et al.*, 2006). این میانکنش‌های غیرکوالان جاذبه‌ای، اگرچه فراوانی پیوندهای هیدروژنی و میانکنش‌های آب‌گریز را ندارند اما نقش حیاتی در شکل‌گیری و سازماندهی درشت‌مولکول‌های زیستی ایفا می‌کنند. این میانکنش‌ها دارای یک انرژی پیوندی حدود ۲-۳ kcal/mol هستند و عواملی مثل فاصله‌ی حلقه‌های میانکنش‌کننده، ساختار فضایی حلقه‌ها و نحوه‌ی قرارگیری سطوح هندسی حلقه‌ها نسبت به هم (زاویه) در شکل‌گیری و استحکام آنها نقش مهمی دارند (Janda *et al.*, 1975; Jaffe & Smith, 2002; Sinnokrot *et al.*, 1996). از طرف دیگر لیگاند مهاری BI2MPM به دلیل داشتن گروه استخلافی غیرقطبی تمایل بیشتری به میانکنش‌های آب‌گریز نشان می‌دهد. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نیز نشان داد که این لیگاند می‌تواند با نفوذ بیشتر به مابین رشته‌های بتا که زیرواحدهای تشکیل دهنده‌ی هسته‌های پیش‌ساز آمیلوئیدی محسوب می‌شوند، باعث افزایش فاصله و متعاقب آن کاهش میانکنش و کاهش پایداری رشته‌ها گردد. این نوع تاثیرات ناپایدارسازی بر روی هسته‌های پروتئینی، که در مسیر تجمع و تشکیل رشته‌های بالغ فیبریلی قرار می‌گیرند یکی از مهمترین روش‌های مهار فرآیند فیبریلی شدن در راستای درمان و یا کاهش اثرات بیماری‌های آمیلوئیدی به شمار می‌رود.

## منابع

- Abedini, A., Plesner, A., Cao, P., Ridgway, Z., Zhang, J., Tu, L.H., Middleton, C.T., Chao, B., Sartori, D.J., Meng, F., Wang, H., Wong, A.G., Zanni, M.T., Verchere, C.B., Raleigh, D.P. and Schmidt, A.M. (2016). Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *ELife*, 5:e12977.
- Abraham, M.J., Van.der.Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. and the GROMACS development team. GROMACS User Manual. (2019).
- Armen, R.S. and Daggett, V. (2005). Characterization of two distinct beta2 microglobulin unfolding intermediates that may lead to amyloid fibrils of different morphology. *Biochemistry*, 44: 16098-16107.
- Ayton, G.S., Noid, W.G. and Voth, G.A. (2007). Multiscale modeling of biomolecular systems: in serial and in parallel. *Current Opinion in Structural Biology*, 17: 192-198.
- Baranczak, A and Kelly, J.W. (2016). A current pharmacologic agent versus the promise of next generation therapeutics to ameliorate protein misfolding and/or aggregation diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 32: 10-21.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van.Gunsteren, W.F., Hermans, J. (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. Pages 331-342 In: Pullman, B. (eds). *Intermolecular Forces. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry*: Springer.
- Brancolini, G. and Tozzini, V. (2019). Multiscale modeling of proteins interaction with functionalized nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41: 66-73.
- Buchete, N.V., Tycko, R. and Hummer, G. (2005). Molecular dynamics simulations of Alzheimer's beta-amyloid protofibrils. *Journal of Molecular Biology*, 353: 804-821.
- Buxbaum, J.N. (2003). Diseases of protein conformation: what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases? *Trends in Biochemical Science*, 28: 585-592.
- Chauhan, N.B. (2006). Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *Journal of ethnopharmacology*, 108: 385-394.
- Chen, K. and Kurgan, L. (2009). Investigation of atomic level patterns in protein-small ligand interactions. *PLoS One*, 4: e4473.
- Cheng, A. and Merz, K.M. (1996). Application of the Nosé-Hoover Chain Algorithm to the Study of Protein Dynamics. **Journal of Physical Chemistry**, **100**: 1927-1937.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 333-366.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 424: 805-808.
- Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98:10089-10092.
- DeMarco, M.L. and Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2293-2298.



- Deng, N.J., Yan, L., Singh, D. and Cieplak, P. (2006). Molecular basis for the Cu<sup>2+</sup> binding-induced destabilization of beta 2-microglobulin revealed by molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 90: 3865-3879.
- Ding, F., LaRocque, J.J. and Dokholyan, N.V. (2005). Direct observation of protein folding, aggregation, and a prion-like conformational conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 40235-40240.
- Dische, F.E., Wernstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. and Watkins, P.J. (1988). Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. Pages 158-161. *Diabetologia: Springer*.
- Espargaro, A., Castillo, V., de Groot, N.S. and Ventura, S. (2008). The in vivo and in vitro aggregation properties of globular proteins correlate with their conformational stability: the SH3 case. *Journal of Molecular Biology*, 378: 1116-1131.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, 22: 1302-1306.
- Flores, S.C., Bernauer, J., Shin, S., Zhou, R. and Huang X. (2011). Multiscale modeling of macromolecular Biosystems. Pages 395-405 in *Briefings in Bioinformatics: Oxford University Press*.
- Gallina, A.M., Bork, P. and Bordo, D. (2014). Structural analysis of protein-ligand interactions: the binding of endogenous compounds and of synthetic drugs. *Journal of Molecular Recognition*, 27: 65-72.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Pages 571-607 In John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Gupta, V.B. and Rao, K.S. (2007). Anti-amyloidogenic activity of S-allyl-L-cysteine and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuroscience Letters*, 429: 75-80.
- Han, W. and Wu, Y.D. (2005). A strand-loop-strand structure is a possible intermediate in fibril elongation: long time simulations of amyloid-beta peptide (10-35). *Journal of American Chemical Society*, 127: 15408-15416.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. and Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18: 1463-1472.
- Hunter, C.A. and Sanders, J.K.M. (1990). The nature of pi-pi interactions. *Journal of the Chemical Society*, 112: 5525-5534.
- Hunter, C.A., Lawson, K.R., Perkins, J. and Urch, C.J. (2001). Aromatic interactions. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 2: 651-669.
- Jaffe, R.L. and Smith, G.D. (1996). A quantum chemistry study of benzene dimer. *The Journal of Chemical Physics*, 105: 2780-2788.
- Jahn, T.R., Parker, M.J., Homans, S.W. and Radford, S.E. (2006). Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13: 195-201.
- Janda, K.C., Hemminger, J.C., Winn, J.S., Novick, S.E., Harris, S.J. and Klemperer, W. (1975). Benzene dimer: A polar molecule. *The Journal of Chemical Physics*, 63: 1419-1421.

- Janiak, C. (2000). Critical account on pi-pi stacking in metal complexes with aromatic nitrogen containing ligands. *Journal of Chemical Society, Dalton Transactions*, 21: 3885-3896.
- Klimov, D.K. and Thirumalai, D. (2003). Dissecting the assembly of Abeta 16-22 amyloid peptides into antiparallel beta sheets. *Structure*, 11: 295-307.
- Ko, S.Y., Chang, K.W., Lin, S.C., Hsu, H.C. and Liu, T.Y. (2007). The repressive effect of green tea ingredients on amyloid precursor protein (APP) expression in oral carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 245: 81-89.
- Kueltzo, L.A., Wang, W., Randolph, T.W. and Carpenter, J.F. (2008). Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 1801-1812.
- Kukic, P. and Nielsen, J.E. (2010). Electrostatics in proteins and protein-ligand complexes. *Future Medicinal Chemistry*, 2: 647-666.
- Kumar, V., Sharma, V.K. and Kalonia, D.S. (2009). In situ precipitation and vacuum drying of interferon alpha-2a: development of a single-step process for obtaining dry, stable protein formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 366: 88-98.
- Laskowski, R.A. and Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51: 2778-2786.
- Lingenheil, M., Denschlag, R., Reichold, R. and Tavan, P. (2008). The Hot Solvent/Cold Solute Problem Revisited. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4: 1293-1306.
- Malde, A.K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P.C., Oostenbrink, C. and Mark, A.E. (2011). An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7: 4026-4037.
- Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., Lopez-de-la-Paz, M., Martins, I.C., Reumers, J., Moris, K.L., Copland, A., Serpel, L., Serrano, L., Schymkowitz, J.W. and Rousseau, F. (2010). Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *National Methods*, 7: 237-242.
- McGaughey, G.B., Gagne, M.R. and Rappe, A.K. (1998). Pi Stacking Interactions Alive and well in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15458-15463.
- Mor, A., Ziv, G. and Levy, Y. (2008). Simulations of Proteins with Inhomogeneous Degrees of Freedom: The Effects of Thermostats. *Journal of Computational Chemistry*, 29: 1992-1998.
- Morshedi, D., Rezaei-Ghaleh, N., Ebrahim-Habibi, A., Ahmadian, S. and Nemat-Gorgani, M. (2007). Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives, possible mechanism of action. *The FEBS Journal*, 274: 6415-6425.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A., Riek, C., Grothe, R. and Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435: 773-778.
- Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundstrom, P., Zarrine-Afsar, A., Sharpe, S., Vendruscolo, M. and Kay, L.E. (2012). Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation. *Science*, 336: 362-366.
- Neves-Petersen, M.T. and Petersen, S.B. (2003). Protein electrostatics: a review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules, applications in biotechnology. *Future Medicinal Chemistry*, 9: 315-95.

- Nguyen, H.D. and Hall, C.K. (2006). Spontaneous fibril formation by polyanilines; discontinuous molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 1890-1901.
- Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R. and Merlini, G. (2005). Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochimica et Biophysica acta*, 1753: 11-22.
- Park, S. and Saven, J.G. (2006). Simulation of pH-dependent edge strand rearrangement in human beta-2 microglobulin. *Protein Science: a publication of the Protein Society*, 15: 200-207.
- Park, S.Y., Kim, D.S., Cho, E.K., Kwon, B.Y., Phark, S., Hwang, K.W. and Sul, D. (2008). Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2881-2887.
- Park, S.Y. and Kim, D.S. (2002). Discovery of Natural Products from *Curcuma longa* that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease. *Journal of Natural Products*, 9: 1227-1231.
- Parrinello, M. and Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52: 7182-7190.
- Porat, Y., Abramowitz, A. and Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, 67: 27-37.
- Ramazzotti, M., Melani, F., Marchi, L., Mulinacci, N., Gestri, S., Tiribilli, B. and Innocenti, D. (2016). Mechanisms for the inhibition of amyloid aggregation by small ligands. *Bioscience Reports*, 36: e00385.
- Ramshini, H., Mannini, B., Khodayari, K., Ebrahim-Habibi, A., Moghaddasi, AZ., Tayebbee, R. and Chiti, F. (2016). Bis (indolyl) phenylmethane derivatives are effective small molecules for inhibition of amyloid fibril formation by hen lysozyme. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124: 361-371.
- Schmid, N., Eichenberger, A.P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A.E. and van.Gunsteren, W.F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, 40: 843-856.
- Sharma, S., Ding, F. and Dokholyan, N.V. (2008). Probing protein aggregation using discrete molecular dynamics. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 13: 4795-4808.
- Shukla, A.A., Gupta, P. and Han, X. (2007). Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography: case study for an Fc fusion protein. *Journal of Chromatography A*, 1171: 22-28.
- Sinnokrot, M.O. and Sherrill, C.D. (2006). High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of  $\pi$ - $\pi$  Interactions in Benzene Dimers. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110: 10656-10668.
- Sinnokrot, M.O., Valeev, E.F. and Sherrill, C.D. (2002). Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: the benzene dimer. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 10887-10893.
- Tartaglia, G.G., Cavalli, A., Pellarin, R. and Caflisch, A. (2004). The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. *Protein Science*, 13: 1939-1941.
- Tartaglia, G.G., Cavalli, A., Pellarin, R. and Caflisch, A. (2005). Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments in polypeptide sequences. *Protein Science*, 14: 2723-2734.
- Tayebbee, R., Amini, M., Abdollahi, N., Aliakbari, A., Rabiei, S. and Ramshini, H. (2013). Magnetic inorganic-organic hybrid nanomaterial for the catalytic preparation of bis (indolyl) arylmethanes under solvent-free

- conditions: preparation and characterization of H5PW10V2O40/pyridino-Fe3O4 nanoparticles. *Applied Catalysis A: General*, 468: 75-87.
- Tipping, K.W., Karamanos, T.K., Jakhria, T., Iadanza, M.G., Goodchild, S.C., Tuma, R., Ranson, N.A, Hewitt, E.W. and Radford, S.E. (2015). PH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 5691-5696.
- Tiwari, A., Xu, Z. and Hayward, L.J. (2005). Aberrantly increased hydrophobicity shared by mutants of Cu, Zn-superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 29771-29779.
- Tohda, C., Ichimura, M., Bai, Y., Tanaka, K., Zhu, S. and Komatsu, K. (2008). Inhibitory Effects of *Eleutherococcus senticosus* Extracts on Amyloid Induced Neuritic Atrophy and Synaptic Loss. *Journal of Pharmacological Sciences*, 107: 329-339.
- Tozzini, V. (2010). Multiscale modeling of proteins. *Accounts of Chemical Research*, 43: 220-230.
- Trott, O. and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31: 455-461.
- Tsuzuki, S., Honda, K., Uchamaru, T., Mikami, M. and Tanabe, K. (2002). Origin of attraction and directionality of the pi-pi interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. *Journal of American Chemical Society*, 124: 104-112.
- Van.Gunsteren, W.F. and Berendsen, H.J.C. (1988). A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, 1:173-185.
- Wang, J., Tan, C., Chen, H.F. and Luo, R. (2008). All-atom Computer Simulations of Amyloid Fibrils Disaggregation. *Biophysical Journal*, 95: 5037-5047.
- Waters. M.L. (2002). Aromatic interactions in model systems. *Current Opinion in Chemical Society*, 6 : 736-741.
- Wu, C. and Shea, J.E. (2011). Coarse-grained models for protein aggregation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21: 209-220.
- Young, L.M., Cao, P., Raleigh, D.P., Ashcroft, A.E. and Radford, S.E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of American Chemical Society*, 136: 660-670.
- Zhou, P., Huang, J. and Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 226-238.

## **Study of Inhibition Potential of Synthetic Bis-Indole compounds on Amyloid Fibrillation by Molecular Simulation methods**

**K.Khodayari<sup>1\*</sup>, P.Abdolmalaki<sup>2</sup>**

**Received:2019.7.13**

**Accepted:2019.9.1**

### **Abstract**

Aggregation of proteins lead to form Amyloid diseases including Alzheimer, Parkinson and Diabetes type II has been increasingly considered recently. Compounds including indole rings are the best Amyloid aggregation inhibitors. Experimental studies have shown that Bis(indolyl)-2-methylphenylmethane (BI2MPM) has a great inhibitory potential on Lysozyme Amyloid fibril formation, While Bis(indolyl)-3-Nitrophenylmethane (BI3NPM) has shown weaker inhibitory power. In this study, the interaction of these two ligands was investigated on amyloid model protein using molecular docking and molecular dynamics simulation techniques. Molecular Docking method showed similar reluctance to both ligands in Amyloid nucleus model but in different binding positions. Molecular dynamics simulation showed that BI2MPM with major degradation on the Beta structure of early fibril precursors, leads to lower interaction. It also increases structural changes in the subtypes of beta-strands and induces instability and stops fibrillation growth, but BI3NPM has minimum changes on the fibrils core structures.

**Keywords: Amyloid Diseases, Beta structure, Indole Ring, Molecular Dynamics, Pi interactions.**

---

1- Biophysics, Biological Sciences, Tarbiat Modares, Tehran, Iran

\*(corresponding author: parvis@modares.ac.ir)

2- Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

## بررسی افزایش تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های جهش یافته‌ی بومی آسپرژیلوس نایجر

سید محمد رضا خوشرو<sup>۱\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۶

### چکیده

قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر از خاک و سطح بذره‌های ذرت جدا سازی و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی و خالص سازی شدند. میزان پرتو دهی بر اساس مدت زمان دریافت پرتو با اشعه UV بر حسب ژول بر متر مربع محاسبه شد. از روش اختصاصی ماریر-بولت برای سنجش کمی تولید اسیدسیتریک استفاده شد. پرتو دهی با زمان ۱۲۰۰ ثانیه بیشترین تاثیر را بر افزایش تولید اسیدسیتریک نشان داد. میانگین تولید اسیدسیتریک در جدایه‌های برتر جهش یافته و والدینی به ترتیب ۵۱/۰۱ و ۳۶/۸۷ میلی گرم بر لیتر بود که حدود ۱۴/۱۴ گرم بر لیتر افزایش نشان داد. در بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته، میانگین تولید اسیدسیتریک در ۱۲۰۰ ثانیه پرتو دهی در چهارمین کشت متوالی از کشت اول تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشت. عملکرد و کارایی جدایه‌ی جهش یافته ۵ (۵ UV) در مقایسه با جدایه‌ی والدینی ۳ برابر افزایش تولید اسیدسیتریک را نشان داد. در جدایه‌ی ۵UV و والدینی آن پارامترهای کنتیکی تشکیل محصول (اسیدسیتریک) ۲ برابر و پارامترهای کنتیکی سوستر (مصرف گلوکز) تقریباً مساوی بود، در حالی که وزن خشک توده‌ی سلولی در جدایه ۵UV نسبت به جدایه‌ی والدینی ۵ با شیب یکسان افزایش یافت. در اثر جهش، وزن توده‌ی سلولی در جدایه‌ی پرتو دیده‌ی ۵UV در محدوده زمانی یکسان، افزایش معنی دار نشان داده است. در این مطالعه مشخص شد که، جهش‌های تصادفی توسط اشعه UV باعث بهبود پارامترهای کنتیکی تولید اسیدسیتریک در مقابل مصرف گلوکز به عنوان سوستر، شده است.

**واژه‌های کلیدی:** آسپرژیلوس نایجر، اسیدسیتریک، اشعه UV، جهش.

### مقدمه

اسیدسیتریک یک محصول مهم در صنایع بیوتکنولوژی صنعتی و تجارت جهانی است، که به دلیل انحلال پذیری در آب، طعم ترش مطبوع، خواص بافری، عدم سمیت، جذب آسان و شرکت در واکنش‌های شیمیایی، نقش آنتی‌اکسیدانی قوی و همچنین به عنوان یک مونومر برای تولید پلیمرهای سازگار با محیط زیست خصوصاً در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع غذایی، داروئی و بهداشتی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Soccol et al., 2006). بهبود سویه‌ی تولیدکننده‌ی میکروبی، بزرگترین

۱-استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

\* (نویسنده مسئول: khoshroo@iauc.ac.ir)

فرصت برای کاهش هزینه برای سنتز این اسید است. از آنجایی که اسیدسیتریک یک واسطه‌ی متابولیسم در تولید انرژی است، غلظت آن می‌تواند به مقدار معنی‌دار در شرایط عدم تعادل متابولیکی، افزایش یابد. سویه‌های دارای ویژگی‌های برتر، مانند سویه‌هایی که توانایی تولید اسیدسیتریک بیشتر و افزایش میزان تخمیر را دارند، بعد از اینکه ماده ژنتیکی آنها تحت تاثیر عوامل جهش‌زای شیمیایی و یا مکانیکی قرار گرفتند، می‌توانند به عنوان سویه‌های برتر انتخاب شوند (Lotfy et al., 2007).

تاثیر الکترون‌های کم سرعت، پرتوهای اشعه‌ی UV، گاما، X و یا مواد شیمیایی جهش‌زا با ایجاد جهش‌های تصادفی بر روی جوانه‌زنی اسپور، رشد و مورفولوژی ریشه در قارچ‌های آسکومیست به ویژه در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با ایجاد سویه‌های توانمند در تولید اسیدسیتریک مورد مطالعه قرار گرفته است (Khurshid et al., 2001).

در این تحقیق، به دلیل نیاز به اسیدسیتریک در مقیاس وسیع و در دسترس بودن سویه‌های بومی، افزایش توانایی جدایه‌های *آسپرژیلوس نایجر* وحشی جدا شده از خاک و سطح بذرهای ذرت در تولید اسیدسیتریک از طریق جهش‌های تصادفی با استفاده از غلظت‌های مختلف اشعه‌ی UV (بر اساس مقدار انرژی دریافت شده در مدت زمان تابش پرتو) مورد بررسی قرار گرفت و بهترین جدایه‌های والدینی (تیپ وحشی) و جهش یافته از نظر تولید اسیدسیتریک مقایسه شدند.

## مواد و روش‌ها

**آماده سازی محیط‌های کشت مورد استفاده:** محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar): ۳۹ گرم پوتیتو دکستروز آگار (PDA) در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت QSPDA (Quarter Strength Potato Dextrose Agar): ۹/۷۵ گرم پوتیتو دکستروز برات (PDB)، ۲۰ گرم آگار و ۲ میلی لیتر اسید لاکتیک (برای ممانعت از آلودگی‌های باکتریایی) در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت CYEA (Czapek Yeast Extract Agar): ۳ گرم نیترات سدیم، ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن آبدار، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۳۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت CDA (Czapek Dox Agar): ۳ گرم نیترات سدیم، ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن آبدار، ۳۰ گرم گلوکز (به عنوان منبع کربن برای تولید اسیدسیتریک)، رنگ رزبنگال (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) (به منظور تسهیل جداسازی، جلوگیری از گسترش بیش از حد رشد ریشه‌ی قارچ‌های ساپروفیت رشته‌ای در معرض نور و ممانعت از رشد سایر ساپروفیت‌ها)، ۰/۱ گرم کلرامفنیکل، رنگ برمکروزول گرین ۱٪ (رنگ برمکروزول گرین به منظور تایید میزان تولید اسیدسیتریک با ایجاد هاله‌ی زرد رنگ) و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت FLCM (Fermented Liquid culture Medium): ۱۰۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم سولفات دی آمونیوم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه، ۲ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۱ گرم سولفات آهن، ۰/۱ گرم

سولفات روی ۷ آبه، ۰/۰۶ گرم سولفات مس ۵ آبه و ۰/۱۲۵ گرم رنگ رزبنگال در یک لیتر آب مقطر (تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد).

محیط‌های کشت و لوله‌های پلاستیکی درب پیچ‌دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو و ظرف‌ها شیشه‌ای قبل از استفاده در خشک کن (Oven) در دمای ۲۴۰ درجه سانتیگراد کاملاً سترون شدند.

#### جداسازی قارچ‌های آسپرژیلوس از نمونه‌های خاک و سطح بذرهاى ذرت: ۲۰ نمونه خاک از مزارع مختلف

استان کرمان جمع آوری شد. یک گرم از مخلوط خاک‌ها به ۳ میلی لیتر آب سترون در یک لوله پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی همزن برقی کاملاً مخلوط شد. سپس رقت های ۱/۱۶ (۲-۴) و ۱/۶۴ (۳-۴) از نمونه ساخته شد. ۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی سطح محیط کشت سترون CYEA در داخل پلیت کاملاً پخش شدند. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد در تاریکی، گرم‌خانه‌گذاری شدند. تعداد ۲۰ بذر ذرت به مدت یک دقیقه در محلول ۲ درصد هیپو کلرید سدیم، سترون و ۳ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس بذرها بر روی محیط کشت QSPDA حاوی لاکتیک اسید، (۵ بذر در هر پلیت) قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلونی قارچی تشکیل شده، برای جداسازی و شناسایی کلونی‌های آسپرژیلوس نایجر توسط میکروسکوپ تشریحی و نوری مورد بررسی قرار گرفتند (Pitt & Hocking, 2009).

#### شناسایی قارچ آسپرژیلوس نایجر: برای به‌دست آوردن کشت خالص از قارچ آسپرژیلوس نایجر، کشت‌های تک

اسپوری (تقریباً  $1 \times 10^7$  اسپور / ۲۰ میلی لیتر) روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ تا ۷ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای اطمینان از خالص بودن نمونه‌های قارچ، از کشت‌های خالص شده، کشت‌های متوالی (۴ کشت متوالی) بر روی محیط CDA انجام شد. کشت‌های خالص در لوله‌های پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری در پیچ‌دار در آب مقطر استریل برای استفاده‌های بعدی، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Guchi et al., 2014). از کشت خالص قارچ برای مطالعه‌ی ویژگی‌های مورفولوژی استفاده شد. برای شناسایی مورفولوژی کلنی‌ها و خصوصیات میکروسکوپی قارچ‌های جدا شده، برای تعیین جنس و گونه، از روش رنگ آمیزی با Lactophenol Cotton Blue (LCB) و مقایسه با سوش استاندارد استفاده شد (Nyongesa et al., 2015; Zulkifli & Zakaria, 2017). از سوش آسپرژیلوس نایجر با شماره ۵۰۱۰ PTCC خریداری شده از بانک قارچ و مخمر سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان سوش استاندارد برای مقایسه با قارچ‌های جدا شده استفاده شد.

#### تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ و القاء جهش: از ۵ جدایه‌ی برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) که بیشترین توانایی تولید

اسیدسیتریک را داشتند به‌منظور ایجاد جهش (جدایه‌ی ۱UV تا ۵UV) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ، از کشت



شش روزه‌ی قارچ بر روی محیط کشت CYEA در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی (برای افزایش توانایی اسپورزایی) استفاده شد. ابتدا ۱۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۵ درصد وزنی/حجمی دی اکتیل سولفو سوکسینات سدیم سترون شده (Diocetyl sulfosuccinate sodium salt) (به منظور سست کردن دیواره هیف‌های قارچ) بر روی محیط کشت اضافه و توسط لوپ سترون توده‌های قارچی خرد و قارچ‌ها از روی محیط کشت جمع‌آوری و در لوله‌های پلاستیکی سترون در پیچ‌دار با حجم ۲۵ میلی لیتر جمع‌آوری شدند. سپس با آب مقطر سترون حاوی ۰/۹ درصد وزنی/حجمی NaCl یا ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰٪ به مدت ۲ دقیقه کاملاً و به شدت با دستگاه هم‌زن لوله با ۹۰ دور بر ثانیه شستشو داده شدند. قطعات میسلیم قارچ با لوپ سترون از داخل محیط جمع‌آوری و محلول باقی‌مانده در لوله‌ها توسط یک لایه گاز پانسمان سترون، صاف شدند. محلول صاف شده حاوی اسپورها با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و اسپورهای رسوب داده شده مجدداً با محلول نمکی یا توئین ۸۰٪ شستشو داده شدند. از هر نمونه اسپور، ۲ میلی لیتر با مقدار تقریبی  $10^5$  اسپور در هر میلی لیتر (CFU/ml) (از طریق ساخت رقت‌های سریالی تنظیم و توسط لام هموسیتومتر (نئوبار) شمارش شدند) در ۰/۰۵ درصد (v/v) توئین ۸۰٪ تهیه و در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ذخیره شدند (Ikram-ul et al., 2004; Lotfy et al., 2007).

#### الف) مدت زمان جهش: برای ایجاد جهش، از لامپ اشعه UV (MINERAL LIGHT LAMP مدل UVG-54)

۲۰ وات با طول موج ۲۵۴ نانومتر به عنوان منبع اشعه UV استفاده شد. شدت تابش پرتو از طریق اندازه‌گیری سطح تابش لامپ UV ( $J/m^2/s$ ) و غلظت نور ( $J/m^2$ ) از طریق اندازه‌گیری سطح تابش لامپ UV و محاسبه وات بر مترمربع ( $W/m^2$ )، شدت تابش بر حسب  $J/m^2/s$  محاسبه شد. بر اساس رابطه  $W/m^2 = J/m^2/s$  (وات = ژول بر ثانیه)، غلظت پرتو UV بر مبنای  $J/m^2$  از طریق ضرب  $J/m^2/s$  در مدت زمان تابش مورد نظر بر حسب ثانیه، محاسبه شد. با توجه به رابطه مستقیم زمان با غلظت پرتو (انرژی دریافت شده) در زمان‌های ۳۰۰ تا ۲۱۰۰ ثانیه (۵ تا ۳۵ دقیقه) با فاصله زمانی ۳۰۰ ثانیه، غلظت پرتو دریافتی محاسبه شد (Rattanukul & Oguma, 2018; Rodrigues et al., 2009; Valero et al., 2007).

#### ب) بررسی کارایی غلظت‌های پرتو دهی: با استفاده از منحنی بقاء، کاهش درصد بقاء اسپورها بر حسب زمان با زمان

های ۳۰۰ تا ۲۱۰۰ ثانیه (۵ تا ۳۵ دقیقه) با فاصله زمانی ۳۰۰ ثانیه، بهترین زمان پرتو دهی برای جهش در اسپورها محاسبه شد. برای مشخص کردن زمان پرتو دهی مناسب، به منظور جهش اسپورها که اسپورها توانایی بقاء و رشد خود را حفظ نمایند، از شاخص PE و از کسر بقاء (Plating efficiency)، به عنوان کارایی غلظت پرتو دریافت شده توسط اسپور استفاده شد. کسر بقاء که رابطه بین کسری از سلول‌ها و حفظ توانایی تولید مثل را در دوز جذب تابش نشان می‌دهد، در مقیاس لگاریتمی محاسبه و محور  $y$  لگاریتم کاهش در مقابل دوز پرتو دهی در محور  $x$  ترسیم شد. از نمودار بقاء اسپور بر مبنای زمان پرتو دهی (میزان غلظت پرتو دهی یا میزان انرژی دریافت شده توسط اسپور)، بر اساس دوز موثر (Effective Dose) ۲۰ درصد (ED20) از اسپورهایی

که بیشترین غلظت پرتو را دریافت و قدرت بقاء خود را حفظ نموده‌اند، زمان مناسب و میزان حساسیت اسپور به غلظت پرتو دهی بر حسب مدت زمان تابش (ضریب  $k$ ) محاسبه شد (Joiner, 2009; Matsuya et al., 2015). بعد از بررسی کیفی تولید اسید در زمان‌های مورد بررسی، زمان مناسب انتخاب و از کشت اسپورهای پرتو دیده در این زمان برای بررسی کمی استفاده شد.

برای اعمال تیمارها، ۲۰ میکرو لیتر از نمونه‌های اسپور ذخیره شده که تقریباً شامل ۲۰۰ اسپور است را با ۱ میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط و بر روی محیط CDA در پتری‌های با قطر ۱۰ سانتی متر تلقیح و پس از اعمال پرتو دهی با اشعه UV در ۴ تکرار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای القاء جهش، پتری‌های حاوی اسپور قارچ‌های جدا شده‌ی تیپ والدینی و استاندارد/سپریژیلوس نایجر، با فاصله ۳۰ سانتی متر در معرض نور UV با مدت زمان‌های ۰ (شاهد بدون پرتو دهی)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه در یک محیط تاریک قرار داده شدند. به‌منظور ممانعت از مکانیسم ترمیم اثر جهش توسط نور (Rodrigues et al., 2009)، پتری‌ها در معرض منبع اشعه UV قرار گرفتند (Lotfy et al., 2007).

**بررسی کیفی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های والدینی و جهش یافته:** از هر یک از جدایه‌های خالص شده، از یک تک کلنی (تقریباً  $1 \times 10^7$  اسپور/ میلی لیتر) انتخاب و بر روی محیط CDA (حاوی قند گلوکز به عنوان منبع کربن جهت تولید اسیدسیتریک) در مرکز پلیت تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شد و هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۶ روز از لحاظ بروز هاله‌ی زرد ناشی از تولید اسید مورد بررسی قرار گرفتند.

**بررسی کمی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های والدینی و جهش یافته:** برای اندازه‌گیری میزان تولید اسیدسیتریک از ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت FLCM در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر استفاده شد. میزان تولید کمی اسیدسیتریک بعد از شش روز کشت مورد سنجش قرار گرفت. پس از تلقیح در حدود  $10^7$  اسپور از جدایه‌های والدینی (جدایه‌های ۱ تا ۵)، جدایه‌های جهش یافته (جدایه‌ی ۱UV تا ۵UV) و جدایه‌ی ۵UVI جهش یافته‌ی کشت چهارم در محیط فوق، نمونه‌ها روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. به‌منظور سنجش اختصاصی اسیدسیتریک از روش ماریر-بولت (روش پیریدین انیدرید استیک) استفاده شد (Marier & Boulet, 1956). برای محاسبه مقدار اسیدسیتریک از ترسیم منحنی استاندارد اسیدسیتریک با معادله خط  $y = 1/0.085x - 0/0802$  (y جذب و x غلظت گرم بر لیتر اسیدسیتریک) و ضریب تشخیص  $R = 0/98$  استفاده شد. در صورت بالا بودن غلظت اسیدسیتریک تولید شده، محلول رقیق شد و در نهایت برای محاسبه‌ی غلظت در عکس فاکتور رقت ضرب گردید.

**بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته:** میزان تولید اسیدسیتریک چهارمین کشت متوالی از جدایه‌های جهش یافته، با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتو دهی، بر روی محیط FLCM تحت همان شرایط تخمیر و کشت اولیه اندازه‌گیری شد و با ژنوتیپ

های جهش یافته کشت اول در سه تکرار از نظر آماری با روش LSD (حداقل تفاوت معنی داری) در سطح  $\alpha=0/05$  مورد مقایسه قرار گرفتند.

### بررسی توانایی (کنتیک) جدایه‌ی برتر جهش یافته در مصرف قند و تولید اسیدسیتریک: کارایی، بهره‌وری و

عملکرد تولید اسیدسیتریک جدایه‌ی برتر جهش یافته ( $\Delta uv$ )، در محیط کشت FLCM (شامل ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز با  $pH=6$ ) با تلقیح  $3 \times 10^7$  اسپور، مورد بررسی قرار گرفت. میزان قند مصرف شده در زمان تخمیر و قند باقی مانده با استفاده از روش دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Gonçalves *et al.*, 2010) اندازه‌گیری شد. برای سنجش مصرف گلوکز، از ترسیم منحنی استاندارد گرم بر لیتر گلوکز (x) و جذب (y) با معادله خط  $y=0/7697x+0/01$  با ضریب تشخیص  $R=0/98$  استفاده شد. میزان تولید اسیدسیتریک در زمان‌های ۰، ۲۴ (روز اول)، ۴۸ (روز دوم)، ۷۲ (روز سوم)، ۹۶ (روز چهارم)، ۱۲۰ (روز پنجم)، ۱۴۴ (روز ششم)، ۱۶۸ (روز هفتم) و ۱۹۲ ساعت (h) (روز هشتم) اندازه‌گیری شد.

پارامترهای کنتیکی تشکیل اسیدسیتریک و مصرف گلوکز شامل،  $Q_p$  = اسیدسیتریک تولید شده بر لیتر بر ساعت ( $gl^{-1}h^{-1}$ ) (بهره‌وری)،  $Q_s$  = گلوکز مصرف شده بر لیتر بر ساعت ( $gl^{-1}h^{-1}$ )،  $Y_{P/S}$  = (بازدهی تولید اسیدسیتریک نسبت به مصرف گلوکز) گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم گلوکز مصرف شده (عملکرد) ( $gg^{-1}$ )،  $Y_{P/X}$  = (بازدهی تولید اسیدسیتریک نسبت به تولید توده زیستی) گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده‌ی سلولی خشک تولید شده ( $gg_x^{-1}$ )،  $Y_{X/S}$  = (بازدهی تولید توده‌ی سلولی نسبت به مصرف گلوکز) گرم بر لیتر توده زیستی خشک تولید شده به گرم بر لیتر گلوکز مصرف شده ( $gl^{-1}/gl^{-1}$ )،  $q_p$  = گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده‌ی سلولی خشک بر ساعت ( $gg_x^{-1}h^{-1}$ )،  $P$  = غلظت اسید استیک تولید شده ( $gl^{-1}$ )،  $S$  = غلظت اولیه گلوکز ( $gl^{-1}$ )،  $t$  = زمان (ساعت h)،  $X$  = توده‌ی سلولی خشک ( $gl^{-1}$ )،  $\mu$  (Specific growth rate) = نرخ رشد ویژه،  $q_p$  = گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده زیستی خشک بر ساعت و  $q_s$  = گرم گلوکز مصرف شده بر گرم توده زیستی خشک بر ساعت محاسبه شد (Najafpour, 2015; Nielsen *et al.*, 2003; Panikov, 2014). برای بررسی کارایی و بهره‌وری جدایه‌ی برتر والدینی و جهش یافته در تولید اسیدسیتریک و وزن خشک توده‌ی سلولی با مقدار گلوکز مصرف شده از مدل مونود (Monod) و موزر (Moser) استفاده شد (Ardestani & Kasebkar, 2014).

### محاسبه وزن خشک توده‌ی سلولی: بعد از جمع‌آوری توده‌ی سلولی از طریق فیلتر کردن تحت خلاء محلول محیط

کشت بر روی کاغذ صافی، توده‌ی سلولی جمع‌آوری و دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. پس از فیلتر کردن نهایی توده‌ی سلولی جمع‌آوری شده، در خشک کن ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد.

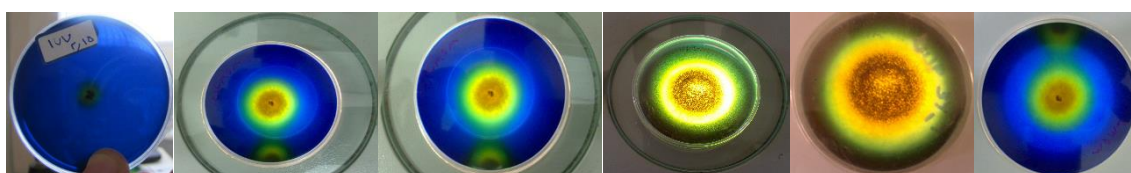
**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS v.25 و رسم نمودارها توسط نرم افزار اکسل

انجام شد. هر تیمار پرتودهی و سنجش کمی و کیفی تولید اسیدسیتریک در ۴ تکرار انجام، و میانگین و انحراف معیار (میزان خطا) محاسبه و مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ به روش دانکن انجام شد.

## نتایج

**جدا سازی و شناسایی قارچ آسپرژیلوس نایجر:** حدود ۷۰ جدایه‌ی قارچی از مجموع نمونه‌های خاک و سطح دانه‌های ذرت جدا سازی شدند. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، ۱۵ جدایه‌ی آسپرژیلوس نایجر شناسایی شدند.

**بررسی کیفی و کمی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های برتر آسپرژیلوس نایجر والدینی و جهش یافته:** ۵ جدایه‌ی برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) به همراه سوش استاندارد ۵۰۱۰ از نظر تولید کیفی اسیدسیتریک بر اساس میزان و شدت رنگ زرد تولید شده (مساحت هاله‌ی زرد رنگ) مشخص شدند. جدایه‌های برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) به همراه سوش استاندارد ۵۰۱۰ برای ایجاد جهش، در مدت زمان‌های ۰ (شاهد بدون پرتودهی)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه با غلظت پرتو (میزان شدت انرژی دریافتی) به ترتیب ۰، ۸/۹۷×۱۰<sup>-۶</sup>، ۱/۷۹×۱۰<sup>-۵</sup>، ۲/۶۹×۱۰<sup>-۵</sup>، ۳/۵۹×۱۰<sup>-۵</sup>، ۴/۴۹×۱۰<sup>-۵</sup>، ۵/۳۸×۱۰<sup>-۵</sup> و ۶/۲۸×۱۰<sup>-۴</sup> J/m<sup>2</sup> در فاصله‌ی ۳۰ سانتی متری از منبع نور تحت نوردهی با اشعه UV قرار گرفتند (جدایه‌های ۱uv تا ۵uv و ۵۰۱۰uv) (جدول ۱ و شکل ۱). جدایه‌ی ۵ جهش یافته با میزان پرتودهی ۱۲۰۰ ثانیه از نظر کیفی میزان تولید اسید بالاتری را از خود نشان داد. سوبه‌ی استاندارد ۵۰۱۰ نیز افزایش میزان تولید اسید را با افزایش زمان پرتودهی تا ۱۲۰۰ ثانیه تایید کرد. میزان تولید اسیدسیتریک در سایر جدایه‌های برتر نیز با افزایش زمان پرتودهی تا ۱۲۰۰ ثانیه، افزایش نشان داد.



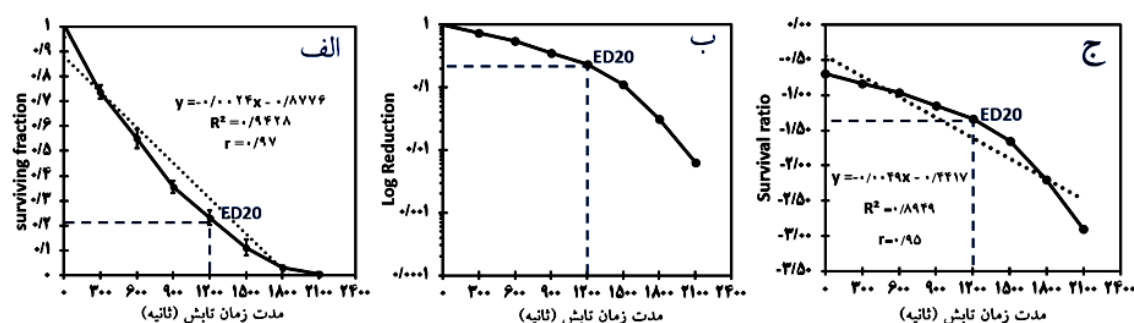
شکل ۱: مقایسه‌ی کیفی تولید اسیدسیتریک توسط آسپرژیلوس نایجر بر روی محیط CDA شش روز کشت جدایه‌ی ۵ در زمان پرتودهی با اشعه UV. راست به چپ: زمان صفر (شاهد)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ ثانیه

جدول ۱: مقایسه‌ی کیفی تولید اسیدسیتریک در محیط CDA شش روز کشت جدایه‌های برتر و در زمان‌های پرتودهی با اشعه UV (ثانیه)

قبل از جهش	۰	بعد از جهش	۳۰۰	۶۰۰	۹۰۰	۱۲۰۰	۱۵۰۰	۱۸۰۰	۲۱۰۰
جدایه ۱	+	جدایه ۱uv	+	++	++	++	+	-	-
جدایه ۲	+	جدایه ۲uv	+	+	+	++	+	-	-
جدایه ۳	+	جدایه ۳uv	+	++	++	+++	++	-	-
جدایه ۴	+	جدایه ۴uv	+	++	++	++	+	-	-
جدایه ۵	++	جدایه ۵uv	++	+++	+++	+++	++	+	-

-	-	+	+++	+++	++	++	++	سویه ۵۰۱۰ UV (شاهد)	++	سویه ۵۰۱۰ (شاهد)
UV جدایی پرتو دیده دیده، - عدم تشکیل هاله ی زرد (عدم تولید اسید)، + هاله با مساحت کم، ++ هاله با مساحت متوسط، +++ هاله با مساحت زیاد، ++++ هاله با مساحت زیادتر (تولید اسید بیشتر)										

**تعیین زمان مناسب القاء جهش با اشعه UV:** پس از رسم نمودار بقاء اسپور بر اساس زمان پرتو دهی (میزان غلظت پرتو دهی یا میزان انرژی دریافت شده توسط اسپور) (شکل ۲)، زمان بقاء ۱۲۰۰ ثانیه به عنوان بهترین زمان انتخاب شد. جدایه های جهش یافته (پرتو دیده) نسبت به جدایه های والدینی از نظر کیفی توانایی تولید اسید بالاتری را نشان دادند. سویه ۵۰۱۰ (شاهد) بعد از جهش نیز توانایی تولید اسیدسیتریک بیشتری را نشان داد. از بین جدایه های برتر، جدایه ی ۵UV (پرتو دیده)، نسبت به جدایه های والدینی توانایی تولید اسیدسیتریک بالاتری را داشت. با افزایش میزان غلظت پرتو دهی تا ۱۲۰۰ ثانیه (با غلظت پرتو  $10 \times 3/59 \text{ J/m}^2$ ) میزان تولید اسیدسیتریک به طور فزاینده افزایش یافت. با افزایش میزان غلظت پرتو دهی تا ۲۱۰۰ ثانیه معادل  $10 \times 6/28 \text{ J/m}^2$  مجدداً میزان تولید اسید به شدت کاهش نشان داد. این امر به دلیل کاهش توده ی زیستی و به دلیل کاهش بقاء اسپور بعد از افزایش غلظت پرتو دهی در ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه است. میزان حساسیت اسپور به غلظت پرتو دهی بر حسب مدت زمان تابش (میزان انرژی دریافت شده) ضریب  $x$ ، با مقدار ثابت  $k = 0.049 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  به دست آمد (شکل ۲ ج).



شکل ۲: منحنی های بقاء اسپور جدایه ی ۵UV، الف: منحنی کسر بقاء، ب: Log کاهش بقاء، ج: نسبت بقاء اسپور بر اساس زمان پرتو دهی

در بررسی کمی میزان تولید اسیدسیتریک در محیط کشت شش روزه، ابتدا یکنواختی واریانس بین جدایه های والدینی و جهش یافته با سویه استاندارد (۵۰۱۰) و پرتو دهی با زمان ۱۲۰۰ ثانیه (با توجه به بهترین نتایج کیفی) مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشخص شدن یکنواختی واریانس بین گروه های مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه به منظور مقایسه ی میانگین تولید اسیدسیتریک بین جدایه های برتر والدینی و جهش یافته (پرتو دهی شده با زمان ۱۲۰۰ ثانیه) با سوش استاندارد ۵۰۱۰ انجام شد. براساس این آزمون مشخص شد که بین جدایه های مورد بررسی تفاوت معنی دار ( $\alpha \leq 0.05$ ) از نظر تولید اسیدسیتریک وجود دارد (جدول ۲). براساس مقایسه ی میانگین به روش دانکن، جدایه های مورد بررسی از نظر تولید اسیدسیتریک در ۷ گروه قرار گرفتند. بیشترین مقدار تولید اسید مربوط به جدایه ی جهش یافته ی ۵UV و کمترین مقدار مربوط

به جدایه‌ی ۱ و جدایه‌ی ۲ با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتوده‌ی مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده و مقایسه‌ی میانگین‌ها (حروف a تا f) مشخص شد که سویه‌های جهش یافته توانایی تولید اسیدسیتریک بالاتری نسبت به سویه‌های والدینی کسب کرده‌اند (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) توسط جدایه‌های برتر و جهش یافته (uv) با زمان پرتوده‌ی ۱۲۰۰ ثانیه به روش دانکن ( $\alpha=0/05$ )

جدایه و سوش	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	جدایه ۶	جدایه ۷	جدایه ۸	جدایه ۹	جدایه ۱۰	سوش	
میانگین	۲۵/۸۶	۲۵/۴۳	۲۹/۶۴	۲۶/۲۰	۲۷/۲۰	۲۶/۶	۴۸/۱۳	۴۵/۳۲	۴۵/۸	۴۵/۹۹	۶۷/۵۲	۴۷/۸۵
انحراف معیار	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۷۵	۱/۰۵	۰/۱۹	۰/۸۲	۰/۶۷	۰/۴۴	۱/۰۷	۰/۲۸	۰/۱۰	۱/۰۰
مقایسه میانگین	f	f	d	ef	e	ef	b	c	c	c	a	b

حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار در سطح  $\alpha=0/05$  است.

مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک بین جدایه‌های برتر والدینی و جهش یافته با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتوده‌ی و سوش استاندارد نشان داد که با ایجاد جهش، میانگین میزان تولید اسیدسیتریک افزایش یافته است (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) توسط جدایه‌های برتر با والدینی جهش یافته در زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتوده‌ی

جدایه و سوش	تولید اسیدسیتریک	کمترین تولید	بیشترین تولید
جدایه‌های برتر والدینی	۳۶/۸۷	۲۶/۲۳	۲۷/۲۱
جدایه‌های برتر جهش یافته	۵۱/۰۱	۴۵/۷۷	۴۹/۴۰
سوش ۵۰۱۰ (استاندارد)	۲۶/۰۶	۲۵/۲۷	۲۶/۹۰
سوش ۵۰۱۰ (استاندارد) جهش یافته	۴۷/۸۵	۴۶/۹۲	۴۸/۹۰

در بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته، میانگین تولید اسیدسیتریک جدایه‌های جهش یافته (uv) تا ۵uv و در ۱۲۰۰ ثانیه پرتوده‌ی و در چهارمین کشت متوالی از کشت اول (۱uvr تا ۵uvr) و ۵۰۱۰uvr با زیست توده‌ی یکسان در کشت اول و چهارم از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین هر یک از جدایه نشان نداد که این می‌تواند پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته را توجیه کند (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) جدایه‌های جهش یافته در کشت اول با کشت چهارم در زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتوده‌ی به روش LSD ( $\alpha=0/05$ )

کشت اول (I)	کشت چهارم (J)	تفاوت میانگین (I-J)	سطح معنی‌داری
جدایه ۱uv	جدایه ۱uvr	۰/۳۹	ns
جدایه ۲uv	جدایه ۲uvr	-۰/۷۷	ns
جدایه ۳uv	جدایه ۳uvr	-۰/۴۹	ns
جدایه ۴uv	جدایه ۴uvr	۰/۹۴	ns

جدایه ۵UV	جدایه ۵UV	جدایه ۵UV	جدایه ۵UV
۰/۵۳ <sup>ns</sup>	-۰/۳۵	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۸۹
جدایه ۵۰۱۰UV	جدایه ۵۰۱۰UV	جدایه ۵۰۱۰UV	جدایه ۵۰۱۰UV
۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۸۹	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۸۹

ns: معنی دار نبودن

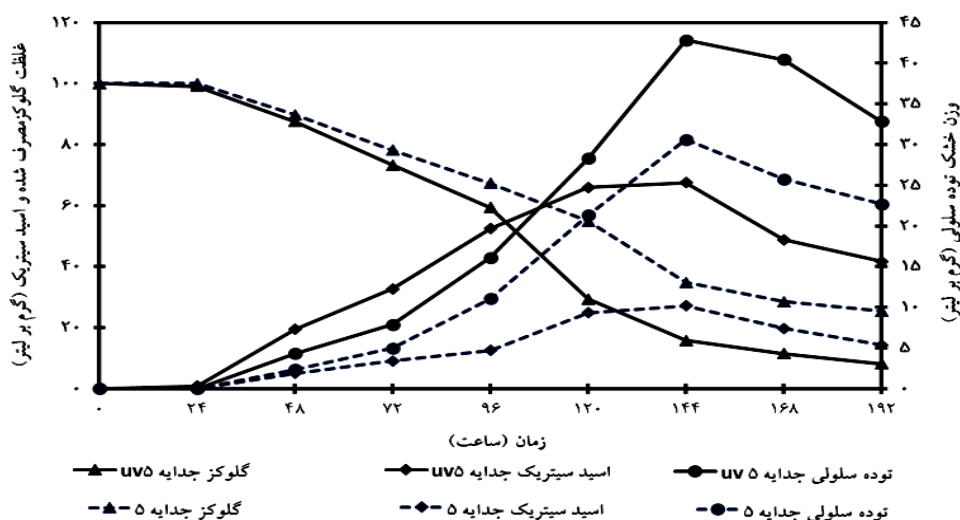
در جدایه‌ی برتر بر اساس تولید اسیدسیتریک (جدایه‌ی ۵) و بهترین زمان پرتودهی برای بقاء اسپوره‌های قارچ (۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی) (جدایه‌ی ۵UV)، توانایی و کارایی (پارامترهای کنتیکی) جدایه‌ی برتر جهش یافته ۵UV در مقایسه با جدایه‌ی والدینی (جدایه‌ی ۵) بهبود یافت. این بهبودی در تبدیل (تخمیر) قند گلوکز به‌عنوان منبع کربن به محصول (اسیدسیتریک) بر اساس مدل مونود و موزر است (جدول ۵ و شکل ۳).

جدول ۵: مقایسه‌ی تولید اسیدسیتریک (بهره‌وری) در جدایه‌ی برتر پرتو دیده با جدایه‌ی والدینی در محیط کشت FLCM با غلظت اولیه ۱۰۰ گرم بر لیتر گلوکز در روز ششم (۱۴۴ ساعت)

نمونه	P	X	S	پارامترهای کنتیکی تشکیل اسیدسیتریک				پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز			
				$Y_{p/x}$	$Q_p$	$q_p$	$\mu$	$Y_{x/s}$	$Q_s$	$q_s$	
جدایه ۵	۲۷/۲۰	۳۰/۵۹	۶۵/۲۳	۰/۴۲	۰/۸۹	۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۴۷	۰/۶۷	۰/۰۲	
جدایه ۵UV	۶۷/۵۲	۴۲/۸۴	۸۴/۲۴	۰/۸۰	۱/۵۸	۰/۷۰	۰/۰۲	۰/۵۱	۰/۸۸	۰/۰۲۱	

علائم اختصاری و کمیت‌ها در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است.

\*  $t_1=48$  ساعت،  $X_1=234$  برای جدایه ۵ و  $X_1=43$  برای جدایه ۵UV (بر اساس شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه کارایی جدایه‌ی ۵ و ۵UV در تولید اسیدسیتریک و وزن خشک توده‌ی سلولی با مقدار گلوکز مصرف شده

بر اساس جدول ۵، جدایه‌ی جهش یافته ۵UV تقریباً ۳ برابر تولید بیشتر اسیدسیتریک نسبت به جدایه‌ی والدینی داشته است. مقدار قند اولیه (گلوکز) در محیط کشت (۱۰۰ گرم بر لیتر) تعیین کننده‌ی مقدار تولید اسیدسیتریک در محیط کشت است. مقدار تولید اسیدسیتریک در محیط کشت از روز دوم با دقت قابل اندازه‌گیری است. میزان تولید اسیدسیتریک در جدایه‌ی ۵ و ۵UV در روز ششم به بیشترین مقدار خود رسیده است. اما سرعت افزایش تولید اسیدسیتریک در جدایه‌ی پرتو دیده از روز سوم (بعد از ۷۲ ساعت) به شدت افزایش نشان داده است. پارامترهای کنتیکی تشکیل اسیدسیتریک (محصول) در جدایه‌ی

۵uv (جهش یافته) تقریباً دو برابر جدایه‌ی والدینی ۵ است در حالی که پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز (سوبسترا) در جدایه‌ی پرتو دیده دیده‌ی ۵uv و والدینی آن (جدایه‌ی ۵) تقریباً مساوی است. این نتایج نشان دادند که جهش در این جدایه باعث افزایش کارایی جدایه‌ی پرتو دیده دیده‌ی ۵uv نسبت به جدایه‌ی والدینی خود در تبدیل گلوکز به اسیدسیتریک شده است (جدول ۵ و شکل ۳). ضمناً با توجه به این نکته که وزن خشک توده‌ی سلولی در جدایه ۵uv و جدایه‌ی والدینی ۵ با شیب تقریباً یکسان افزایش یافته است ولی در اثر جهش، وزن توده‌ی سلولی در جدایه‌ی پرتو دیده‌ی ۵uv در محدوده‌ی زمانی یکسان، افزایش معنی دار نشان داده است (شکل ۳).

## بحث

روش‌های متعددی برای تولید اسیدسیتریک با استفاده از منابع مختلف وجود دارد. تولید اسید با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و منبع گلوکز و روش تخمیر غوطه‌ور، بهترین و اقتصادی‌ترین روش می‌باشد و پژوهشگران متعددی سعی کردند تا با ایجاد شرایط مختلف به بالاترین بازده تولید برسند (Alvarez-Vasquez *et al.*, 2000; Sankpal *et al.*, 2001). تولید اسیدسیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* دارای مزایای دیگری نسبت به استفاده از گونه‌های دیگر قارچی است. زیرا که این قارچ به آسانی از منابع مختلف همچون خاک، آب و هوا به دست می‌آید. این قارچ توانایی تخمیر، تولید طیف وسیع، فراوان و ارزان قیمت از ترکیبات حاوی مواد قندی و همچنین عملکرد تولید بالای ۷۰٪ اسیدسیتریک را به عنوان یک میکروارگانیزم امن در صنایع مختلف دارد.

ایجاد جهش‌های تصادفی توسط اشعه UV در قارچ‌ها بستگی به میزان حساسیت اسپور در مدت زمان در معرض اشعه UV یا مقدار انرژی دریافت شده در زمان پرتو دهی دارد. حساسیت اسپور قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مرتبط با مقدار ثابت  $k$  ( $s^{-1}$ )  $(Survival\ ratio = n_t/n_0 = \exp(-kt))$  یا ثابت سرعت غیر فعال شدن (ضریب  $x$ ) که برای جدایه‌ی ۵uv برابر با  $0/0049$  به دست آمد (شکل ۲)، نشان دهنده‌ی میزان حساسیت پایین اسپور قارچ در مقابل زمان پرتو دهی است. به طوری که هر چه مقدار  $k$  کمتر باشد، نشان دهنده‌ی مقاومت اسپور قارچ در مقابل میزان غلظت پرتو دهی می‌باشد. بنابراین زمان ۱۲۰۰ ثانیه که معادل انرژی  $3/59 \times 10^{-5}$  ژول بر متر مربع است به عنوان زمان مناسب برای پرتو دهی انتخاب شد در حالی که اسپور قارچ توان تولید مثل و بقاء خود را نیز حفظ کرده است (شکل ۲). بنابراین مقدار  $k$  بسته به گونه و حتی سویه‌ی میکروبی متغیر است.

مقدار  $k$  در تحقیقات، برای *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس کربوناریوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، کلادوسپوریوم هرباروم، پنی سیلیوم جانتیلیوم و کاندیدا آلیکانس به ترتیب  $0/0251$ ،  $0/034$ ،  $0/0123$ ،  $0/012$ ،  $0/182$  و  $0/11$  گزارش شده است (Farrell *et al.*, 2009; Valero *et al.*, 2007).

ایجاد جهش توسط اشعه‌ی UV، به منظور دستیابی به بازده بالای تولید اسیدسیتریک، یک راهبرد موثر برای ایجاد سویه‌های میکروبی با کارایی بالا است (Gupta & Sharma, 1995; Wei *et al.*, 2014). در این مطالعه،



بعد از پرتودهی، گسترش ریشه‌ها کاهش و میزان تولید اسیدسیتریک افزایش معنی‌دار نشان داد؛ به‌طوری که میانگین تولید اسید توسط جدایه‌های جهش یافته، ۳۴/۲۶ درصد نسبت به جدایه‌های والدینی افزایش تولید اسیدسیتریک را نشان داد (جدول ۳ و شکل ۱). تاثیر جهش بر افزایش بازده تولید اسیدسیتریک نیز توسط لطفی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تا ۶۰/۲۵ درصد گزارش شده است (Lotfy et al., 2007).

از عوامل موثر بر تولید اسیدسیتریک مدت زمان رشد قارچ می باشد. در بررسی های انجام گرفته مشخص شده است که میزان تولید اسیدسیتریک تا روز ششم سیر صعودی داشته و از روز هفتم به بعد میزان تولید اسیدسیتریک روند ثابتی را نشان می‌دهد و سپس کاهش می‌یابد. علت ثابت ماندن و یا کاهش تولید اسیدسیتریک، در بررسی‌های انجام شده توسط محققین، کاهش و یا تمام شدن قند مصرفی در محیط کشت بیان شده است (Ikram-ul et al., 2004; Shetty, 2015).

از آنجایی که جهش باعث تغییر رفتار فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود، بنابراین بر تمامی شرایط تخمیر و تشکیل متابولیت‌ها تاثیر می‌گذارد. عوامل جهش‌زا با ایجاد تغییرات در ساختمان DNA (جهش دگر قالب) باعث جهش‌های دائمی می‌شوند. میزان تولید اسیدسیتریک نسبت به زمان، دارای یک حداکثر است؛ با عبور از نقطه حداکثر، رشد و اسپورزایی شدید توسط قارچ سبب توقف رشد می‌شود و در نتیجه تولید اسید پایین می‌آید. افزایش تعداد اسپور قارچ فرآیند تخمیر را به سمت انبوه شدن سلول و مصرف قند را به نفع تولید توده زیستی سوق می‌دهد، این امر باعث کاهش تولید محصول و در نتیجه کاهش بهره‌وری می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که جهش باعث ثابت ماندن پارامترهای مصرف گلوکز و به‌دنبال آن باعث افزایش پارامترهای تولید اسیدسیتریک در جدایه‌ی جهش یافته شده است.

## نتیجه گیری

در این بررسی سعی شد که توانایی جدایه‌های بومی *آسپرژیلوس نایجر*، با ایجاد جهش‌های تصادفی با استفاده از اشعه UV در افزایش تولید اسیدسیتریک، به‌همراه توجه به بهبود و افزایش کارایی دو مؤلفه‌ی کمی عملکرد و بهره‌وری، مورد توجه قرار گیرد. بررسی کمی فرآیندهای سلولی، ابزار حیاتی در طراحی فرآیندهای تخمیر است. دو مؤلفه‌ی عملکرد و بهره‌وری، از مهمترین مؤلفه‌های کمی هستند که چگونگی تبدیل پیش‌ساز به محصول را تعیین می‌نمایند. از آنجایی که اسیدسیتریک یک واسطه متابولیسم در تولید انرژی است، در یک جدایه‌ی جهش یافته‌ی ژنتیکی (پایدار) مانند جدایه‌ی ۵UV، ممکن است تجمع اسیدسیتریک از طریق تشکیل زیست توده، به دلیل ایجاد عدم تعادل متابولیکی انجام شود. علت احتمالی این است که سطوح پایین فعالیت آنزیم آکونیتاز در چنین سلول‌های جهش یافته، منجر به کاهش غیر طبیعی میزان مصرف سیترات شود. با توجه به بررسی انجام شده در خصوص پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز (به عنوان سوبسترا) و تولید اسیدسیتریک (به عنوان محصول)

جهش‌های تصادفی پایدار، توانایی افزایش کارایی تبدیل سوبسترا به محصول را در این جدایه‌ی *آسپرژیلوس نایجر* (جدایه ۵) ایجاد کرده است.

## سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان انجام شده است.

## منابع

- Alvarez-Vasquez, F., González-Alcón, C., & Torres, N. V. (2000). Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: Model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 82-108. doi:10.1002/1097-0290(20001005)70:1<82::AID-BIT10>3.0.CO;2-V
- Ardestani, F., & Kasebkar, R. (2014). Non-Structured Kinetic Model of *Aspergillus niger* Growth and Substrate Uptake in a Batch Submerged Culture. *British Biotechnology Journal*, 4(9), 970-979. doi:10.9734/bbj/2014/11472
- Farrell, H., Garvey, M., & Rowan, N. (2009). Studies on the inactivation of medically important *Candida* species on agar surfaces using pulsed light. *FEMS yeast research*, 9(6), 956-966. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00543.x
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046-2048. doi:10.1039/c0ay00525h
- Guchi, E., Ayalew, A., Dejene, M., Ketema, M., Asalf, B., & Fininsa, C. (2014). Occurrence of *Aspergillus* Species in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) along the Value Chain in Different Agro-Ecological Zones of Eastern Ethiopia. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2(6), 309-317. doi:10.12691/jaem-2-6-7
- Gupta, S., & Sharma, C. B. (1995). Citric acid fermentation by the mutant strain of the *Aspergillus niger* resistant to manganese ions inhibition. *Biotechnology Letters*, 17(3), 269-274. doi:10.1007/BF01190635
- Ikram-ul, H., Ali, S., Qadeer, M., & Iqbal, J. (2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology*, 93(2), 125-130. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.018
- Joiner, M. C. (2009). Quantifying cell kill and cell survival. In *Basic clinical radiobiology* (Vol. 4, pp. 41-55): Taylor and Francis.
- Khurshid, S., Ali, S., Ashraf, H., Qadeer, M., & Rajoka, M. I. (2001). Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 35-37. doi:10.1023/A:1016625130070
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, 98(18), 3464-3469. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.007
- Marier, J., & Boulet, M. (1956). Direct determination of citric acid in milk by an improved pyridine acetic anhydride method. *J Dairy Sci*, 41, 1683-1692.

- Matsuya, Y., Tsutsumi, K., Sasaki, K., & Date, H. (2015). Evaluation of the cell survival curve under radiation exposure based on the kinetics of lesions in relation to dose-delivery time. *Journal of Radiation Research*, 56(1), 90-99. doi:10.1093/jrr/rru090
- Najafpour, G. (2015). Growth Kinetics. In *Biochemical Engineering and Biotechnology* (pp. 81-169): Elsevier.
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). Modeling of Growth Kinetics. In *Bioreaction Engineering Principles: Second Edition* (pp. 235-314). Boston, MA: Springer US.
- Nyongesa, B. W., Okoth, S., & Ayugi, V. (2015). Identification key for *Aspergillus* Species isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology*, 05(04), 205-229. doi:10.4236/aim.2015.54020
- Panikov, N. S. (2014). Kinetics, microbial growth. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Vol. 1-5). Wiley.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519): Springer.
- Rattanakul, S., & Oguma, K. (2018). Inactivation kinetics and efficiencies of UV-LEDs against *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, and surrogate microorganisms. *Water research*, 130(2018), 31-37. doi:10.1016/j.watres.2017.11.047
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P., Teodoro, J., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2009). Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158(1), 72-87. doi:10.1007/s12010-008-8370-5
- Sankpal, N., Joshi, A., & Kulkarni, B. (2001). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphology and fermenter conditions on productivity. *Process Biochemistry*, 36(11), 1129-1139. doi:10.1016/S0032-9592(01)00155-8
- Shetty, V. (2015). Production and optimization of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses and corncob. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 152-157.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141-149.
- Valero, A., Begum, M., Leong, S., Hocking, A., Ramos, A., Sanchis, V., & Marin, S. (2007). Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 238-243. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x
- Wei, H., Jihong, C., Wenjian, L., Jing, L., Shuyang, W., Juofang, W., & Dong, L. (2014). Mutant breeding of *Aspergillus niger* irradiated by 12C6+ for hyper citric acid. *Nuclear Science and Techniques*, 25(2), 20302-20302. doi:10.13538/j.1001-8042/nst.25.020302
- Zulkifli, N. A., & Zakaria, L. (2017). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 26-34. doi:10.1016/j.hjb.2017.05.002

## Investigation of increase of Citric acid produced by *Aspergillus niger* native mutant strains

S.M.R. Khoshroo<sup>1\*</sup>

Received:2018.10.16

Accepted:2019.12.7

### Abstract

*Aspergillus niger* was isolated from the soil and surface of corn seeds purified and identified according to morphological characteristics. The irradiation rate was calculated based on the duration of UV radiation in Jules per square meter. The specific method of Marier and Boulet was used to quantitatively measure the production of Citric acid. Radiation with 1200 seconds showed the greatest effect on the increase of production of Citric acid. The mean production of Citric acid in the preferable mutated isolates and parents cultures were 51.01 and 37.87 mg/l respectively, which increased by 14.14 g/l. In the study of the stability of mutated genotypes, the mean production of Citric acid with 1200 seconds of radiation in the fourth consecutive culture of the first culture was not statistically significant. The performance and efficiency of mutated isolates (5uv) showed an increase in the production of Citric acid by about 3 times compared to parent isolates. In isolation of 5uv and its parents, the kinetic parameters of product formation (Citric acid) were twice as much and the kinetic parameters of the substrate (glucose consumption) were approximately equal compared to parent isolates, while the dry weight of cell mass in the isolate 5uv increased relatively to the parental isolate 5 with the same gradient. In this study, it was found that random mutations with UV radiation have improved the kinetic parameters of the production of Citric acid versus glucose consumption as a substrate.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Citric acid, Mutation, UV radiation.

## بررسی تنوع گونه‌های گیاهی در طول گرادیان ارتفاعی کوه نوا، استان کرمانشاه

محمد مهدی دهشیری<sup>۱\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

### چکیده

در مدیریت اکوسیستم‌ها، تعیین عوامل موثر بر پراکنش گونه‌های گیاهی و تنوع گونه‌ای بسیار حائز اهمیت است. به منظور مطالعه تنوع زیستی گیاهی در ارتفاعات مختلف، کوه نوا واقع در ۱۰ کیلومتری دالاهو انتخاب شد. بدین منظور، ۲۴۰ قطعه نمونه به صورت توزیع سیستماتیک-تصادفی، بر اساس روش حداقل مساحت، انتخاب گردید. کل قطعه نمونه‌ها به سه طبقه ارتفاعی تقسیم‌بندی شدند. برای بررسی اختلاف طبقات ارتفاعی از نظر شاخص‌های تنوع و غنای گونه‌ای، از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. در مجموع ۱۷۷ گونه متعلق به ۱۲۸ سرده و ۳۷ تیره شناسایی شدند. تروفیت‌ها با ۶۹ گونه (۳۸/۹۸ درصد) فراوان‌ترین شکل زیستی بودند. نتایج بیانگر آن بود که بیشترین تعداد گونه در طبقه ارتفاعات پایینی (۱۶۰۰ تا ۱۹۰۰ متر) است و گونه‌های ناحیه رویشی ایرانی-تورانی بیشترین سهم را به خود اختصاص داده‌اند. آنالیز واریانس شاخص‌های تنوع زیستی در طبقات ارتفاعی مختلف نشان داد شاخص‌های غنای گونه‌ای دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ است و شاخص‌های تنوع دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشند. در مجموع نتایج نشان داد که ارتفاع از سطح دریا بر غنا و تنوع گونه‌ای تأثیر معنی‌داری دارد و کمترین میزان غنا و تنوع گونه‌ای در ارتفاعات بالا است.

**واژه‌های کلیدی:** ایران، تنوع زیستی، زاگرس میانی، عوامل فیزیوگرافیک.

### مقدمه

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران  
\*(نویسنده مسئول: dehshiri2005@yahoo.com)

تنوع زیستی رویشگاه، متأثر از عوامل محیطی است. عوامل اقلیمی مانند رطوبت و درجه حرارت می‌توانند عوامل بسیار مؤثری در تنوع گونه‌ای باشند (Tavili and Jafari, 2009). یکی از جنبه‌های مهم حفاظت از تنوع زیستی، درک مکانیسم تأثیر عوامل توپوگرافی از قبیل ارتفاع از سطح دریا بر تنوع زیستی است که می‌تواند تأثیر بسزایی در شناخت نحوه اثر آن‌ها بر پراکنش گیاهان هر منطقه داشته باشد. بررسی تنوع گونه‌ای در میان مناطقی با ارتفاع مختلف می‌تواند نشان دهد که چگونه ساختار جامعه با فشارهای محیطی زنده و غیرزنده دستخوش تغییر می‌شود. در نواحی کوهستانی، پراکنش و توزیع گونه‌ها بیشتر تحت تأثیر عوامل توپوگرافی است که خود عامل تغییر در خرد اقلیم و خصوصیات خاکی می‌باشد. فیزیوگرافی (سیمای ظاهری) در مناطق مختلف کوهستانی از عوامل مؤثر بر تنوع گونه‌های گیاهی قلمداد شده است. هر چند، میزان اثرگذاری هر یک از مولفه‌های آن در مناطق مختلف متفاوت است (چراغی و همکاران، ۱۳۹۶ ب).

رویشگاه‌های کوهستانی استان کرمانشاه به‌عنوان بخشی از سلسله جبال عظیم زاگرس می‌باشند که وسعتی بالغ بر ۲۴۹۰۹۵۰ هکتار را تحت پوشش قرار داده‌اند (نعمتی پیکانی و جلیلیان، ۱۳۹۱). بر اساس آخرین آمار تخمین زده می‌شود ۲۰ درصد از سطح استان (حدود ۵۰۰۰۰۰ هکتار) پوشیده از جنگل باشد. امتداد جنگل‌های کرمانشاه از طرف جنوب به جنگل‌های ایلام، لرستان و چهارمحال بختیاری می‌رسد و با آن‌ها مخلوط می‌گردد و از طرف غرب و شمال غرب پس از پیوند با جنگل‌های کردستان به جنگل‌های شمال عراق متصل می‌شود (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۶).

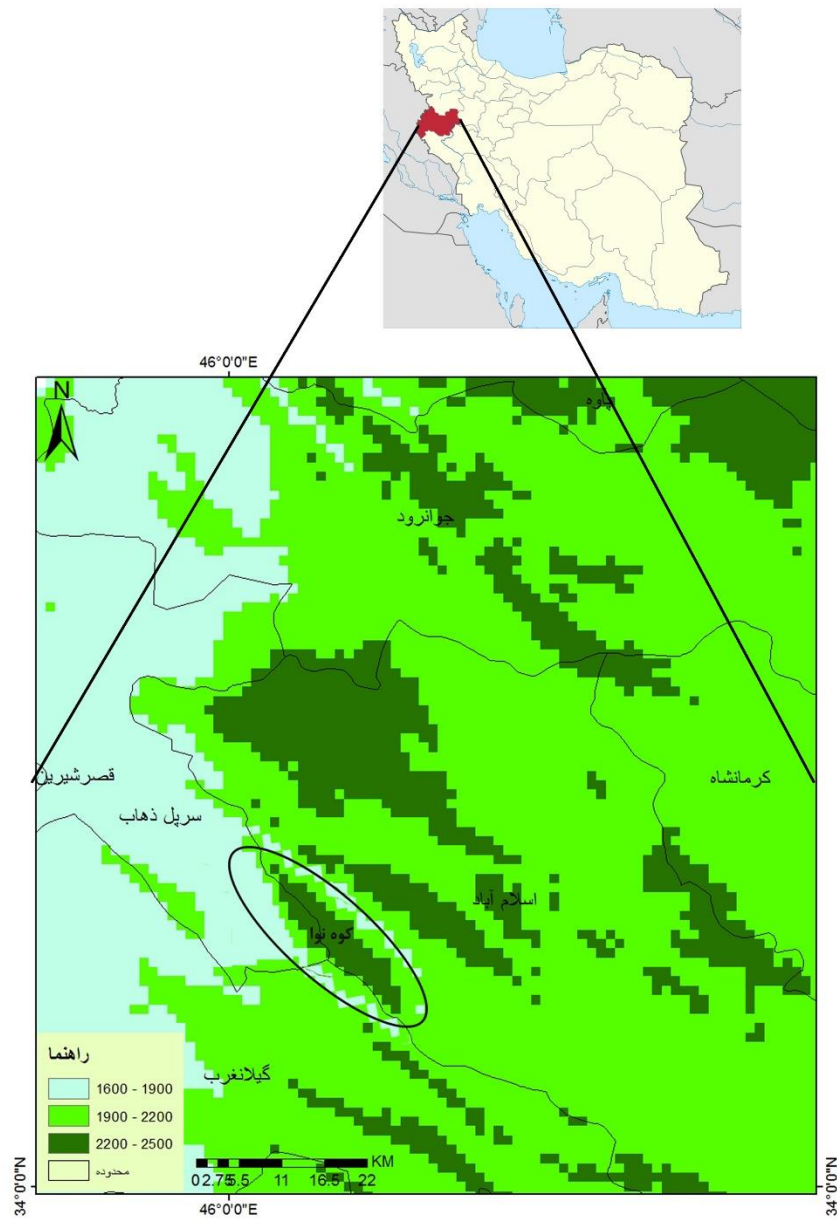
طی سال‌های گذشته مطالعاتی در زمینه‌ی ارتباط ارتفاع با تنوع و غنای گونه‌ای در مناطق مختلف استان کرمانشاه صورت گرفته است (سهرابی و اکبری‌نیا، ۱۳۸۴؛ پرما و شتایی جویباری، ۱۳۸۹؛ سخاوتی و همکاران، ۱۳۹۲؛ سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Faramarzi, 2009, Mahdavi et al., 2012; Karami et al., 2015). لیکن هنوز مناطق بسیاری وجود دارند که پوشش گیاهی آن‌ها کمتر به‌طور تخصصی مورد بررسی و توجه قرار گرفته است. کوه نوا (نور) در جنوب غربی استان کرمانشاه از مناطقی است که این پژوهش برای اولین بار در این منطقه صورت گرفته است. از عوامل مؤثر بر انتخاب این کوه می‌توان به دلایل متعددی همچون نزدیک بودن به شهرستان دالاهو و تأثیر آب و هوایی آن بر این شهر اشاره کرد. از طرفی این کوه از نظر زمین‌شناسی چین‌خوردگی‌های متعددی دارد و اختلاف ارتفاعی پست‌ترین و مرتفع‌ترین نقطه آن ۹۰۰ متر است. چنین وضعیت توپوگرافیکی طبیعتاً باعث آشیان‌گزینی گونه‌های متعددی با فراوانی‌های مختلف در جای‌جای آن می‌گردد و به‌تبع آن تنوع گونه‌های گیاهی مختلفی را در ارتباط با عوامل توپوگرافی مانند ارتفاع ایجاد خواهد کرد (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۶). تحقیق حاضر با هدف بررسی، محاسبه و مقایسه‌ی شاخص‌های غنا و تنوع گونه‌ای در سه طبقه ارتفاعی کوه نوا و به‌منظور تعیین نقش عامل ارتفاع بر تنوع و غنای گونه‌ای گیاهان منطقه انجام گرفته است. در واقع تحقیق تنوع گونه‌ای کوه نوا در گرادیان‌های مختلف ارتفاع از سطح دریا تلاشی برای درک تأثیرات متقابل پوشش گیاهی و محیط غیر زنده است. همچنین نتایج این گونه پژوهش‌ها می‌تواند

اطلاعات پایه را برای بررسی تأثیر تغییر اقلیم روی الگوهای تنوع گونه‌ای در اختیار قرار دهد تا بدین وسیله بتوان با دیدی بهتر نسبت به احیا و همچنین مدیریت منطقی این اکوسیستم اقدام نمود.

## مواد و روش‌ها

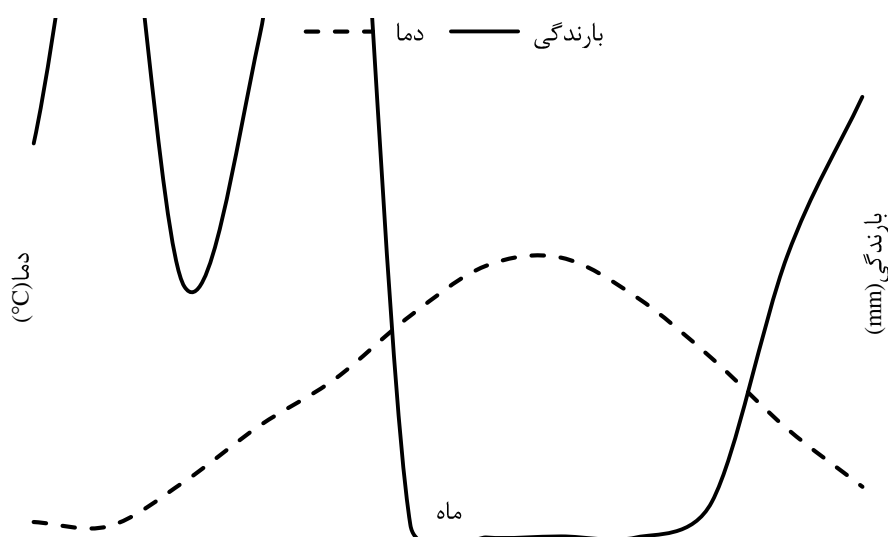
### موقعیت منطقه‌ی مورد مطالعه

این منطقه دارای مساحتی حدود ۷۰۰۰ هکتار است که بین طول شرقی ۴۶ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۴۶ درجه و ۲۰ دقیقه و عرض شمالی ۳۴ درجه و ۱۳ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۱۷ دقیقه قرار دارد (شکل ۱). حداکثر ارتفاع آن ۲۵۰۰ متر و حداقل آن ۱۶۰۰ متر است. از لحاظ خاک‌شناسی، خاک منطقه بیشتر از نوع شنی-رسی است. بر اساس آمار ایستگاه هواشناسی شهرستان دالاهو، که در ۱۰ کیلومتری کوه نوا قرار دارد، میانگین بارش سالیانه ۳۴۸/۱ میلی‌متر طی دوره آماری ده‌ساله بوده است. متوسط دمای حداکثر گرمترین ماه، متوسط دمای حداقل سردترین ماه و متوسط دمای سالیانه شهرستان دالاهو به ترتیب ۳۷/۵۷، ۱۰/۱۳- و ۱۳/۷۲ درجه سانتی‌گراد است. اقلیم این شهرستان با روش دومارتن، نیمه خشک و با روش آمبرژه، نیمه خشک سرد تعیین می‌شود. بر اساس منحنی آمبروترمیک در ماه‌های آبان تا اردیبهشت، بارندگی بر دما فزونی می‌یابد. لذا این دوره را می‌توان دوران مرطوب سال به حساب آورد. از خرداد ماه لغایت مهرماه، دمای هوا بیش از بارندگی است. از این‌رو این دوره جزء دوران خشک سال به حساب می‌آید (شکل ۲) (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۶).



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی کوه نوا در استان کرمانشاه (نقشه 1:400,000) (USGS, 2018)





شکل ۲: منحنی آمبروترمیک شهرستان دالاهو (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۶)

### روش نمونه برداری

ابتدا نقشه توپوگرافی در مقیاس ۱:۴۰۰۰۰۰ تهیه و موقعیت منطقه بر روی آن مشخص شد. برای مطالعه‌ی تنوع و غنای گونه‌ای در طبقات ارتفاعی، قطعات نمونه بصورت سیستماتیک-تصادفی در امتداد سه طبقه ارتفاعی در محدوده‌ی ارتفاعی ۱۶۰۰ متر تا ۲۵۰۰ متر برداشت شد. با توجه به تغییرات نوع پوشش گیاهی در طول گرادیان ارتفاعی، سایت‌هایی که از لحاظ پوشش گیاهی درصد بیشتری را دارا بودند و از نظر سایر ویژگی‌های توپوگرافی (از قبیل شیب، جهت و ...) شرایط یکسانی داشتند به عنوان منطقه‌ی معرف در هر طبقه انتخاب گردیدند. در اواخر خرداد و اوایل تیر ماه سال ۱۳۹۰، در مناطق کلیدی هر طبقه ارتفاعی، ۱۶ ترانسکت به طول ۱۰۰ متر عمود بر جهت شیب (برای کاهش تغییرات پوشش گیاهی در طول ترانسکت‌ها) مستقر گردید و برای بررسی پوشش گیاهی در امتداد هر ترانسکت از پنج قطعه نمونه‌ی مربعی شکل به ابعاد دو متر استفاده شد. برای گونه‌های درختی و درختچه‌ای از ابتدا، وسط و انتهای هر ترانسکت در قطعه نمونه‌های مربعی با ابعاد ۲۰ متر برداشت و شناسایی شد (چراغی و همکاران، ۱۳۹۶ الف). در مجموع ۲۴۰ قطعه نمونه در منطقه‌ی مورد مطالعه مشخص شد. در هر یک از قطعات نمونه فهرست گیاهان موجود (تعداد گونه)، ارتفاع از سطح دریا و جهت جغرافیایی با استفاده از موقعیت‌یاب به‌طور دقیق ثبت شد. نمونه‌ها با استفاده از فلور ایرانیکا (Rechinger, 1963-2015)، فلور عراق (Townsend & Guest, 1966-1985)، فلور ترکیه (Davis, 1965-1988) و فلور ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۹۷-۱۳۶۷) مورد شناسایی قرار گرفتند و صحت نام‌های علمی و مولف آن‌ها کنترل و محدوده‌ی تمام تیره‌ها طبق جدیدترین طبقه‌بندی‌های سیستماتیکی تطبیق داده شدند و برحسب تیپ بیولوژیکی و طول عمر طبقه‌بندی شدند (Raunkiaer, 1934). پراکنش جغرافیایی عناصر گیاهی با استفاده از فلورهای مذکور و منابع موجود

در زمینه‌ی جغرافیای گیاهی ایران از جمله زهری (Zohary, 1973)، تختجان (Takhtajan, 1986) و لئونارد (Léonard, 1989) تعیین شد. این نمونه‌های گیاهی در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد نگهداری می‌شوند.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای سنجش میزان غنای گونه‌ای از شاخص‌های تعداد گونه، منهینیک<sup>۱</sup> و مارگالف<sup>۲</sup> استفاده شد. تنوع گونه‌ای با استفاده از شاخص‌های سیمپسون<sup>۳</sup>، شانن-وینر<sup>۴</sup>، بریلوئین<sup>۵</sup> و برگر-پارکر<sup>۶</sup> محاسبه شد که اختلاف این شاخص‌ها در حساسیت آن‌ها به تغییرات گونه‌های نادر و غالب است (جدول ۱). برای محاسبه شاخص‌های تنوع و غنای گونه‌ای ابتدا داده‌ها را وارد Excel می‌نماییم سپس تمام محاسبات مربوط به انواع شاخص‌های تنوع و غنای گونه‌ای در محیط نرم‌افزاری PAST V.2.7 انجام می‌گیرد. پس از محاسبه این شاخص‌ها برای هر یک از قطعات نمونه، در مرحله بعد به منظور بررسی اختلاف طبقات ارتفاعی از نظر تنوع و غنای گونه‌ای از آنالیز واریانس یک طرفه و به منظور مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون مقایسه‌ی چند دامنه‌ای دانکن در محیط نرم‌افزار SPSS V.19 استفاده گردید.

جدول ۱: فرمول‌های شاخص‌های غنای گونه‌ای و تنوع زیستی استفاده شده در این مطالعه (اقتباس از اجتهادی و همکاران، ۱۳۹۱)

معیار	شاخص	فرمول
غنای گونه‌ای	منهینیک	$D_{Mn} = \frac{S}{\sqrt{N}}$
	مارگالف	$D_{Mg} = \frac{S-1}{LnN}$
تنوع گونه‌ای	سیمپسون (1-D)	$I-D = I - \sum_{i=1}^s (P_i)^2$
	شانن-وینر	$H^{\square} = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$
	بریلوئین	$H^{\square} = \frac{1}{N} \log\left(\frac{N!}{n_1!n_2!n_3!\dots}\right)$
	برگر-پارکر	$D = N_{max}/N$

k: تعداد کل گونه‌ها، N: تعداد کل افراد،  $P_i$ : نسبت یا وفور افراد گونه  $i$  ام که بر حسب نسبتی از کل افراد است،  $n_1$ : تعداد افراد متعلق به گونه ۱،  $n_2$ : تعداد افراد متعلق به گونه ۲،  $N_{max}$ : تعداد افراد در گونه‌ای که دارای حداکثر فراوانی است

## نتایج و بحث

از آنجایی که گیاهان دائماً تحت تأثیر عوامل اقلیمی و خاکی قرار دارند، بنابراین رشد و نمو و تنوع آنها تحت تأثیر عوامل مذکور است به طوری که هر گونه گیاهی در طول زمان دارای ویژگی اکولوژیک خاص خودش و از آشیان بالقوه و بالفعل برخوردار است. بنابراین عوامل محیطی متفاوت سبب تغییر در فلور نواحی مختلف می‌شوند (اسدی و دادخواه، ۱۳۸۹). یکی از

<sup>1</sup> Menhing

<sup>2</sup> Margalof

<sup>3</sup> Simpson

<sup>4</sup> Shannon-Wiener

<sup>5</sup> Brillouin

<sup>6</sup> Berger-Parker

مهم‌ترین عوامل اکولوژیک موثر در شکل‌دهی تنوع و غنای گونه‌ای در اکوسیستم، ارتفاع از سطح دریا می‌باشد. به‌طوری‌که نقش این عامل در حضور یا حذف گونه‌های گیاهی بارز است (کاظم‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

در کوه نوا تعداد ۱۹ گونه چوبی و ۱۵۸ گونه علفی و در مجموع تعداد ۱۷۷ گونه متعلق به ۱۲۸ سرده و ۳۷ تیره گیاهی در طول گرادیان ارتفاعی شناسایی شد. تیره‌های کاسنیان Asteraceae و باقلائیان Fabaceae هر یک با ۲۶ گونه (هر کدام ۱۶/۶۹ درصد) بیشترین تعداد گونه‌ها را به‌خود اختصاص دادند. علت حضور بالای گونه‌های این دو تیره در کل منطقه‌ی مورد مطالعه، دامنه بردباری وسیع گونه‌های آن‌ها نسبت به شرایط اکولوژیکی نامساعد است. گرده‌افشانی گیاهان این دو تیره اغلب به‌وسیله‌ی حشرات صورت می‌گیرد. به این ترتیب، به نظر می‌رسد که گرده‌افشانی به‌وسیله‌ی حشرات یکی از عوامل مهم پراکنش و فراوانی زیاد آن‌ها نسبت به سایر تیره‌ها باشد. بیشتر بودن تعداد گونه‌های این دو تیره در طبقه‌ی ارتفاعی پایین نسبت به دو طبقه‌ی ارتفاعی دیگر، می‌تواند مربوط به شیب کمتر و در نتیجه عمق خاک بیشتر، خصوصیات مطلوب‌تر خاک در این موقعیت فیزیوگرافی و افزایش تراکم بذور ذخیره شده، باشد (چراغی و همکاران، ۱۳۹۷).

نتایج تجزیه‌ی واریانس و آزمون دانکن بین طبقات ارتفاعی از نظر شاخص‌های مختلف غنای گونه‌ای در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است بین طبقات ارتفاعی از نظر شاخص‌های غنای منهینیک و مارگالف در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین شاخص‌های تنوع سیمپسون، شانن-وینر، بریلوئین و برگر-پارکر نیز در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشند (جدول ۳). روند این تغییرات به گونه‌ای است که در تمام شاخص‌های تنوع و غنای گونه‌ای کمترین مقدار در کلاس ارتفاعی ۲۵۰۰-۲۲۰۰ متر دیده شد. این نتایج با برخی گزارش‌ها در خصوص کاهش تنوع و غنای گونه‌ای در ارتفاعات بالا، مطابقت دارد (Neumann & Stalinger, 2001; Grytnes & Vetaas, 2002; Chawla *et al.*, 2008; Sang, 2009). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در ارتفاعات پایینی و میانی تنوع و غنای گونه‌ای بیشتر است که به‌خاطر بالاتر بودن دما و مساعد بودن شرایط از نظر درجه حرارت در این طبقات ارتفاعی و نیز تنش کمتر نسبت به ارتفاعات بالا است. همچنین کاهش تنوع و غنای گونه‌ای در ارتفاعات بالا (بالای ۲۲۰۰ متر) به دلیل شرایط اکولوژیکی محلی مانند کاهش میانگین دمای فصلی و سالانه و در نتیجه سردی بیش از حد هوا و یخ‌زدگی سطح زمین در ماه‌های سرد سال، تنش خشکی و تشعشعات ماوراء بنفش می‌باشد (آتشگاهی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Barnes *et al.*, 1997). از طرفی با افزایش ارتفاع در منطقه، عمق خاک کاهش می‌یابد و فرصت نفوذ آب کم می‌شود و نزولات بیشتر به‌صورت هرزآب حرکت می‌نماید که باعث فرسایش و شستشوی خاک این مناطق می‌شود و در دراز مدت پدیده خاک‌سازی کمتر اتفاق می‌افتد. ایجاد چنین شرایطی می‌تواند بر غنای گونه‌های گیاهی در ارتفاعات بالا اثرات منفی داشته باشد (حاجی میرزا آقایی و همکاران، ۱۳۹۰؛ کاظم‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۲: آنالیز واریانس و مقایسه‌ی میانگین مقادیر شاخص‌های غنای گونه‌ای در ارتباط با ارتفاع از سطح دریا، کوه نوا

شاخص‌های غنای گونه‌ای			طبقات مختلف اجزاء فیزیوگرافی	منبع تغییرات
تعداد گونه	شاخص منهینیک	شاخص مارگالف		
۹۳ <sup>a</sup>	۶/۱۳±۱/۱۹ <sup>a</sup>	۱۰/۲۴±۳/۰۸ <sup>a</sup>	۱۶۰۰-۱۹۰۰	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۸۹ <sup>a</sup>	۶/۲۷±۰/۷۲ <sup>a</sup>	۱۰/۴۹±۱/۸۴ <sup>a</sup>	۱۹۰۰-۲۲۰۰	
۴۶ <sup>b</sup>	۴/۲۹±۰/۳۳ <sup>b</sup>	۵/۹۸±۰/۶۶ <sup>b</sup>	۲۲۰۰-۲۵۰۰	
۵/۱۰۲ <sup>*</sup>	۷/۱۵۵ <sup>*</sup>	۵/۷۸۸ <sup>*</sup>		F
۰/۰۳۳	۰/۰۱۴	۰/۰۲۴		P

\*\* معرف معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد، \* معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و علامت <sup>ns</sup> عدم معنی‌دار بودن است

جدول ۳: آنالیز واریانس و مقایسه‌ی میانگین مقادیر شاخص‌های تنوع گونه‌ای در ارتباط با ارتفاع از سطح دریا، کوه نوا

شاخص‌های مختلف تنوع				طبقات مختلف اجزاء فیزیوگرافی	منبع تغییرات
بریلوئین	شانن-وینر	سیمپسون (1-D)	برگر-پارکر		
۲/۶۷±۰/۳۴ <sup>a</sup>	۳/۶۰±۰/۳۶ <sup>a</sup>	۰/۹۷۱±۰/۰۰۹ <sup>a</sup>	۰/۰۲۸±۰/۰۰۹ <sup>b</sup>	۱۶۰۰-۱۹۰۰	
۲/۷۳±۰/۲۱ <sup>a</sup>	۳/۶۶±۰/۲۲ <sup>a</sup>	۰/۹۷۳±۰/۰۰۵ <sup>a</sup>	۰/۰۲۶±۰/۰۰۵ <sup>b</sup>	۱۹۰۰-۲۲۰۰	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۲/۰۳±۰/۱۴ <sup>b</sup>	۲/۹۰±۰/۱۵ <sup>b</sup>	۰/۹۴۴±۰/۰۰۸ <sup>b</sup>	۰/۰۵۵±۰/۰۰۸ <sup>a</sup>	۲۲۰۰-۲۵۰۰	
۹/۵۵۴ <sup>**</sup>	۹/۹۱۰ <sup>**</sup>	۱۵/۷۸۶ <sup>**</sup>	۱۵/۷۲۳ <sup>**</sup>		F
۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱		P

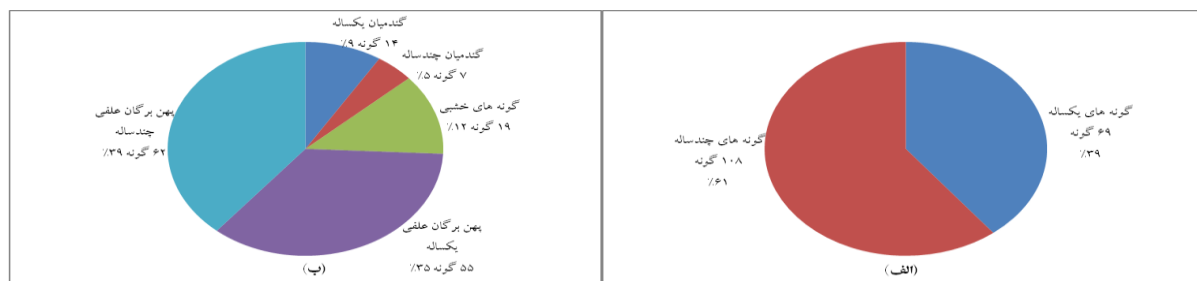
\*\* معرف معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد، \* معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد و علامت <sup>ns</sup> عدم معنی‌دار بودن است

میزان عددی شاخص‌های شانن-وینر و سیمپسون به ترتیب ۴/۵-۰ و ۱-۰ می‌باشد. اگر فقط یک گونه در قطعه نمونه حضور داشته باشد و یا جامعه دارای استرس یا تخریب باشد، این دو شاخص برابر صفر خواهند بود. اما زمانی که جامعه دور از آلودگی و استرس باشد، میزان این دو شاخص حداکثر است. در واقع هر چه شاخص‌های شانن-وینر و سیمپسون کمتر باشند، گویای شرایط سخت جامعه‌اند (نظری عنبران و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به نتایج به‌دست آمده، کل منطقه دارای شرایط مطلوب می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی شدت کم تخریب در کل عرصه‌های مورد بررسی است.

جنگل‌های بلوط با گونه‌ی غالب بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) پوشش گیاهی عمده‌ی این رشته کوه را به‌ویژه در شیب‌های شمالی تشکیل می‌دهند که تا ارتفاع ۲۲۰۰ متری ادامه پیدا می‌کنند. گیاهان درختی و درختچه‌ای به ترتیب در طبقات ارتفاعاتی ۱۹۰۰-۲۲۰۰ و ۱۶۰۰-۱۹۰۰ متر دارای بیشترین تعداد می‌باشد. خط رویش جنگل‌های بلوط در غرب کشور ۱۹۰۰-۲۰۰۰ متر است (Zohary, 1973). تمام گونه‌های درختی و درختچه‌ای در طبقه ارتفاعی بالایی (۲۲۰۰-۲۵۰۰ متر) حضور نداشتند. به نظر می‌رسد کاهش میزان خاک و دما از مهم‌ترین عوامل عدم حضور درختان و درختچه‌ها در ارتفاعات بالا باشد (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۵). غبیت گونه‌های *Lonicera nummulariifolia* Jaub. & Spach, *Pistacia atlantica* Desf. *Rosa canina* و *Prunus microcarpa* C.A.Mey. *Prunus lycioides* C.K.Schneid. *Rhamnus pallasii* Fisch. & C.A.Mey.

ل.در ارتفاع پایین‌تر از ۱۹۰۰ متر محسوس بود. یکی از دلایل کم بودن درختان در طبقه ارتفاعی پایین نسبت به طبقه ارتفاعی میانی، دسترسی راحت‌تر مردم محلی و استفاده از چوب برخی از آن‌ها جهت تهیه سوخت می‌باشد.

در کل منطقه‌ی مورد مطالعه درصد گیاهان چندساله بیشتر از گیاهان یکساله است (شکل ۳-الف). فرم رویشی پهن‌برگان علفی چندساله بیشترین درصد را به خود اختصاص داده است (شکل ۳-ب). گیاهان خشبی و بالشتکی که چندساله می‌باشند با مناطق بادگیر و خشک دارای تشعشعات زیاد خورشیدی، سازگار هستند و مقاومت زیادی به چرا دارند (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۵). کاهش تعداد گیاهان یکساله در ارتفاعات بالاتر به دلیل تحمل کمتر نسبت به سرما و یخبندان است (اسدی و دادخواه، ۱۳۸۹). نتایج حاکی از آن است که گیاهان یکساله فرم رویشی غالب در دو طبقه ارتفاعی ۱۶۰۰-۱۹۰۰ و ۲۲۰۰-۱۹۰۰ متر می‌باشند. گونه‌های علفی *Dactylis glomerata* L.، *Stachys pilifera* Benth. و *Crepis sancta* (L.) Babc. با بالاترین حضور در ۷۵ درصد قطعات نمونه حضور دارند. همانند تحقیق حاضر، در بررسی پوشش گیاهی کوهستان‌های شرق هیمالیا نیز بیشترین مقدار تنوع گونه‌های درختی و کمترین مقدار تنوع گونه‌های علفی در ارتفاعات میانی (به دلیل وجود درختان بیشتر نسبت به طبقه ارتفاعی پایین‌تر و سایه ناشی از آن‌ها) گزارش شده است (Salick et al., 2004). تنوع بالای گونه‌های علفی در طبقه‌ی ارتفاعی پایین‌تر به خاطر عواملی همچون عمق، دما و رطوبت خاک در کنار کاهش تعداد درختان و سایه‌اندازی آن‌ها و تخریب کم ناشی از حضور دام‌ها می‌باشد.

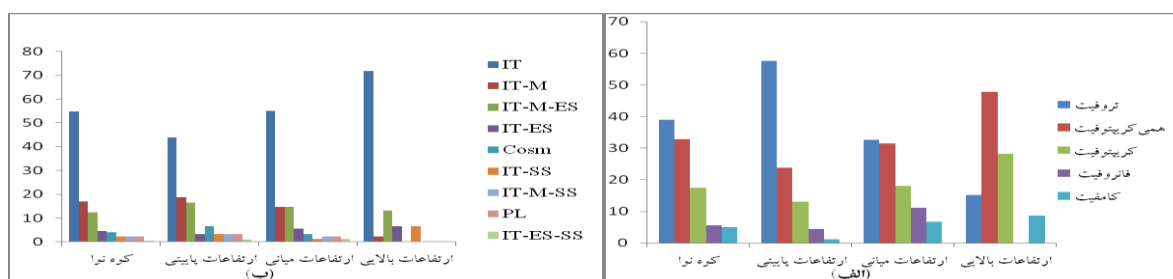


شکل ۳: طیف‌های الف) طول عمر و ب) فرم رویشی گونه‌های گیاهی کوه نوا

حضور گسترده‌ی گونه‌های غالب به شکل بوته‌های کوتاه قد خاردار و بالشتکی (همچون *Acantholimon olivieri* Boiss.، *Astragalus amblolepis* Fisch. و *A. tragacantha* L.) با شکل زیستی کامفیت در طبقه بالای ارتفاع از یکنواختی و در نتیجه تنوع آن می‌کاهد (واثقی و همکاران، ۱۳۹۰) ولی ضامن تثبیت خاک و عاملی بسیار مطمئن برای کنترل فرسایش‌های آبی به شمار می‌آیند. این گونه‌ها ویژه‌ی ارتفاعات بالای مناطق کوهستانی ایران هستند لذا با افزایش ارتفاع، حضور آن‌ها بیشتر می‌شود (دهشیری و همکاران، ۱۳۹۵). افزون بر این تنوع اشکال زیستی همی کریپتوفیت و کامفیت پناهگاه مناسبی را برای استقرار سایر ذخایر ژنتیکی گیاهی (گونه‌های یکساله) موجود در کل منطقه، مهیا می‌کند (امیری و همکاران، ۱۳۹۳).

بررسی تیپ بیولوژیکی گیاهان کوه نوا نشان‌دهنده‌ی وجود تنوع نسبتاً خوب در اشکال زیستی آن است که به دلیل سازگاری گیاهان منطقه به شرایط اقلیمی و خاکی است. نتایج حاصل از طبقه‌بندی تیپ‌های بیولوژیکی بیانگر این است که تروفیت‌ها بالاترین درصد از فرم‌های حیاتی منطقه هستند و در ارتفاع ۱۹۰۰-۱۶۰۰ متر بیشترین میزان را به خود اختصاص داده‌اند و کامفیت‌ها، همی کریپتوفیت‌ها و کریپتوفیت‌ها با افزایش ارتفاع به‌طور کلی افزایش یافته‌اند (شکل ۴-الف). فراوانی گیاهان همی کریپتوفیت در یک ناحیه نشان‌دهنده‌ی مناطق سردسیر و ارتفاعات و نیز حفظ رطوبت خاک ناشی از ذوب برف در مدت فصل رویش گیاهان است (Archibold, 1995) که با ویژگی‌های محیطی ارتفاعات بالای کوه نوا مطابقت دارد. طیف زیستی گیاهان سایر طبقات ارتفاعی بیانگر مناطق نیمه خشک است که در آن تروفیت‌ها بیشترین و کامفیت‌ها کمترین سهم را دارند و شرایط محیطی به‌ویژه از لحاظ دما مساعد رشد یک‌ساله‌ها است (زاجی و همکاران، ۱۳۸۵؛ حمزه و همکاران، ۱۳۸۷؛ جلیلیان و همکاران، ۱۳۹۳). فراوانی کریپتوفیت‌ها در دامنه‌ها و ارتفاعات مختلف را می‌توان ناشی از سازگاری این گیاهان در برابر عدم چرای دام (به دلیل فرارگیری جوانه‌های انتهایی‌شان در زیر خاک) دانست (Roques *et al.*, 2001).

کوه نوا جزو پهنه رویشی Holarctic است که بر اساس طبقه‌بندی زهری (Zohary, 1973) جزو ناحیه رویشی ایرانی-تورانی است. نتایج مربوط به بررسی پراکنش جغرافیای گیاهی گونه‌های منطقه، نشان‌دهنده‌ی غلبه گونه‌ای ناحیه رویشی ایرانی-تورانی است. این گونه‌ها ۵۴/۸ درصد رستنی‌های منطقه را تشکیل می‌دهند. علت اصلی غالبیت عناصر ایرانی-تورانی ممکن است به دلیل دوری این ناحیه رویشی از مناطق دیگر و شرایط محیطی خاص (اقلیم نیمه خشک) حاکم بر منطقه باشد. همچنین حضور جنس‌هایی نظیر *Crepis*, *Cousinia* Cass., *Astragalus* L., *Anthemis* L., *Allium* L., *Alcea* L., *Acantholimon* Boiss., *Tanacetum* L. که عناصر آن‌ها عمدتاً در ناحیه رویشی ایرانی-تورانی تجمع یافته‌اند (یوسفی، ۱۳۸۶) نشان از غالبیت رویش‌های ایرانی-تورانی در کوه نوا دارد. حضور گونه‌های ایرانی-تورانی در طول گرادیان ارتفاعی افزایش یافته است به‌طوری‌که بیشترین مقدار درصدی پراکنش این عناصر در طبقه‌ی ارتفاعی ۲۵۰۰-۲۲۰۰ متر با ۷۱/۷۴ درصد دیده شد (شکل ۴-ب). کاهش دما در این طبقه‌ی ارتفاعی که مساعد این گونه‌ها می‌باشد باعث افزایش آن‌ها در این طبقه گردیده است. از این لحاظ به نظر می‌رسد دامنه‌ی اکولوژیک گونه‌های ایرانی-تورانی نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر باشد و می‌توان به اهمیت عامل محیطی ارتفاع نسبت به عامل عرض جغرافیایی در رویشگاه‌های مناطق نیمه خشک ایران پی برد (امیری و همکاران، ۱۳۹۳).



شکل ۴: درصد حضور الف) شکل های زیستی و ب) کوروتیپ گونه های گیاهی در ارتفاعات مختلف کوه نوا (IT- ایرانی-تورانی، M- مدیترانه ای، ES- اروپا-سیبری، SS- صحارا-سندی، PL- چند ناحیه ای (بیش از سه ناحیه)، Cosm- جهان وطنی)

## نتیجه گیری کلی

به دلیل اینکه حفاظت همه جانبه از اکوسیستمها مستلزم مدیریت صحیح بر مبنای حفظ و نگهداری از تنوع گونه ای موجود در آنها است، بنابراین برای حفاظت موثر از تنوع گونه ای در اکوسیستمها، اندازه گیری تنوع گونه ای با استفاده از شاخص های مختلف تنوع بسیار ضروری است. توصیف و مقایسه ی وضعیت اکولوژیک اکوسیستمها برای تصمیم گیری های مدیریتی در عرصه های منابع طبیعی امری اجتناب ناپذیر می باشد. از طرفی تغییرات تنوع گیاهی در مکان و زمان نه تنها به نوع مدیریت بستگی دارد بلکه فاکتورهای محیطی غیرزنده نیز نقش مهمی ایفا می کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که ارتفاع از سطح دریا بر غنا و تنوع گونه ای تأثیر معنی داری دارد و کمترین میزان غنا و تنوع گونه ای در ارتفاعات بالا است.

## سپاسگزاری

گزارش حاضر با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد به انجام رسیده و کلیه حقوق آن مربوط به این دانشگاه است. از دکتر نسترن جلیلیان، دکتر محمد حسن جوری و دکتر شهرام نخجوان به خاطر مشاوره و مساعدت بی دریغ شان تشکر و قدردانی می نمایم.

## منابع

- آتشگاهی، ز.، اجتهادی، ح. و زارع، ح. (۱۳۹۴) ارتباط عوامل توپوگرافی و تنوع گیاهان در جنگل های شرق دودانگه ساری، استان مازندران، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) ۱۱-۱: ۲۸(۱).
- اجتهادی، ح.، سپهری، ح. و عکافی، ح.ر. (۱۳۹۱) روش های اندازه گیری تنوع زیستی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۲۳۰.
- اسدی، م.، معصومی، ا.ا. و مظفریان، و. (ویراستاران) (۱۳۹۷-۱۳۶۷) فلور ایران (شماره های ۱۴۵-۱)، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران.
- اسعدی، ع.م. و دادخواه، ع.ر. (۱۳۸۹) بررسی ترکیب فلور یستیکی و غنای گونه ای مراتع بیلاقی اسدلی-پلمیس در استان خراسان شمالی، فصلنامه تحقیقات مرتع و بیابان ایران ۶۰۳-۵۸۹: ۱۷(۴).
- امیری، س.، عرفانزاده، ر. و اسماعیل پور، ی. (۱۳۹۳) مطالعه تغییرات مولفه های تنوع گونه ای در گرادیان ارتفاع منطقه ی حفاظت شده گنو با استفاده از روش تقسیم بندی افزایشی، مجله پژوهش های فرسایش محیطی ۶۴-۷۷: ۴(۴).

پرما، ر. و شتایی جویباری، ش. (۱۳۸۹) اثر عوامل فیزیوگرافی و انسانی بر تاج پوشش و تنوع گونه‌های چوبی در جنگل‌های زاگرس (مطالعه موردی: جنگل‌های حفاظت شده قلاجه استان کرمانشاه)، فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران ۵۳۹-۵۵۵: ۱۸(۴).

جلیلیان، ن.، شیخی، ا. و دهشیری، م.م. (۱۳۹۳) مطالعه فلوریستیک منطقه‌ی کوه بهارآب در رشته‌کوه زاگرس (منطقه‌ی مرزی بین استان‌های کرمانشاه و ایلام، ایران)، نشریه تاکسونومی و بیوسیستماتیک ۶۵-۷۶: ۶(۱).

چراغی، ج.، حیدری، م.، امیدپور، ر. و میراب بالو، م. (۱۳۹۶ الف) تنوع گونه‌های گیاهی علفی و چوبی در رابطه با موقعیت‌های مختلف فیزیوگرافی با استفاده از شاخص‌های عددی و غیر عددی در جنگل‌های کوهستانی زاگرس، بوم‌شناسی جنگل‌های ایران ۲۴-۳۶: ۵(۹).

چراغی، ج.، حیدری، م.، امیدپور، ر. و میراب بالو، م. (۱۳۹۷) مقایسه‌ی فلور، اشکال زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان در شرایط فیزیوگرافی مختلف در رشته‌کوه شلم، ایلام، نشریه حفاظت زیست بوم گیاهان ۲۸۹-۲۶۹: ۶(۱۳).

چراغی، ج.، حیدری، م.، میراب بالو، م. و امیدپور، ر. (۱۳۹۶ ب) کارایی شاخص‌های عددی و غیر عددی در تعیین تنوع زیستی بندپایان مزوفون خاک و لاشبرگ در شرایط فیزیوگرافی مختلف در جنگل‌های بلوط ایرانی، فصلنامه علمی-پژوهشی پژوهش و توسعه جنگل ۳۷۷-۳۹۴: ۳(۳).

حاجی میرزا آقایی، س.، جلیلونند، ح.، کوچ، ی. و پورمجیدیان، م.ر. (۱۳۹۰) تنوع گونه‌های گیاهی در ارتباط با عامل اکولوژیک ارتفاع از سطح دریا در جنگل‌های سرد آبرود چالوس، مجله زیست‌شناسی ایران ۴۱۱-۴۰۰: ۲۴(۳).

حمزه، ب.، خان حسنی، م.، خداکرمی، ی. و نعمتی پیکانی، م. (۱۳۸۷) مطالعه فلوریستیک و جامعه‌شناسی گیاهی جنگل‌های کرمانشاه چهارزبر، فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران ۲۲۹-۲۱۱: ۱۶(۲).

دهشیری، م.م.، جلیلیان، ن. و طهماسبی، گ. (۱۳۹۶) بررسی فلوریستیک کوه نوا (نور)، استان کرمانشاه، نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران ۹۵-۱۰۸: ۹(۳).

دهشیری، م.م.، میرداودی، ح.ر.، رحمتی، پ. (۱۳۹۵) بررسی فلور کوه شهباز، استان مرکزی، نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران ۴۹-۶۲: ۸(۱).

زاجی، ب.، خان حسنی، م. و خدایاری، ی. (۱۳۹۵) معرفی فلور، شکل زیستی و الگوی پراکنش جغرافیایی رستنی‌های منطقه‌ی حفاظت شده عین‌الکاش (قلا) کرمانشاه، مجله گیاه و زیست‌بوم ۴۸-۶۰: ۲(۴-۵).

سختوتی، ن.، اکبری‌نیا، م.، زنگنه، ه. و میرزایی، ج. (۱۳۹۲) تأثیر عوامل توپوگرافی بر تنوع گونه‌ای رویشگاه محلب *Cerasus mahaleb* (L.) Mill. در جنگل‌های استان کرمانشاه، فصلنامه جنگل و مرتع ۳۳-۲۴: ۹۷.

سلیمانی، ب.، پورهاشمی، م. و درگاهی، د. (۱۳۹۲) بررسی تنوع گونه‌های چوبی در ارتباط با عوامل فیزیوگرافی در جنگل باباکوسه‌علیا، استان کرمانشاه، مجله پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل ۳۵-۵۰: ۲۰(۱).



سهرابی، ه. و اکبری‌نیا، م. (۱۳۸۴) بررسی تنوع گونه‌های گیاهی در ارتباط با عوامل فیزیوگرافیکی در منطقه‌ی جنگلی ده‌سرخ، جوانرود، استان کرمانشاه، فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران ۲۹۴-۲۷۹: ۱۳(۳).

کاظم‌نژاد، ف.، حسن‌پور لیما، ع.، حق‌وردی، ک. و اسدالهی، ف. (۱۳۹۱) تنوع زیستی گیاهی در گرادیان ارتفاعی جنگل‌های شمال ایران (مطالعه موردی: حوزه ۴۵ گلبند نوشهر)، فصلنامه اکوسیستم‌های طبیعی ایران ۱-۱۲: ۲(۳).

نظری عنبران، ف.، قربانی، ا.، عظیمی مطعم، ف.، تیمورزاده، ع.، اصغری، ع. و هاشمی مجد، ک. (۱۳۹۴) بررسی فلوریستیکی و تنوع گونه‌ای در گرادیان ارتفاعی لاهرود- شابیل (شمال سبلان)، نشریه حفاظت زیست بوم گیاهان ۱-۱۸: ۳(۷).

نعمتی پیکانی، م. و جلیلیان، ن. (۱۳۹۱) گیاهان دارویی استان کرمانشاه، نشریه تاکسونومی و بیوسیستماتیک ۶۹-۷۸: ۴(۱۱).

واثقی، پ.، اجتهادی، ح. و زاهدی‌پور، ح. (۱۳۹۰) بررسی تنوع زیستی گیاهی در ارتباط با متغیرهای ارتفاع و جهت شیب: بررسی موردی در ارتفاعات کلات گناباد، خراسان، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم ۵۴۷-۵۵۸: ۹(۳).

یوسفی، م. (۱۳۸۶) فلور ایران، انتشارات دانشگاه پیام نور، ص ۲۲۷.

Archibold, O.W. (1995) Ecology of world vegetation. 1th edn. Chapman and Hall Inc. Pp 510. London.

Barnes, B.V., Zak, D.R., Denton, S.R. and Spurr, S.H. (1997) Forest Ecology. 4th edn. John Wiley and Sons Inc. Pp 774. New York.

Chawla, A., Rajkumar, S., Singh, K.N., Lal, B. and Singh, R.D. (2008) Plant species diversity along an altitudinal gradient of Bhabha Valley in Western Himalaya. Journal of Mountain Science 5: 157-177.

Davis, P.H. (1965-1988) Flora of Turkey and East Aegean Islands (Vol. 1-10). Edinburgh University Press. Edinburgh.

Faramarzi, M. (2009) Influence of soil and topographic variables on vegetation composition and community types in semi-arid rangeland in western Iran (Vol. 2). Pages 14-24 In Rangeland Vegetation in Relation to Management and Environmental Variables in Semi-Arid Rangeland in Western Iran (Doctoral Dissertation). Göttingen: Cuvillier Verlag.

Grytnes, J.A. and Vetaas, O.R. (2002) Species richness and altitude: a comparison between null models and interpolated plant species richness along the Himalayan altitudinal gradient, Nepal. The American Naturalist 159(3): 294-304.

Karami, R., Mehrabi, H.R. and Ariapoor, A. (2015) The Effect of altitude and slope in the species diversity of herbaceous plants (case study: Watershed Miandar Qarootag Gilangharb). Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 5(7): 197-204.

Léonard, J. (1989) Contribution a l'etude de la flore et de la vegetation des deserts d'Iran (Vol. 9). Jardin Botanique National de Belgique. Meise.

Mahdavi, A., Eshaghi Rad, J. and Jamshidifard, M. (2012) The effect of altitude and aspect on rangeland plant diversity (case study: Dashte Zahab, Kermanshah, Iran). Journal of Rangeland Science 3(1): 11-20.

National Geographic Organization. (2010) Kermanshah Province 1:500,000 Map. <http://www.wikimapia.org>. Accessed: May 16, 2010.

- Neumann, M. and Starlinger, F. (2001) The significance of different indices for stand structure and diversity in forests. *Forest Ecology and Management* 145: 91-106.
- Raunkaier, C. (1934) *The life forms of plants and statistical plant geography*. Clarendon Press Pp. 632. Oxford.
- Rechinger, K.H. (ed.) (1963-2015) *Flora Iranica* (No. 1-181). Akademische Druck- und Verlagsanstalt. Graz.
- Roques, K., O'Connor, T.G. and Watkinson, A.R. (2001) Dynamics of shrub encroachment in an African savanna: relative influences of fire, herbivory, rainfall and density dependence. *Journal of Applied Ecology* 38(2): 268-280.
- Salick, J., Anderson, D., Woo, J., Sherman, R., Cili, N. and Dorje, S. (2004) Tibetan ethnobotany and gradient analyses: Menri (Medicine Mountains), Eastern Himalayas. *Bibliotheca Alexandrina* Pp 1-12. Alexandria.
- Sang, W. (2009) Plant diversity patterns and their relationships with soil and climatic factors along an altitudinal gradient in the middle Tianshan Mountain area, Xingjian, China. *Ecological Research* 24(2): 303-314.
- Takhtajan, A. (1986) *Floristic regions of the world* (translated by Mildered, E.M.). University of California Press Pp. 522. California.
- The Plant List. (2018) *The Plant List: a Working List of all Plant Species*. <http://www.theplantlist.org>. Accessed: May 15, 2018.
- Tavili, A. and Jafari, M. (2009) Interrelation between plants and environmental variables. *International Journal of Environmental Research* 3(2):239-246.
- Townsend, C.C. and Guest, E. (1966-1985) *Flora of Iraq* (Vol. 1-9). Ministry of Agriculture and Agrarian Reform. Baghdad.
- USGS, 2018. United States Geological Survey. <http://www.usgs.gov>. Accessed: May 15, 2018.
- Zohary, M. (1973) *Geobotanical Foundation of the Middle-East* (Vol. 1-2). Gustav Fischer Verlag Pp. 739. Amsterdam.

## **Study on the plant species diversity along an altitudinal gradient in Nova Mountain, Kermanshah Province of Iran**

M.M. Dehshiri<sup>1\*</sup>

**Received:2019.4.20**

**Accepted:2019.11.9**

### **Abstract**

Determination of the factors affecting on species distribution and diversity is the most important factor in ecosystems management. The study on plant species diversity in different elevations of Nova Mountain located in 10 km Dalahou was aimed. For this purpose, 240 plots were selected based on a random-systematic design according with minimal area method. All the plots were divided into three altitudinal classes. ANOVA analysis used to study of altitudinal class differences with species richness and species diversity indices. In total, 177 species belong to 128 genera and 37 families were recognized. Therophytes with 69 species (38.98%) were the most frequent life forms. The results showed that the highest number of species is related to lower elevations class (1600 to 1900 m a.s.l.). Irano-Turanian species had the highest number in the studied area. Analysis of variances for biodiversity indices in different altitudinal classes showed the indices of species richness and species diversity have significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively. In total, results showed the elevation has significant effect on species richness and diversity in which, the higher elevations class has lower species diversity.

**Keywords: Iran, Biodiversity, Central Zagros, Physiographic factors.**

---

1-Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

\*(Corresponding author: Dehshiri2005@yahoo.com)

## کاربرد روش سطح پاسخ در بهینه سازی احیای زیستی سلنات به نانوذرات سلنیم توسط باکتری

### *Bacillus sp. Strain TR-6*

عطیه سادات رضوی<sup>۱</sup>، پریسا تاجرمحمد قزوینی<sup>۲\*</sup>، جواد حامدی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲

## چکیده

معدنی‌سازی زیستی سلنیم توسط باکتری‌ها نه تنها پتانسیل لازم برای زدودن اکسی آنیون‌های سمی سلنیم را از محیط دارا می‌باشد، بلکه می‌تواند سلنیم عنصری را در مقیاس نانو تولید نماید. در این پژوهش از روش رویه‌ی پاسخ با طراحی باکس-بنکن برای ارزیابی و بهینه سازی تأثیر پارامترهای عملیاتی مختلف بر فرآیند احیای زیستی سلنات استفاده گردید. مدل درجه دوم پیشنهادی با ضریب همبستگی  $R^2=0.96$  ضمن پیش‌بینی مناسب رفتار فرآیند، مقدار ۴۱/۲۵ درصد احیای سلنات توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* را در شرایط ۵/۲۴ درصد تلقیح اولیه باکتری، مدت زمان ۲۴ ساعت و مقدار ۳/۸ mM نمک سلنات سدیم به عنوان نقطه بهینه تعیین نمود. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره مجهز به سیستم طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس توانایی تولید نانوسفرهای سلنیم توسط باکتری منتخب را تأیید کرد. نهایتاً باکتری مذکور به عنوان یک باکتری منتخب با ارزش در فناوری‌های نانو و معدنی‌سازی زیستی سلنیم معرفی می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** احیای باکتریایی، اکسی آنیون‌های سلنیم، طراحی آزمایش، نانوبیوتکنولوژی.

## مقدمه

سلنیم یک عنصر نادر دارای اهمیت قابل ملاحظه‌ای در سایز نانو در زمینه‌ی کاربردهای مربوط به حوزه‌ی سلامت (به عنوان ماده ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، ضدسرطان و غیره) و تکنولوژی (برای مثال تجهیزات الکترونیکی) است. سلنیم نه تنها یک عنصر استراتژیک در تجهیزات الکترونیکی می‌باشد، بلکه یک عنصر کمیاب ضروری در ارگانسیم‌های زنده نیز است. سلنیم

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

\*نویسنده مسئول: ptajer@aeoi.org.ir

۳- دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

عنصری است که از نظر بررسی‌های زیست محیطی بسیار مهم می‌باشد، زیرا بین غلظت ضروری آن و غلظت سمی آن برای موجودات زنده تفاوت کمی وجود دارد. برای مثال میزان غلظت توصیه شده‌ی سلنیم توسط انجمن غذا و تغذیه انستیتوی پزشکی ایالات متحده در رژیم غذایی بزرگسالان برابر با ۵۵ میکروگرم در روز می‌باشد، در حالی که میزان بالاترین سطح قابل تحمل برای بزرگسالان ۴۰۰ میکروگرم در روز در ایالات متحده و در اروپا ۳۰۰ میکروگرم در روز معرفی شده است. مطالعات نشان داده که مطالعه‌ی آلودگی سلنیم یکی از وسیع‌ترین و گران قیمت‌ترین مطالعات از مثال‌های فلزات خطرناک گروه V و VI است. به‌طور معمول سلنیم (Se) به دو فرم بسیار محلول سلنات ( $SeO_4^{2-}$ ) و سلنیت ( $SeO_3^{2-}$ ) در خاک‌های آلوده و آبهای زهکشی شده کشاورزی وجود دارد. هر دو فرم محلول این عنصر در غلظت‌های خاصی بسیار سمی هستند. سلنات بیشترین فرم اکسید شده‌ی سلنیم است و بیشترین حلالیت را در آب دارد. خروج سلنات از آبهای آلوده به دلیل حلالیت بالای آن مشکل است. بنابراین احیای زیستی سلنات به سلنیم از نظر پاکسازی زیستی بسیار حائز اهمیت است (Nancharaiah & Lens, 2015a; Santos *et al.*, 2015; Soudi *et al.*, 2009; Stolz *et al.*, 2002; Tajer- Mohammad-Ghazvini, 2007; Wadhvani *et al.*, 2016).

میکروارگانیسم‌ها در چرخه زیستی سلنیم نقش به‌سزایی دارند و مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های باکتریایی خاصی می‌توانند به اکسی آنیونهای سلنیم مقاوم باشند و آنها را به سلنیم عنصری نامحلول احیا نمایند. از این میکروارگانیسم‌ها برای پاکسازی زیستی خاک‌ها و رسوبات، آبهای آلوده با آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی استفاده می‌شود (Nancharaiah & Lens, 2015b; Oremland *et al.*, 1989). میکروارگانیسم‌های احیاکننده‌ی اکسی آنیونهای سلنیم دارای پتانسیل بی‌ظئیری برای بیوسنتز سلنیم عنصری و نانومواد سلنیدی تحت شرایط محیطی با استفاده از پیش ماده‌های سلنیم از مواد خام کم هزینه و پسابها می‌باشند (Yuan *et al.*, 2015). سلنیم در فرم اکسیداسیون صفر ( $Se^0$ ) در محیط‌های مایع می‌تواند بصورت نانوذره‌های جداگانه وجود داشته باشد. امروزه نانوذرات سلنیم به دلیل کاربرد آنها در صنایع و پزشکی بسیار مورد توجه هستند. این نانوذرات می‌توانند با کاهش خطر سمیت به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کنند (Raevskaya *et al.*, 2008). امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها در سنتز سبز نانومواد موضوع تحقیقی جذابی است، چراکه میکروارگانیسم‌ها کاتالیزورهای ارزان قیمتی هستند که پیش ماده آنها می‌تواند از مواد خام ارزان قیمت و پسابها تهیه گردد و از مواد کاهنده و خطرناک در فرایندهای آنها استفاده نمی‌شود. این امر منجر به کاهش مصرف انرژی و زدودن مواد سمی در تولید نانومواد می‌شود. همچنین سنتز زیستی نانومواد می‌تواند در pH نزدیک به خنثی، دما و فشار محیط انجام پذیرد که مقرون به صرفه می‌باشد (Dobias *et al.*, 2011).

اخیراً روش سطح پاسخ (Response Surface Method, RSM) در میان تکنیک‌های متداول چند متغیره به عنوان یک روش مناسب برای طراحی آزمایش‌ها به صورت گسترده استفاده شده است. روش سطح پاسخ در واقع ترکیبی از روش‌های ریاضی و آماری می‌باشد که توصیف کننده روابط میان چندین متغیر مستقل و یک یا چند پاسخ است. روش سطح پاسخ براساس مدل‌های ریاضی با نتایج آزمایشگاهی بدست آمده از طراحی آزمایش و تأیید مدل بدست آمده به کمک روش‌های آماری عمل می‌نماید.

نمایش نموداری از این معادلات به عنوان سطوح پاسخ نامیده می شود که می تواند برای توصیف اثر فردی و جمعی متغیرهای آزمون بر پاسخ و تعیین تعامل متقابل بین متغیرهای آزمون و تأثیر بعدی آنها در پاسخ باشد. همچنین گزارش شده است که روش Box-Behnken طراحی‌هایی با خصوصیات آماری مطلوب ایجاد می کند (Preetha & Viruthagiri, 2007; Singh *et al.*, 2010; Sohbatzadeh Lonbar, 2016). بنابراین در مطالعه حاضر بهینه‌سازی احیای سلنات و تولید نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* با استفاده از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### منبع میکرو ارگانسیم

باکتری مورد استفاده در این پژوهش باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* می باشد که در سال ۱۳۹۶ از رودخانه قره‌سو در شهر کرمانشاه جدا گردیده است (Razavi, 2019).

### سنجش میزان مقاومت باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* نسبت به سلنات

در این مرحله برای تعیین میزان مقاومت باکتری نسبت به غلظت‌های مختلف سلنات از آزمایش MIC (Minimum inhibitory concentration) روش رقت در آبگوشت در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استفاده گردید (Tajer-Mohammad-Ghazvini, 2007). از کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند در میکروپلیت‌های دارای محیط کشت مایع Luria Bertani (LB) حاوی غلظت‌های مختلف سلنیم (۰/۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ mM) از نمک‌های سلنات سدیم کشت داده شد. میکروپلیت‌ها در گرمخانه در دمای ۳۰°C به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. رشد باکتری‌ها و تغییر رنگ خانه‌ها به رنگ قرمز که نشانه مقاومت باکتری و نیز احیای سلنات به سلنیم عنصری می باشد، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها با ۲ تکرار انجام گرفت. خانه‌های حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری بدون سلنات به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. به منظور تعیین MBC (minimum bactericidal concentration) محتویات چاهک مربوط به MIC و چاهک مربوط به غلظت بالاتر، بر روی محیط کشت LB آگار فاقد سلنات کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۰°C، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی کینتیک احیای سلنات توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6*

به منظور بررسی کینتیک احیای سلنات، باکتری در محیط کشت مایع Luria Bertani (LB) حاوی ۱ mM نمک سدیم سلنات در شرایط هوایی و دمای ۳۰°C کشت داده شد. در بازه‌های زمانی متوالی از مایع رویی محیط کشت، نمونه‌گیری انجام شد و غلظت سلنیم محلول در نمونه‌ها توسط دستگاه ICP-Optical Emission Spectroscopy آنالیز شد (Soudi *et al.*, 2009).

## طراحی آزمایش به منظور ارزیابی فاکتورهای موثر بر فرآیند احیای زیستی سلنات و بهینه‌سازی آن

در این پژوهش، روش سطح پاسخ (RSM) برای ارزیابی فرآیند احیای زیستی سلنات توسط باکتری *Bacillus sp.* Strain TR-6 و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر فرآیند احیای زیستی استفاده شد. سه متغیر شامل درصد اولیه تلقیح باکتری، مدت زمان و مقدار غلظت نمک سدیم سلنات در سه سطح -1، 0، +1 به صورت جدول ۱ مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس متغیرها و مقادیر آنها یک سری شامل ۱۵ آزمایش با استفاده از طراحی باکس-بنکن (Box-Behnken) طراحی گردید. تمامی آزمایش‌ها در دمای °C ۳۰ و در شیکر اینکوباتور با دور rpm ۱۵۰ گرم‌گذاری شدند.

برای تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) Design-Expert 7.0 استفاده شد (Sohbatzadeh Lonbar, 2016; Witek-Krowiak *et al.*, 2014).

جدول ۱: متغیرهای روش طراحی باکس-بنکن

متغیر	نماد	سطح‌ها		
		-1	0	+1
درصد اولیه تلقیح باکتری	A	۵	۷/۵	۱۰
مدت زمان (ساعت)	B	۸	۲۰	۳۲
مقدار غلظت نمک سدیم سلنات (mM)	C	۱	۵/۵	۱۰

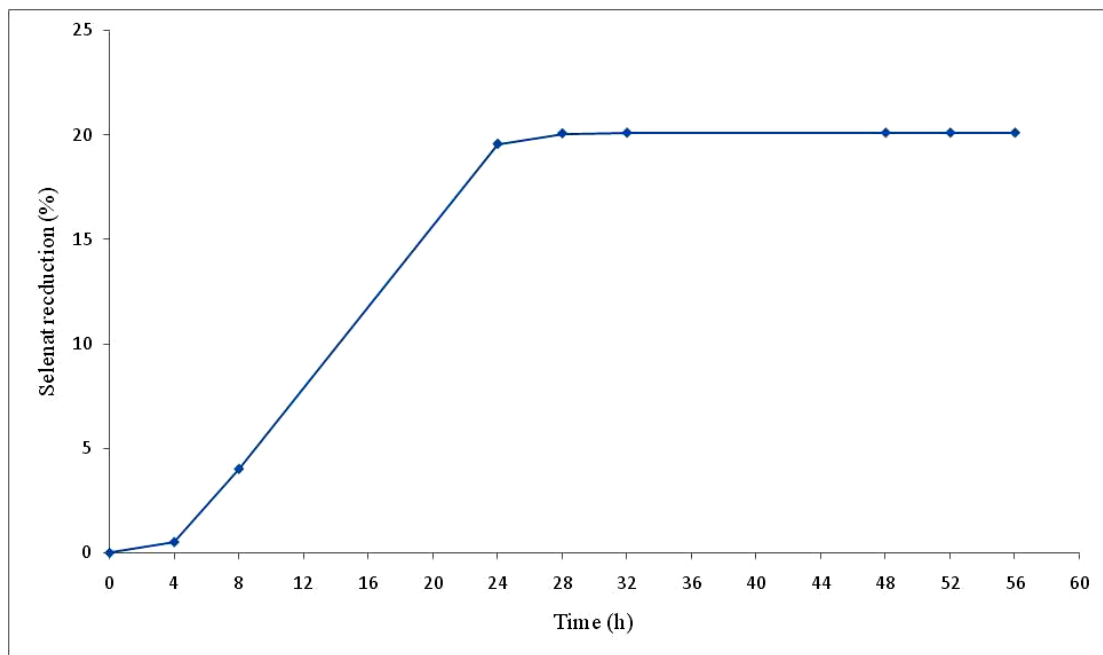
## بررسی تولید نانو ذرات سلنیم توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مجهز به طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس

بررسی شکل سلول‌های باکتری در مجاورت با نمک سدیم سلنات توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM, Scanning Electron Microscopy) انجام شد. ابتدا باکتری در محیط کشت مایع LB حاوی ۱ mM نمک سدیم سلنات در شرایط هوایی و دمای °C ۳۰ کشت داده شد. سپس برای بررسی، لامل‌های شیشه‌ای به ابعاد ۱۰×۱۰ mm<sup>2</sup> تهیه و در محلول آگار ۰/۸ درصد غوطه‌ور شدند. بعد از خشک شدن و بستن آگار، سلول‌های باکتری بر روی لامل‌ها قرار گرفتند. به منظور دهیدراته شدن آگار، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار داده شدند. برای آگیری نمونه‌ها، از روش غوطه‌ور کردن متوالی به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول با غلظت کم به زیاد (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۹۶، ۹۹/۹ درصد) استفاده گردید. در آخر، برای تبخیر اتانول، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفتند.

بر روی نمونه‌ها پوششی از طلا به وسیله دستگاه Ion-Coater (KIC-IA, COXEM) داده شد، سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM- ZEISS EVO 18 Special Edition) مجهز به سیستم طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX-Energy dispersive x-ray spectroscopy) مورد بررسی قرار گرفتند (Piroeva *et al.*, 2013).

## نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نمک سدیم سلنات برای باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* برابر با ۳۲۰ mM سلنیم می باشد. امروزه ثابت شده است که احیای اکسی آنیون های سلنیم به نانوذرات سلنیم می تواند توسط گونه های متنوعی از باکتری های مقاوم به سلنیم انجام شود. در حقیقت باکتری های مقاوم به اکسی آنیون های سلنیم، سنتز نانوذرات سلنیم را به عنوان یکی از مکانیسم های سم زدایی سلنواکسی آنیون ها بکار می گیرند (Eswayah *et al.*, 2016; Wadhvani *et al.*, 2016). همچنین بررسی کینتیک احیای سلنات باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* نشان داد که باکتری مذکور قادر است بعد از گذشت ۵۶ ساعت حدود ۲۰ درصد از سلنواکسی آنیون محلول در محیط را احیا و به سلنیم عنصری (نامحلول) کاهش دهد (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار کینتیک احیای سلنات به سلنیم عنصری بر حسب زمان توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* در محیط کشت مایع LB حاوی ۱ mM نمک سلنات سدیم در شرایط هوازی و دمای ۳۰°C.

در این پژوهش، روش سطح پاسخ (Response surface methodology, RSM) برای ارزیابی فاکتورهای مؤثر بر فرآیند احیای زیستی سلنات و بهینه سازی آن مورد استفاده قرار گرفت. سه متغیر شامل درصد اولیه تلقیح باکتری، مدت زمان و مقدار غلظت نمک سدیم سلنات در سه سطح -1، 0، +1 مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس متغیرها و مقادیر آنها یک سری شامل ۱۵



آزمایش با استفاده از طراحی باکس- بنکن (Box-Behnken) طراحی گردید. مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲: مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی باکس- بنکن در روش روبه پاسخ.

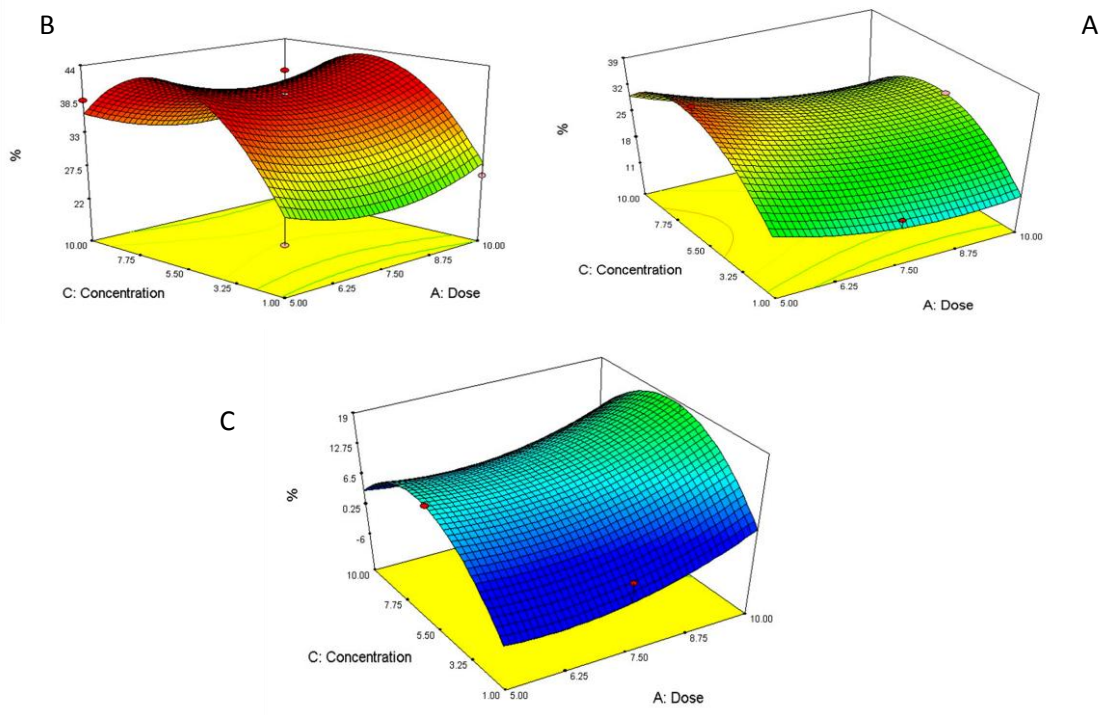
متغیر A (درصد تلقیح باکتری)	متغیر B (زمان - ساعت)	متغیر C (غلظت نمک سدیم سلنات - mM)	R درصد سلنواکسی آنیون احیا شده	آزمایش
۵	۳۲	۵/۵	۳۸/۲۱	۱
۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۳۰	۲
۱۰	۲۰	۱	۲۵/۹۷	۳
۱۰	۳۲	۵/۵	۲۷/۷۲	۴
۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۹۶	۵
۱۰	۸	۵/۵	۱۶/۳۸	۶
۷/۵	۲۰	۵/۵	۳۹/۷۸	۷
۵	۲۰	۱	۲۲/۸۷	۸
۷/۵	۸	۱۰	۰/۶۴	۹
۷/۵	۳۲	۱	۱۴/۲۴	۱۰
۷/۵	۸	۱	۰/۵۳	۱۱
۵	۲۰	۱۰	۳۸/۳۵	۱۲
۵	۸	۵/۵	۱۱/۳۳	۱۳
۷/۵	۳۲	۱۰	۱۶/۶۱	۱۴
۱۰	۲۰	۱۰	۳۸/۳۶	۱۵

تحلیل واریانس به منظور تأیید مؤثر بودن اثرات اصلی و برهمکنشی متغیرها انجام شد. به طور کلی، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F بزرگ در تحلیل واریانس نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۰۳۹ و ۱۵/۳۱ می‌باشد که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد. همچنین مقادیر R<sup>2</sup> و R<sup>2</sup>adj به ترتیب برابر با ۰/۹۶ و ۰/۹۰ می‌باشند که این مقادیر نشان می‌دهند مدل پیشنهادی به خوبی قادر است مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند. نتایج نشان دادند که متغیر A (درصد تلقیح اولیه باکتری) از نظر آماری با p-value برابر با ۰/۸۶ ( $p > 0.05$ ) کمترین اثر را بر میزان احیای سلنات دارد. اما فاکتور B (زمان) با p-value برابر با ۰/۰۰۳ ( $p < 0.05$ ) بر میزان احیای سلنات بسیار تاثیرگذار می‌باشد. مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

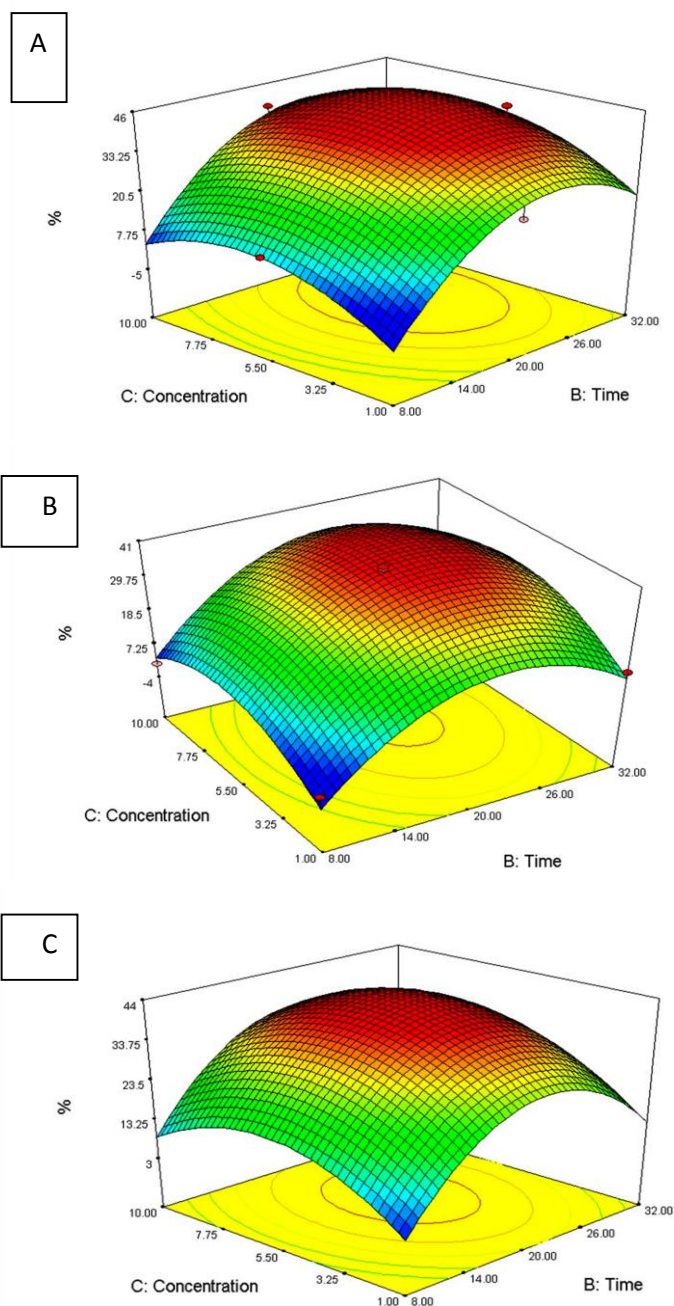
$$\% = -40.14636 - 5.67154 * \text{Dose} + 7.12874 * \text{Time} + 7.58498 * \text{Concentration} - 0.12957 * \text{Dose} * \text{Time} - 0.068697 * \text{Dose} * \text{Concentration} + 0.010462 * \text{Time} * \text{Concentration} + 0.56831 * \text{Dose}^2 - 0.13768 * \text{Time}^2 - 0.58508 * \text{Concentration}^2$$

رویه‌های سه‌بعدی پاسخ‌ها که ناشی از برهمکنش سه متغیر درصد اولیه تلقیح باکتری، مدت زمان و مقدار غلظت نمک سلنات می‌باشد، در اشکال ۲-۴ نشان داده شده است. همانطور که در سطح‌های سه‌بعدی پاسخ‌های شکل ۲ نشان داده شده است، میزان احیای سلنات می‌تواند متأثر از غلظت نمک سلنات در محیط نیز باشد، به طوری که هر چه میزان غلظت نمک (از ۱ mM

تا ۱۰ mM) در محیط بیشتر باشد، میزان درصد احیای سلنات به طور کلی بیشتر می‌گردد. این نتیجه احتمالاً به علت افزایش سمیت سلنات با افزایش غلظت نمک برای باکتری و مکانیسم مقاومت باکتری و تمایل به سم‌زدایی سریع آن می‌باشد. اما همان طور که در نمودارهای سه بعدی دیده می‌شود، میزان احیای سلنات با افزایش غلظت نمک از ۳/۲۵ mM تا ۱۰ mM مقدار کمی کاهش یافته است که به دلیل افزایش سمیت در اثر افزایش غلظت سلنات در محیط می‌باشد. همچنین نتایج نشان دادند که میزان درصد تلقیح اولیه باکتری در این آزمایش‌ها با گذشت زمان تأثیر چندانی نداشته است. بیشترین تأثیر را ۸ ساعت اولیه تلقیح دارد. با گذشت زمان و با رشد و افزایش تعداد سلولها، سلولهای باکتری تقریباً قادر به احیای ۴۰ درصد از سلنات محیط می‌باشد. اما مطابق با اشکال ۳ و ۴، میزان احیای سلنات با زمان رابطه مستقیم دارد. به عبارتی درصد احیای سلنات با گذشت زمان بیشتر می‌گردد. بیشترین تأثیر زمان تا ۲۴ ساعت پس از رشد باکتری در مجاورت با سلنات سدیم می‌باشد. با گذشت زمان و اثر سمیت سلنات بر رشد باکتری، تأثیر زمان نیز کمتر می‌گردد. نهایتاً نتایج نشان دادند که باکتری- *Bacillus sp. Strain TR-6* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design-Expert 7.0 (۵/۲۴ درصد تلقیح باکتری، مدت زمان ۲۴ ساعت و مقدار غلظت سلنیم ۳/۸ mM) قادر به احیای کامل ۴۱/۲۵ درصد از سلنات محلول محیط به سلنیم عنصری می‌باشد.

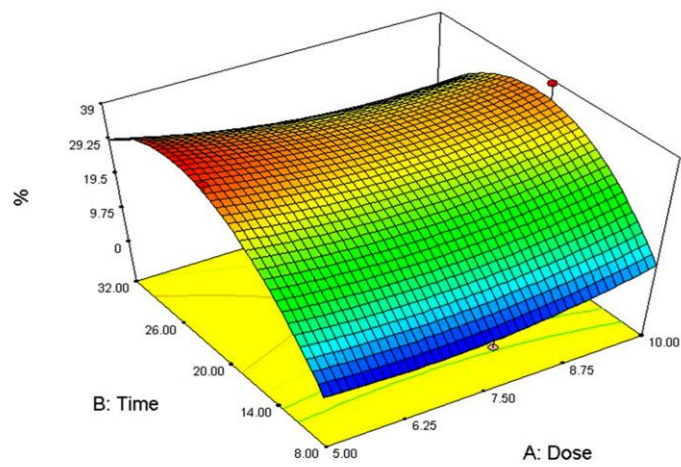
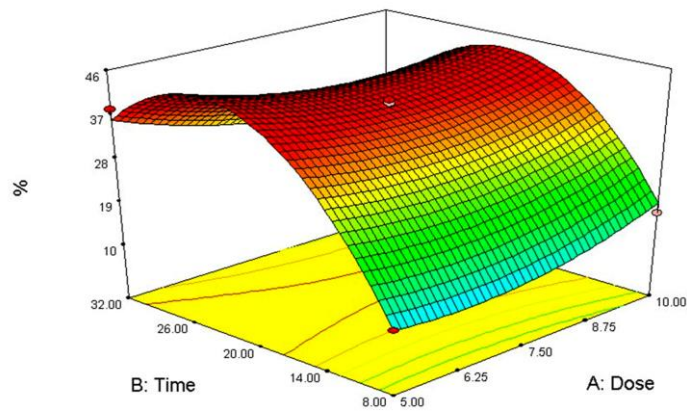
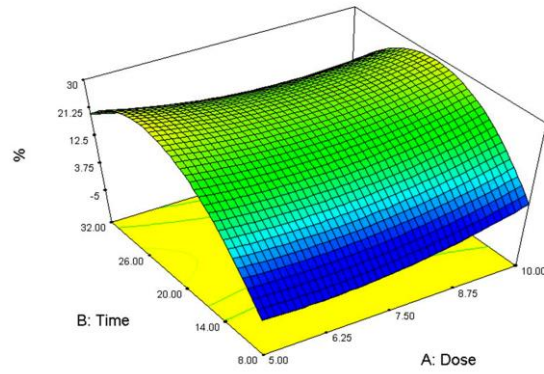


شکل ۲: سطح‌های سه بعدی برهمکنش درصد تلقیح اولیه باکتری و مقدار غلظت نمک سلنات سدیم در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* (A) مدت زمان ۲۰ ساعت (B) مدت زمان ۲۲ ساعت (C) مدت زمان ۲۴ ساعت.



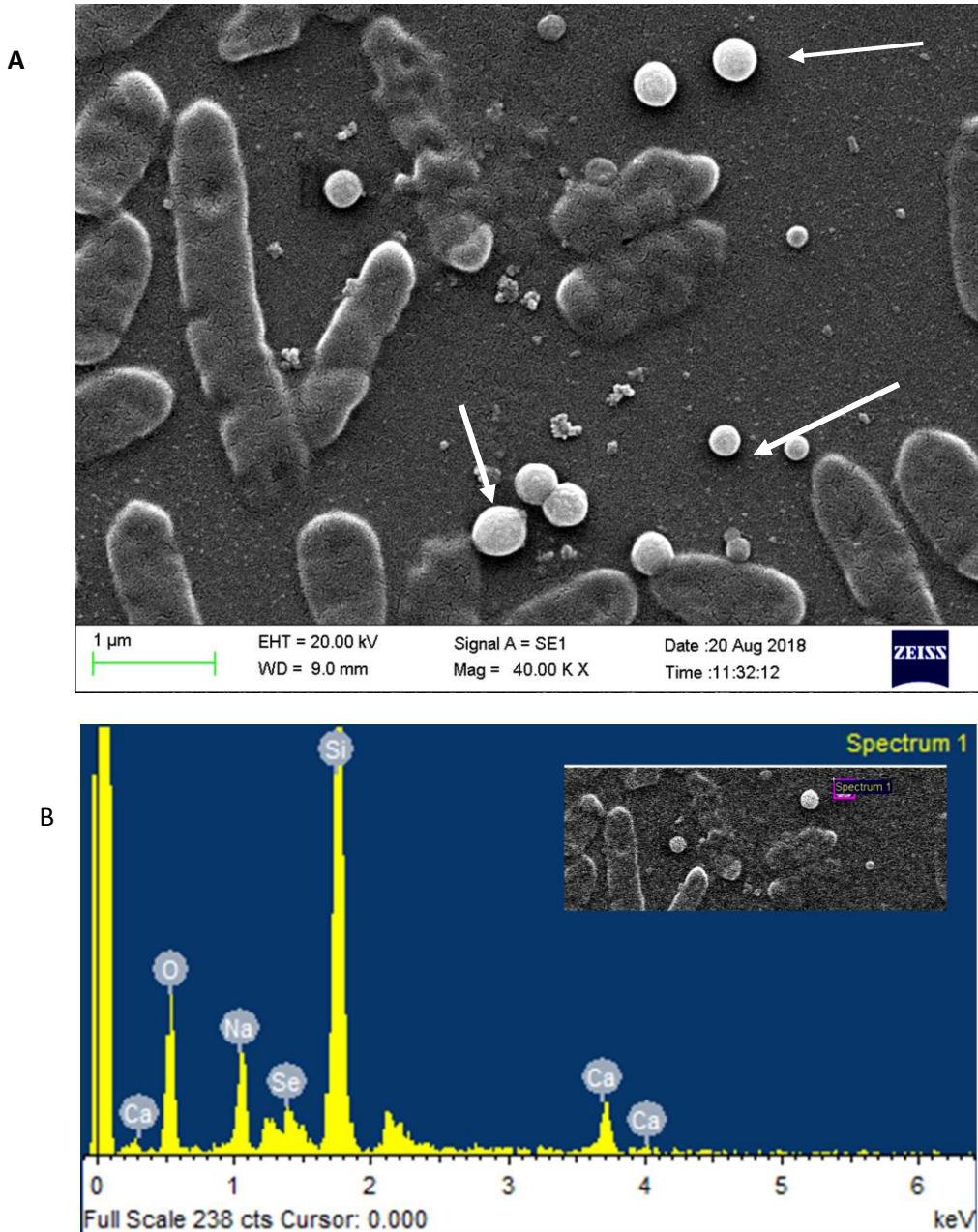
شکل ۳: سطح‌های سه بعدی برهمکنش زمان و مقدار غلظت نمک سلنات سدیم در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* (A) ۵ درصد تلقیح اولیه باکتری (B) ۷/۵ درصد تلقیح اولیه باکتری (C) ۱۰ درصد تلقیح اولیه باکتری.

A



شکل ۴: سطح‌های سه بعدی برهمکنش زمان و تلقیح اولیه باکتری در احیای سلنات به سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp.* Strain TR-6 (A) غلظت ۱mM نمک سلنات سدیم (B) غلظت ۵/۵ mM نمک سلنات سدیم (C) غلظت ۱۰ mM نمک سلنات سدیم.

تولید نانوذرات سلنیم توسط باکتری *Bacillus sp.* Strain TR-6 با میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی گردید. نتایج میکروسکوپی نشان دادند باکتری *Bacillus sp.* Strain TR-6 در مجاورت با اکسی آنیون سلنات قادر به تشکیل نانوذرات سلنیم است که داده‌های EDX نیز این موضوع را تأیید کرد (شکل ۵). امروزه تصویربرداری از محیط‌های کشت باکتریایی و جوامع میکروبی با میکروسکوپ الکترونی در تحقیقات دیگر نیز ثابت کرده است که اتم‌های سلنیم تشکیل شده در زمان احیای زیستی اکسی آنیون‌های سلنیم می‌توانند هسته‌زایی کنند و به تشکیل حالت‌های ساختاری متفاوت از  $Se^0$  بیانجامند و نیز به صورت شکل‌های کروی رشد نمایند و به شکل سلنوسفرهای سلنیم (نانوذرات) در سیتوپلاسم، روی سطح سلول و در محیط پیرامون وجود داشته باشند (Butler *et al.*, 2012; Nancharaiah & Lens, 2015a). مطالعات مختلف شواهدی ارائه می‌دهند مبنی بر اینکه باکتری‌ها در میان سیستم‌های زیستی در تولید نانوذراتی با اندازه و شکل‌های مختلف کارآمدتر هستند. مثال‌هایی در این زمینه عبارتند از باکتری *Bacillus selenitireducens* که قادر به احیای اکسی آنیون‌های سلنیم (سلنات و سلنیت) و تولید ذرات کروی به قطر ۲۰۰ نانومتر می‌باشد (Dobias *et al.*, 2011). باکتری *Thauera selenatis* نیز یک باکتری گرم منفی است که قادر به احیای سلنات به سلنیت و سپس احیای سلنیت تولیدی در سیتوپلاسم به نانوسفرهای سلنیم می‌باشد (Butler *et al.*, 2012). همچنین محققان نشان دادند که نانوذرات سلنیم تشکیل شده توسط سه باکتری *Bacillus Sulfurospirillum barnesii* و *Selenihalanaerobacter shriftii* و *selenitireducens* از نظر ساختاری تفاوت منحصر به فردی با نانوذرات سلنیم تولید شده با روش غیر زیستی دارند. این تفاوت‌های ساختاری ناشی از تنوع آنزیم‌هایی است که عمل احیا را در این باکتری‌ها کاتالیز می‌کردند (Oremland *et al.*, 1989; Oremland *et al.*, 2004). به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های احیاکننده اکسی آنیون‌های سلنیم دارای پتانسیل بی‌نظیری برای بیوسنتز فرم عنصری سلنیم و نانومواد سلنیدی تحت شرایط محیطی با استفاده از پیش ماده‌های سلنیم از مواد خام کم‌هزینه و یا پساب‌ها می‌باشند.



شکل ۵: (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از *Bacillus sp. Strain TR-6* رشد کرده در محیط کشت LB حاوی اکسی آنیون سلنات (پیکان‌ها نشان دهنده نانوذرات سلنیم تولید شده می‌باشند). (B) نمودار حاصل از EDX نانوذرات تولید شده توسط باکتری *Bacillus sp. Strain TR-6* در مجاورت با اکسی آنیون سلنات.

## نتیجه گیری

امروزه میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها به عنوان میکروکارخانه‌های مهم تولید نانومواد سازگار با محیط زیست و ایمن مطرح هستند. مطالعات این تحقیق نشان داد که باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 دارای پتانسیل معدنی‌سازی زیستی سلنیم از سلنات در شرایط هوایی می‌باشد. بنابراین باکتری مذکور نه تنها پتانسیل لازم برای زدودن سلنات از آب‌های آلوده را دارد، بلکه می‌تواند آن را به شکل ارزشمند نانوذرات سلنیم تبدیل کند. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان باکتری *Bacillus* sp. Strain TR-6 را به عنوان انتخابی باارزش در علم و کاربردهای زیست‌پالایی و نانو فناوری زیستی معرفی کرد. همچنین نتایج این پژوهش بیانگر این می‌باشد که روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی فرایندهای معدنی‌سازی زیستی سلنیم استفاده گردد. به طوری که با استفاده از این روش می‌توان بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر فرایند را با تعداد کمتری از آزمایش‌ها به طور موثر انجام داد.

## منابع

- Butler, C.S., Debieux, C.M., Dridge, E.J., Splatt, P., Wright, M. 2012. Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*, *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1239-1243.
- Dobias, J., Suvorova, E.I., Bernier-Latmani, R. 2011. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology*, 22(19), 195605.
- Eswayah, A.S., Smith, T.J., Gardiner, P.H. 2016. Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(16), 4848-4859.
- Nancharaiah, Y.V., Lens, P.N. 2015a. Selenium biomineralization for biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 33(6), 323-330.
- Nancharaiah, Y.V., Lens, P.N.L. 2015b. Ecology and Biotechnology of Selenium-Respiring Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 61-80.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S. 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 52-60.
- Oremland, R.S., Hollibaugh, J.T., Maest, A.S., Presser, T.S., Miller, L.G., Culbertson, C.W. 1989. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9), 2333-2343.
- Piroeva, I., Atanassova-Vladimirova, S., Dimowa, L., Sbirikova, H., Radoslavov, G., Hristov, P., Shivachev, B. 2013. A simple and rapid scanning electron microscope preparative technique for observation of biological samples: application on bacteria and DNA samples. *Bulg. Chem. Commun*, 45(4), 510-515.
- Preetha, B., Viruthagiri, T. 2007. Application of response surface methodology for the biosorption of copper using *Rhizopus arrhizus*. *Journal of hazardous materials*, 143(1-2), 506-510.
- Raevskaya, A.E., Stroyuk, A.L., Kuchmiy, S.Y., Dzhagan, V.M., Zahn, D.R., Schulze, S. 2008. Annealing-induced structural transformation of gelatin-capped Se nanoparticles. *Solid State Communications*, 145(5-6), 288-292.

- Razavi, A.S. 2019. Study of Biomineralization of Selenium by the Seleno-oxyanions Reducing Microorganisms, Master of Science Thesis, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch.
- Santos, S., Ungureanu, G., Boaventura, R., Botelho, C. 2015. Selenium contaminated waters: an overview of analytical methods, treatment options and recent advances in sorption methods. *Science of the Total Environment*, 521, 246-260.
- Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N.R., Singh, N. 2010. Biosorption optimization of lead (II), cadmium (II) and copper (II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. *Journal of hazardous materials*, 174(1-3), 623-634.
- Sohbatzadeh Lonbar, H. 2016. Experimental investigation of operational parameters involved in uranium biosorption in fixed-bed columns using composite biosorbent of Pseudomonas-chitosan, PhD thesis. Amirkabir University of Technology & Nuclear Science and Technology Research Institute.
- Soudi, M.R., Tajer Mohammad Ghazvini, P., Khajeh, K., Gharavi, S. 2009. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel Bacillus sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *Journal of hazardous materials*, 165(1-3), 71-77.
- Stolz, J., Basu, P., Oremland, R. 2002. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. *International Microbiology*, 5(4), 201-207.
- Tajer- Mohammad-Ghazvini, P. 2007. Study of microbial reduction of oxyanions under the condition of selenooxyanions-tellurite dual pollution, Master of Science Thesis. Alzahra University, Tehran, Iran.
- Wadhvani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Chopade, B.A. 2016. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(6), 2555-2566.
- Witek-Krowiak, A., Chojnacka, K., Podstawczyk, D., Dawiec, A., Pokomeda, K. 2014. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology*, 160, 150-160.
- Yuan, Y., Zhu, J., Liu, C., Yu, S., Lei, L. 2015. Biomineralization of Se nanosphere by Bacillus licheniformis. *Journal of Earth Science*, 26(2), 246-250.



## Application of Response Surface Methodology in optimization of Selenate bioreduction to selenium nanoparticles by *Bacillus* sp. Strain TR-6

A.S. Razavi <sup>1</sup>, P.Tajer-Mohammad-Ghazvini <sup>2\*</sup>, J.Hamedi <sup>3</sup>

Received: 2019.7.22

Accepted: 2019.12.7

### Abstract

Biomining of Selenium by bacteria not only has the potential to remove toxic Selenium oxyanions from the environment, but can also produce nano- scale elemental Selenium. In this work, the Response Surface Method (RSM) based on the Box- Behnken design was used for evaluation and optimization of different process parameters affecting on the bioreduction process of Selenate. The proposed second order model with a correlation coefficient  $R^2 = 0.96$  appropriately predicted the process behavior and determined the 41.25 percent reduction of Selenate by *Bacillus* sp. Strain TR-6 at 5.24 percent initial bacterial inoculation, process time of 24 h and 3.8 mM concentration of Sodium Selenate was optimal. Scanning Electron Microscope (SEM) with the Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) confirmed the ability of the selected bacteria to produce Selenium nanospheres. Finally, *Bacillus* sp. Strain TR-6 is determined as a valuable candidate for nano- technologies and Selenium biomineralization processes.

**Keywords:** Bacterial Reduction, Experimental Design, Nanobiotechnology, Selenium Oxyanions.

---

1- Department of Microbiology, Faculty of Advance Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

\*(Corresponding Author: ptajer@aeoi.org.ir)

3- Department of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

## اثر سفیدبالک گلخانه‌ای *Trialeurodes vaporariorum* تیمار شده با قارچ *Beauveria bassiana* بر

### نمو، طول عمر و تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر (*Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae)

مرجان سیدی\*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

## چکیده

کنه‌ی شکارگر *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) و قارچ بیماری‌گر *Beauveria bassiana* از دشمنان طبیعی مهم سفیدبالک گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) هستند. در این پژوهش، اثر سفیدبالک گلخانه‌ی تیمار شده با غلظت ۱۰<sup>۵</sup> کنیدی در میلی‌لیتر جدا به DEB1008 قارچ در بازه‌های زمانی مختلف (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی نمو و تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر بررسی شد. نتایج بررسی تیمارها بر طول دوره نمو از تخم تا کنه‌ی کامل نشان داد که طول دوره‌ی نمو کنه‌ی شکارگر با تغذیه از سفیدبالک گلخانه‌ی سالم (شاهد) و سفیدبالک گلخانه‌ی تیمار شده با قارچ (بازه‌ی زمانی صفر) نسبت به سایر بازه‌های زمانی آلودگی کمتر بود؛ هم‌چنین تجزیه‌ی آماری نشان داد که در تعداد تخم گذاشته شده توسط کنه‌ها در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری ( $P < 0.001$ ;  $F = 356/11$ ) وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی تاثیر نامطلوب قارچ با افزایش طول زمان آلودگی است. بنابراین توصیه می‌شود این دو عامل به صورت همزمان مورد استفاده قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** سازگاری، *Trialeurodes vaporariorum*، قارچ بیماری‌گر حشرات، *Phytoseiidae*

## مقدمه

سفیدبالک گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae)، آفتی با دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیع می‌باشد و در کلیه کشورهای اروپایی و آسیایی مشاهده می‌شود (Van Lenteren & Woets, 1988). در حال حاضر برای کنترل جمعیت این آفت از انواع آفت‌کش‌ها استفاده می‌شود. به علت سرعت تولید مثل زیاد این آفت، جمعیت آفت مجدد افزایش می‌یابد و کاربرد چندین باره آفت‌کش لازم می‌شود که علاوه بر هزینه‌های زیاد مهار شیمیایی، مسئله‌ی مقاومت در آفات و از بین رفتن دشمنان طبیعی را به دنبال دارد، از این رو متخصصین استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک را پیشنهاد

می‌دهند (Seiedy *et al.*, 2010). کنترل بیولوژیک می‌تواند محور و زیر بنای اصلی یک برنامه مدیریتی باشد که در آن روش‌های مختلف کنترل در یک اکوسیستم با یکدیگر ترکیب و به کار برده شوند (Mahr *et al.*, 2001). استفاده از عوامل بیولوژیک می‌تواند بسیار موثر و بی‌خطر باشد، به شرط آن‌که برهم‌کنش موجود بین تمام عوامل درگیر به خوبی مطالعه شود (James & Lighthart, 1994). از بین دشمنان طبیعی سفید بالک گلخانه، می‌توان به کنه فیتوزئیده (*Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) اشاره کرد که این کنه به خانواده Phytoseiidae و راسته‌ی Mesostigmata تعلق دارد (Mortazavi *et al.*, 2019). خانواده‌ی Phytoseiidae، خانواده‌ای بزرگ و با پراکندگی جهانی است. *A. swirskii* کنه‌ی شکارگری است که از کنه‌های گیاهی هم‌چون (*Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)، سفیدبالک‌ها، تریپس و تخم پروانه‌ها تغذیه و از دانه‌گرده و شهد گل‌ها به عنوان غذای کمکی استفاده می‌کند (Messelink *et al.*, 2006). هم‌چنین می‌توان برای کنترل سفید بالک گلخانه، از آفت‌کش‌های بیولوژیک مانند *Beauveria bassiana* استفاده کرد (Poprawski *et al.*, 2000). Sung و همکاران در سال ۲۰۰۷ عنوان کردند که قارچ *Beauveria bassiana* به قارچ‌های ناقص یا دئوترومیکوتینا تعلق دارد که دارای فرم کنیدیایی یا آنامورف است ولی فرم جنسی در آن‌ها ناشناخته و یا نادر می‌باشد، این قارچ از لحاظ رده‌بندی متعلق به رده Ascomycota، راسته Hypocreales و خانواده Cordycipitaceae است.

برتری قارچ‌های بیمارگر به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک به علت زهراگینی زیادشان علیه آفات و کم‌خطر بودن برای کنه‌های مفید و حشرات غیر هدف می‌باشد (Thungrabeab & Tongma, 2007). بیماری‌های ناشی از قارچ در طبیعت در تعدادی از حشرات شکارگر مشاهده شده است (Goettel *et al.*, 1990)، بررسی اثرات این دو بر یکدیگر، درک ارتباطات و برهم‌کنش‌های دو دشمن طبیعی را افزایش می‌دهد و امکان کاربرد توأم آن‌ها را در برنامه‌های کنترل بیولوژیک فراهم می‌کند. استفاده از دشمنان طبیعی به کاهش کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی متداول کمک خواهد کرد و بنابراین آلودگی محیطی کاهش می‌یابد و اطمینان خاطر از سالم بودن مواد غذایی فراهم می‌شود. در برخورد با مسائل مربوط به کنترل شیمیایی سفید بالک گلخانه، کنترل بیولوژیک تنها به کنه‌های شکارگر متکی نیست، بلکه به دستیابی‌های بیوتکنولوژی نو نیز وابسته است. هم‌زمان با به‌کارگیری ارقام مقاوم گیاه به سفید بالک گلخانه، علاقه‌مندی به کاربرد عوامل میکروبی بر ضد سفید بالک گلخانه نیز رو به افزایش است (Sztejenberg *et al.*, 1997).

در این مطالعه، پارامترهای جدول زندگی کنه‌ی شکارگر در ۴ بازه زمانی که از آلودگی سفید بالک به قارچ گذشته است، مورد بررسی قرار گرفت تا سازگاری و امکان کاربرد این دو عامل کنترل بیولوژیک برای کنترل سفید بالک مشخص شود.

## مواد و روش‌ها

به منظور پرورش سفیدبالک *Trialeurodes vaporariorum*، به گیاه خیار نیاز بود، بنابراین کاشت بذره‌های خیار درختی (*Cucumis sativus* L.) رقم PS هلندی در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵۰-۷۰ درصد و دمای حدود  $25 \pm 5$  درجه سلسیوس نگهداری شدند.

پس از ۶ تا ۸ برگی شدن بوته‌ها، از سفیدبالک گلخانه برای آلوده سازی آنها استفاده شد و در ژرمیناتور با شرایط رطوبت ۵۰ درصد و دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Fazeli-Dinan et al. 2016).

در این پژوهش، جدایه‌ی قارچ *Beauveria bassiana* با کد DEBI008 از دانشگاه تهران تهیه و استفاده شد. برای تولید مقدار زیادی هاگ، جدایه مورد نظر در محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar (SDA) همراه با یک درصد عصاره مخمر (Y) درون تشتک پتری کشت شد و اطراف آن با پارافیلیم بسته شد. محیط‌های کشت به مدت یک ساعت زیر پرتو فرابنفش قرار داده شد تا میکروارگانیسم‌های احتمالی آنها از بین بروند. سپس تشتک‌های تلقیح شده با جدایه قارچ در درون ژرمیناتور با دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، قرار داده شدند. کلنی کنه‌ی شکارگر *Amblyseius swirskii* در آزمایشگاه اکولوژی و رفتارشناسی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران روی کنه‌ی انباری پرورش داده شد. ظروف پرورش و همسن سازی این کنه در ژرمیناتور در شرایط رطوبت ۵۰ درصد و دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

## تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های اثر سفیدبالک گلخانه تیمار شده با قارچ در بازه‌های زمانی مختلف (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) روی نمو و تخم‌ریزی کنه شکارگر به کمک نرم افزار آماری SAS 9.1 و آزمون F-LSD انجام شد.

## نتایج

کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* می‌تواند با تغذیه از هر یک از تیمارها (سفیدبالک‌های تیمار شده با قارچ *B. bassiana* در بازه‌های زمانی مختلف) رشد و نمو خود را کامل کند. داده‌های مربوط به طول دوره‌ی تفریح کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* در جدول ۱ مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود، بین میانگین‌های طول دوره‌ی تفریح تخم در بین افراد ماده

و نر در تیمارهای مختلف از لحاظ آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P = 0/96$  ;  $F = 0/08$  ; برای جنس نر؛  $P = 0/80$  ;  $F = 0/40$  برای جنس ماده).

جدول ۱: میانگین و خطای استاندارد دوره‌ی تفریخ تخم (ساعت) کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* بر تیمارهای مورد بررسی

تیمار تعداد کنه	شاهد	صفر	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۲۴ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۴۸ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۷۲ ساعت
تعداد کنه های ماده	۲۶	۲۴	۲۴	۲۶	۲۷
تعداد کنه های نر	۱۹	۲۱	۲۳	۲۱	۲۰
میانگین تفریخ ± خطای استاندارد تعداد کنه های ماده	۰/۸۸ ± ۰/۰۴	۰/۸۸ ± ۰/۰۵	۰/۸۸ ± ۰/۰۵	۰/۸۸ ± ۰/۰۴	۰/۸۷ ± ۰/۰۴
میانگین تفریخ ± خطای استاندارد تعداد کنه های نر	۱ ± ۰/۰۵	۱ ± ۰/۰۶	۱ ± ۰/۰۷	۱/۰۲ ± ۰/۰۲	۱/۰۲ ± ۰/۰۲

داده‌های نمو لارو کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* در جدول ۲ مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود، تفاوت معنی داری بین میانگین‌های طول دوره‌ی لاروی بین افراد ماده در تیمارهای مختلف مشاهده نشد ولی در افراد نر از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین میانگین طول دوره‌ی لاروی در تیمارهای مختلف مشاهده شد ( $P = 0/05$  ;  $F = 0/90$  ; برای جنس نر؛  $P = 0/90$  ;  $F = 0/19$  برای جنس ماده).

جدول ۲: میانگین و خطای استاندارد دوره‌ی نمو لارو (ساعت) کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* بر تیمارهای مورد بررسی (حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد در گروه بندی F-LSD است)

تیمار تعداد کنه	شاهد	صفر	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۲۴ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۴۸ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۷۲ ساعت
تعداد کنه های ماده	۲۶	۲۴	۲۴	۲۶	۲۷
تعداد کنه های ماده	۱۹	۲۱	۲۳	۲۱	۲۰
میانگین ± خطای استاندارد کنه های ماده	۱/۱ ± ۰/۰۵	۱/۱ ± ۰/۰۵	۱/۱ ± ۰/۰۵	۱/۱۵ ± ۰/۰۵	۱/۱۷ ± ۰/۰۵
میانگین ± خطای استاندارد کنه های نر	۰/۸۴ ± ۰/۰۵ c	۰/۸۳ ± ۰/۰۵ d	۰/۸۵ ± ۰/۰۵ c	۰/۹ ± ۰/۰۶ b	۰/۹۳ ± ۰/۰۵ a

داده‌های طول دوره‌ی نمو پوره‌ی سن اول کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* در جدول ۳ آورده شده است. تفاوت معنی داری بین میانگین‌های طول دوره‌ی نمو پوره‌ی سن اول بین افراد ماده در تیمارهای مختلف مشاهده شد ( $F = 4/19$  ;  $P = 0/0003$ ). در این آزمایش با مقایسه میانگین‌ها در جنس نر مشخص شد که طول این دوره در هر پنج تیمار با هم تفاوت معنی داری داشت ( $F = 0/42$  ;  $P = 0/04$ ).

**جدول ۳: میانگین و خطای استاندارد دوره‌ی نمو پوره‌ی سن اول (ساعت) کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* بر تیمارهای مورد بررسی (حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد در گروه بندی F-LSD است)**

تیمار	شاهد	صفر	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت
تعداد کنه های ماده	۲۶	۲۴	۲۴	۲۶	۲۷
تعداد کنه های نر	۱۹	۲۱	۲۳	۲۱	۲۰
میانگین $\pm$ خطای استاندارد کنه های ماده	۱/۱۷ $\pm$ ۰/۰۸ c	۱/۱۹ $\pm$ ۰/۰۹ b	۱/۱۵ $\pm$ ۰/۰۸ c	۱/۲۱ $\pm$ ۰/۰۸ a	۱/۲۰ $\pm$ ۰/۰۸ a
میانگین $\pm$ خطای استاندارد کنه های نر	۱/۴۲ $\pm$ ۰/۱۵ b	۱/۳۶ $\pm$ ۰/۱۵ c	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۱۴ c	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۱۴ a	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۱۴ a

داده‌های طول دوره‌ی نمو پوره‌ی سن دوم کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* در جدول ۴ آورده شده است. تفاوت معنی‌داری

بین میانگین‌های طول دوره‌ی نمو پوره‌ی سن دوم بین افراد ماده و نر در تیمارهای مختلف مشاهده شد ( $F=۳/۲۶$ ;  $P=۰/۰۰۱$ ) برای جنس نر؛  $F=۱۲/۴۰$ ;  $P<۰/۰۰۰۲$  برای جنس ماده).

در این آزمایش مشاهده شد که بیشترین و کمترین طول دوره در جنس نر شکارگر به ترتیب در اثر تغذیه از سفید بالک‌های تیمار شده با قارچ *B. bassiana* (۷۲ ساعت بعد از تیمار شدن) و سفید بالک‌های تیمار شده با Tween 80 (شاهد) است و بیشترین طول دوره در جنس ماده‌ی شکارگر در اثر تغذیه از سفید بالک‌های تیمار شده با قارچ *B. bassiana* (۷۲ ساعت بعد از تیمار شدن) و کمترین در اثر تغذیه از سفید بالک‌های تیمار شده با Tween 80 (شاهد)، صفر ساعت بعد از تیمار شدن سفید بالک‌ها و ۲۴ ساعت بعد از تیمار شدن سفید بالک‌ها است.

**جدول ۴: میانگین و خطای استاندارد دوره‌ی نمو پوره‌ی سن دوم (ساعت) کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* بر تیمارهای مورد بررسی (حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد در گروه بندی F-LSD است)**

تیمار	شاهد	صفر	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعت	سفید بالک تیمار شده با قارچ در بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت
تعداد کنه های ماده	۲۶	۲۴	۲۴	۲۶	۲۷
تعداد کنه های نر	۱۹	۲۱	۲۳	۲۱	۲۰
میانگین $\pm$ خطای استاندارد کنه های ماده	۳/۰۲ $\pm$ ۰/۱۱ c	۳/۰۲ $\pm$ ۰/۳۱ c	۳/۰۲ $\pm$ ۰/۱۱ c	۳/۳۳ $\pm$ ۰/۱۶ b	۳/۱۵ $\pm$ ۰/۱۵ a
میانگین $\pm$ خطای استاندارد کنه های نر	۲/۶۱ $\pm$ ۰/۱۳ c	۲/۶۴ $\pm$ ۰/۱۳ bc	۲/۶۷ $\pm$ ۰/۱۲ bc	۲/۹۸ $\pm$ ۰/۱۸ ab	۳/۱۵ $\pm$ ۰/۱۸ a

برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر لازم است به این سوال پاسخ داده شود که کنه‌ی شکارگر در هر تیمار چند روز عمر می‌کند؟

هر قدر طول عمر کنه روی تیماری بیشتر باشد و پیرو آن در این دوره تخم بیشتری هم بگذارد، می‌توان گفت که میزبان مناسب‌تری برای کنه‌ی شکارگر نسبت به سایرین است.

به همین منظور تعداد روزهایی که کنه‌ها روی تیمارهای مختلف زنده ماندند محاسبه و مورد تجزیه‌ی آماری قرار

گرفت و مشخص شد که کم‌ترین طول عمر کنه‌ی شکارگر با تغذیه از سفید بالک‌های تیمار شده با قارچ پس از ۷۲ ساعت

تیمار شده با قارچ پس از صفر (۲۴/۰۵±۱/۰۹b)، ۲۴ (۲۴/۴۱±۰/۹۱a) و ۴۸ (۲۴/۲۳±۰/۸۷a) ساعت است. تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که طول عمر کنه‌ها در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌داری (F= ۱۳۲/۹۴ ; P>۰/۰۵) ندارند.

میزان تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر بر هر تیمار به طور مجزا محاسبه شد و میانگین تخم‌ریزی‌اش مورد تجزیه آماری قرار گرفت (جدول ۵). تجزیه آماری نشان داد که در تعداد تخم گذاشته شده توسط کنه‌ها در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری (F= ۳۵۶/۱۱ ; P<۰/۰۰۱) مشاهده می‌شود. مقایسه آماری میانگین تخم‌های گذاشته شده در تیمارهای مختلف نشان داد که کنه‌های شکارگری که از سفید بالک تیمار شده با Tween 80 (شاهد) و سفید بالک تیمار شده با قارچ پس از صفر ساعت تغذیه کرده بودند بیشترین میزان تخم‌ریزی را (۱۰/۴۲ و ۱۰/۵۴) داشتند. در این بررسی کم‌ترین میزان تخم گذاشته شده مربوط به کنه‌های شکارگری بود که از سفید بالک‌های تیمار شده با قارچ پس از ۷۲ ساعت تغذیه کرده بودند.

**جدول ۵: میانگین و خطای استاندارد میزان تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* در تیمارهای مورد بررسی (حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد است)**

تیمار	شاهد	صفر	سفيد بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۲۴ ساعت	سفيد بالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۴۸ ساعت	سفیدبالک تیمار شده با قارچ در بازه زمانی ۷۲ ساعت
تعداد کنه‌های ماده	۲۶	۲۴	۲۴	۲۶	۲۷
میانگین ± خطای استاندارد	۱۰/۴۲ ± ۰/۵۶ a	۱۰/۵۴ ± ۰/۵۴ a	۹/۵ ± ۰/۵۷ b	۵/۵ ± ۰/۴۲ c	۴/۹۳ ± ۰/۲۸ d

از آنجا که مطالعه نمو و تخم‌ریزی نمونه‌های آزمایشگاهی تحت شرایط تعیین شده دما، رطوبت و کمیت غذا انجام می‌شود، کیفیت غذا را می‌توان تنها عاملی دانست که باعث تفاوت بین پارامترهای رشدی یک بندپا با تغذیه از میزبان‌های مختلف می‌شود. عوامل کنترل قارچی پتانسیل بالقوه منفی بر دشمنان طبیعی آفات (اثر مستقیم) و کاهش جمعیت شکار آن‌ها (اثر غیر مستقیم) دارند (Roy & Pell, 2000) و همچنین می‌توانند بر کیفیت شکار آن‌ها اثر بگذارند، بنابراین بیمارگرها می‌توانند باروری و میزان تخم‌ریزی بندپایان را تحت تاثیر قرار دهند (Wekesa *et al.*, 2007). بیشتر مطالعات روی بیمارگرهای حشرات فقط در مورد مرگ میزبان بحث می‌کند اما اخیراً توجه‌ها بر اثرات جانبی، هم‌چون کاهش باروری (Roy *et al.*, 2006, 2008) متمرکز شده است.

همان‌طور که مشاهده شد با افزایش زمان آلودگی سفید بالک‌های تیمار شده به قارچ بیمارگر از صفر تا ۷۲ میزان تخم‌ریزی کاهش پیدا می‌کند، سفید بالک‌هایی که تحت پاشش Tween 80 و تحت پاشش قارچ در بازه زمانی صفر قرار گرفتند؛ هیچ تفاوتی در میزان تخم‌ریزی‌شان مشاهده نشد، چون هنوز سفید بالک‌ها تحت آلودگی قارچ بیمار نشده بودند و محتوا و کیفیت خود را حفظ کرده بودند. سودمندی یا ارزش نسبی سفید بالک تیمار شده با قارچ در این بازه (از نظر میزان اسیدهای

آمینه و مواد ضروری بدن) برای کنه‌ی شکارگر تفاوتی با کنه‌های شاهد (تحت پاشش Tween 80) نداشت و به همین علت عواملی چون میزان تخم‌ریزی تحت تاثیر قرار نگرفت، اما با گذشت آلودگی از محتوا و کیفیت شکار کاسته شد و به همان میزان روی کنه‌های شکارگر اثر گذاشت.

بررسی‌های بسیاری در باره‌ی اثر عوامل بیماری‌گر به صورت مستقیم بر باروری و تخم‌ریزی حشرات و کنه‌ها انجام شده است از جمله Kayya و همکاران در سال ۱۹۹۶ کاهش باروری در ماده‌ی *Rhipicephlus appendiculatus* Neumann و *Amblyomma variegatum* Fabricius از خانواده‌ی Ixodidae را به دنبال آلودگی به قارچ‌های بیماری‌گر *B. bassiana* و *M. anisopliae* گزارش کردند که در کنه‌ی *A. variegatum* باز شدن تخم‌ها نیز به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد. Samish و همکاران در سال ۲۰۰۱ کاهش تخم‌ریزی را در کنه‌ی (*Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) در اثر آلودگی به قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* گزارش کردند.

Rosas-Acevedo و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که قارچ *Hirsutella thompsoni* می‌تواند از تخم‌ریزی کنه *Tetranychus urticae* جلوگیری کند، اگر چه بقای تخم‌ها تحت تاثیر قرار نگرفت.

بنابر گزارش Baverstock و همکاران (۲۰۰۶) آلودگی شته *Acyrtosiphon pisum* به قارچ *Pandora neoaphidis* (Remaudiere and Hennebert) به طور معنی‌داری تولید پوره را یک روز بعد از پاشش کاهش داد و همچنین شته‌های آلوده به قارچ *P. neoaphidis* تولید زادگان‌شان در تمام بازه‌های زمانی (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) کاهش پیدا کرد.

Roy و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که دز ۱۰<sup>۹</sup> کنیدی در میلی‌لیتر قارچ *B. bassiana*، باروری کفشدوزک *Adalia bipunctata* را تا صفر کاهش داد و آنها در بررسی اثر قارچ *B. bassiana* روی کفشدوزک *Harmonia axyridis* نشان دادند تولید تخم در مقایسه با شاهد به صورت چشمگیری کاهش می‌یابد و این مشخص می‌کند که وجود قارچ برای میزبان (کفشدوزک) مضر است.

Wekesa و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی اثرات قارچ *Neozygites floridana* بر شکارگری و تخم‌ریزی کنه‌ی *P. longipes* پرداختند که از کنه‌های *T. urticae* و *T. evansi* آلوده به این قارچ تغذیه می‌کردند. هیچ جسم هیفی شکل از این قارچ در این کنه‌ی شکارگر پس از تغذیه از سفیدبالک‌های شکار آلوده پیدا نشد و این موضوع اشاره می‌کند که این قارچ برای این کنه‌ی شکارگر بیماری‌زا نیست و همچنین بر تخم‌ریزی‌اش اثر ندارد.

Simelane و همکاران در سال ۲۰۰۸ دریافتند که لاروها و بالغ‌های کفشدوزک هفت نقطه‌ای به راحتی شته‌های آلوده به (*Neozygites fresenii* (Nowakowski) (Entomophthorales: Neozygitaceae) را شکار می‌کنند. وقتی کفشدوزک از شته‌های آلوده به این قارچ تغذیه کرد، زمان رشد و نمو کفشدوزک به طور معنی‌داری طولانی‌تر شد و تولید تخم به طور معنی‌داری در مقایسه با هم‌گونه‌های تغذیه شده روی یک رژیم غذایی از شته‌های غیر آلوده کمتر شد.



در بررسی حاضر مشخص شد که طول دوره‌ی نمو از تخم تا کنه‌ی کامل در جنس ماده، طول دوره‌ی زندگی و میزان تخم‌ریزی کنه‌ی شکارگر زمانی که از سفیدبالک‌های آلوده به Tween 80 و قارچ در بازه‌ی زمانی صفر تغذیه می‌کنند با هم تفاوت معنی‌داری ندارند؛ همچنین کنه‌ی شکارگر با تغذیه از سفیدبالک‌های تیمار شده با قارچ پس از ۷۲ ساعت، مراحل نمو طولانی و طول عمر کم و میزان تخم‌ریزی کمتری نسبت به سایر تیمارها دارد.

در کاربرد این عوامل بیولوژیک با هم؛ کنه‌ی شکارگر *A. swirskii* و قارچ بیمارگر *B. bassiana*، آگاهی از پتانسیل شکارگری کنه‌ی *A. swirskii* به‌منظور پیش‌بینی قدرت و توانایی آن برای پایین نگه‌داشتن جمعیت‌های سفیدبالک همراه با کاربرد قارچ بیمارگر لازم است. بنابراین برای به‌دست آوردن نتیجه‌ی مطلوب از این دو عامل بیولوژیک در کنترل سفیدبالک‌ها، کاربرد همزمان کنه شکارگر و قارچ بیمارگر، توصیه می‌گردد.

به علت تنوع در میان عوامل بیمارگر حشرات و کنه‌ها و اثرات‌شان روی میزبان‌ها و با توجه به این که آشیان‌های اکولوژیک متنوع و متعدد را اشغال می‌کنند، پژوهش‌های آزمایشگاهی مانند آزمایش صورت‌گرفته‌ی حاضر اطلاعاتی را فقط در ارتباط با جمعیت انتخاب شده (در دما و رطوبت مطلوب برای عوامل بیمارگر) فراهم می‌کند و ارزیابی و پیش‌گویی اثرات این عوامل بیمارگر بر موجودات غیر هدف با استفاده از این نتایج آزمایشگاهی شاید در اکوسیستم زراعی به صورت عملی امکان‌پذیر نباشد.

## سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی انجام شد که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- Baverstock, J., Roy, H. E., Clark, S. J., Alderson, P. G., Pell, J. K. (2006) Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 136-139.
- Fazeli-Dinan, M., Talaei-Hassanlou, R., Goettel, M. (2016) Virulence of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium longisporum* against the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and its parasitoid *Encarsia Formosa*. *International Journal of Pest Management*, 62: 251-260.
- Goettel, M. S., Poprawski, T. J., Vandenberg, J. D., Li, Z., Roberts, D. W. (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird, M., Lacey, L. A., and Davidson, F. W. (Eds.), *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press, Florida, pp. 209-231.
- James, R. R., Lighthart, B. (1994) Susceptibility of the convergent ladybeetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. *Environmental Entomology*, 23: 190-192.

- Kayya, G. P., Mwangi, E. N., Ouna, E. A. (1996) Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, with the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20.
- Mahr, S. E., Cloyd, R. A., Maher, D., Sadof, C. S. (2001) Biological control of insects and other pest of Greenhouse crop. University of Wisconsin. 99 pp.
- Messelink G., Sebastiaan E.F., van Steenpaal S., Ramakers P.M.J. (2006) Evaluation of phytoseiid predators for control of western flower thrips on greenhouse cucumber. *Biocontrol* 51:753–768.
- Mortazavi, N, Fathipour, Y., Talebi, A.A. (2019) The efficiency of *Amblyseius swirskii* in control of *Tetranychus urticae* and *Trialeurodes vaporariorum* is affected by various factors. *Bulletin of Entomological Research*, 109: 365-375.
- Poprawski, T.J., Greenberg, S.M., and Ciomperlik, M.A. (2000) Effect of host plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* induced mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae). *Biological control*, 29: 1048-1053.
- Rosas-Acevedo, J. L., Boucias, D. G., Lezama, R., Sims, K., Pescador, A. (2003) Exudates from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Experimental & Applied Acarology*, 29: 213-225.
- Roy, H. E., Brown, P. M. J., Rothery, P., Ware, R. L., Majerus, M. E. N. (2008) Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl*, 53: 265-276.
- Roy, H. E., Pell, J. K. (2000) Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. *Biocontrol Science & Technology*, 10: 737-752.
- Roy, H. E., Steinkraus, D., Eilenberg, E., Hajek, A., Pell, J. K. (2006) Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual review of Entomology*, 51: 331-357.
- Samish, M., Gindin, G., Alekseev, E., Glazer, I. (2001) Pathogenicity of entomopathogenic fungi on different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, 87: 1355-1359.
- Seiedy, M., Saboori, A., Allahyari, H., Talaei-Hassanloui, R., Tork, M. (2010) Laboratory investigation on the virulence of two isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the two-spotted mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 36: 527-532.
- Simelane, D. O., Steinkraus, D. C., Kring, T. J. (2008) Predation rate and development of *Coccinella septempunctata* L. influenced by *Neozygites fresenii*- infected cotton aphid prey. *Biological Control*, 44: 128-135.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-ard, J. J., Shreshta, B., Spatafora, J. W. (2007) Phylogenetic classification of cordyceps and the clavicipitaler fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5-59.
- Sztejnberg, A., Doron-Shloush, S., Gerson, U. (1997) The biology of the acaropathogenic fungus *Hirsutella kirchneri*. *Biocontrol Science & Technology*, 7: 577-590.
- Thungrabeab, M., Tongma, S. (2007) Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insects. *KMITL Science & Technology Journal*, 7: 8-12.
- Van der Geest, L. P. S., Elliot, S. L., Breeuwer, J. A. J., Beerling, E. A. M. (2000) Diseases of mites. *Experimental & Applied Acarology*, 24: 497-560.
- Van Lenteren, J. C., Woets, J. (1988) Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual review of Entomology*, 33: 239-269.

Wekesa, V. W., Moraes, G. J., Knapp, M., Delalibera-Jr, I. (2007) Interaction of two natural enemies of *Tetranychus evansi*, the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) and predatory mite, *Phytoseiulus longipes* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol*, 41: 408-414.

**The effect of *Beauveria bassiana*-treated *Trialeurodes vaporariorum* on the development, longevity and oviposition of the predatory mite, *Amblyseius swirskii***

M. Seiedy<sup>1\*</sup>

Received:2019.7.22

Accepted:2019.12.7

## Abstract

The predatory mite, *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) is an effective predator, feeding on different insects and mites such as whiteflies, thrips and two-spotted spider mites. This predator and entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* are important natural enemies of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). In this study, the effects of fungus-infected *T. vaporariorum* (105 conidia ml<sup>-1</sup>) on the development, longevity and oviposition rate of the predatory mite in different time intervals (0, 24, 48 and 72 hours) at 25±1°C, 60–70%RH and a photoperiod of 16:8 h (L: D) under laboratory conditions were investigated. The results indicated that developmental period of the predatory mite fed on tween 80-treated *T. vaporariorum* (Control) and fungus-treated *T. vaporariorum* (time interval 0) was shorter than other time intervals of infection. The results showed that there were significant differences among the treatments in oviposition rate and also it shows unfavorable effect of entomopathogenic fungus via increasing of infection longevity. So, it is better to use *A. swirskii* and *B. bassiana* simultaneously.

**Keywords:** Compatibility, Entomopathogenic fungi, Greenhouse whitefly, Phytoseiidae.

افزایش مقاومت گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) به شوری خاک، تحت اثر تنظیم-

کننده‌های رشد سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول

## فاطمه شکی<sup>۱</sup>، حسن ابراهیم زاده معبود<sup>۲\*</sup>، وحید نیکنام<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

### چکیده

شوری یکی از مهمترین فاکتورهای محیطی است که رشد و تولید گیاهان را محدود می‌کند و بخش قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، شناسایی روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش شوری در گیاه شوند و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاه جلوگیری نمایند، می‌تواند از روش‌های مقابله با این معضل باشد. در این تحقیق اثر سالیسیلیک-اسید و پنکونازول به تنهایی و به صورت همزمان بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گلرنگ تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای کلرید سدیم (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار)، سالیسیلیک‌اسید (۱mM) و پنکونازول (15mg/l) به مدت ۲۱ روز بر گیاهان اعمال شد. سپس برگ‌های گیاهان جمع‌آوری و در یخچال در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نتایج حاصل نشان داد که محتوای پروتئین تحت تنش شوری شدیدتر به یک دوم گیاهان شاهد کاهش یافت. با این حال، محتوای پرولین حدود سه برابر و محتوای گلاسیسین‌بتائین،  $MDA$ ،  $H_2O_2$  ترکیبات فنلی کل و فعالیت رادیکال DPPH نیز تقریباً دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. علاوه، تنش شوری باعث افزایش بیان ژن‌های  $SOS1$  و  $NHX1$  در گلرنگ شد. تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول نیز باعث افزایش محتوای پروتئین، گلاسیسین‌بتائین،  $H_2O_2$ ، ترکیبات فنلی کل، فعالیت رادیکال DPPH و همچنین افزایش بیان ژن‌های  $SOS1$  و  $NHX1$  شدند. همچنین تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش محتوای پرولین و تیمار پنکونازول باعث کاهش  $MDA$  در گیاهان تحت تنش شد. در مجموع، نتایج نشان داد که برهمکنش این دو تنظیم‌کننده در گیاه می‌تواند اثرات کاهندگی و یا هم‌افزایی به دنبال داشته باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که این دو تنظیم‌کننده رشد می‌توانند باعث افزایش سازگاری و مقاومت گیاه گلرنگ تحت شرایط تنش شوری شوند که با توجه به ارزان و قابل دسترس بودن آنها، برای افزایش مقاومت گلرنگ به تنش می‌توانند مورد توجه قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی پورتر  $NHX1$ ، آنتی پورتر  $SOS1$ ، پنکونازول، سالیسیلیک‌اسید، شوری، گلرنگ.

۱- دانشجوی دکترا، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده علوم زیستی

۲ و ۳- استاد، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده علوم زیستی

\* (نویسنده مسئول: ebizadeh@ut.ac.ir)

## مقدمه

امروزه، گرمایش جهانی (global warming) که منجر به تغییرات اقلیمی می‌شود، می‌تواند باعث شور شدن اولیه خاک شود. در واقع، گرم شدن کره زمین باعث کاهش بارندگی در بسیاری از مناطق شده است و کاهش بارندگی نیز می‌تواند منجر به افزایش میزان شوری خاک شود. شوری بخش قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی را تحت تأثیر قرار داده است (Ali et al., 2004). کشور ما نیز از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه‌خشک دنیا قرار دارد، از این رو شوری خاک و آب آبیاری یکی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است.

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی بومی ایران و متعلق به تیره کاسنیان (Asteraceae) می‌باشد که سازگاری بالایی با شرایط خشکی، شوری و گرما دارد. وجود انواع گونه‌های وحشی که در سراسر کشور پراکنده‌اند نشان از سازگاری بالای این گیاه با آب و هوای کشور دارد. با توجه به سازگاری بالای گلرنگ نسبت به شرایط نامساعد می‌توان این گیاه را در مناطق نامساعدتر و اراضی درجه دوم کشت نمود و با انجام مطالعات بیشتر و اصلاح ارقام مناسب می‌توان به بهبود وضعیت آن در ایران امید داشت (زینلی ۱۳۷۸).

به طور معمول، گیاهان در مواجهه با تنش‌های محیطی، خود را با برخی روش‌های راهبردی در سلول محافظت می‌کنند (Banu et al., 2009). تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین و گلیسین بتائین به عنوان راهبردی اساسی جهت محافظت گونه‌های مختلف گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گرفته است. این ترکیبات در پاسخ به تنش شوری نقش مهمی دارند و در سیتوزول سلول‌های گیاهی، جایی که سبب برقراری تعادل اسمزی است تجمع می‌یابند و به گیاه کمک می‌کنند تا بتواند در شرایط تنش اسمزی زنده بماند (Ashraf & Foolad, 2007).

تنش شوری به دلیل اثرات اسمزی بر فعالیت‌های متابولیک مختلف، کمبود آب را القا می‌کند و در نتیجه منجر به تنش اکسیداتیو از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که صدمه به سلول‌ها را از طریق اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نتیجه می‌دهد. شواهدی در ارتباط با نقش علامت‌رسانی گونه‌های فعال اکسیژن به خصوص پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) به عنوان یک پیام‌رسان مولکولی در گیاهان وجود دارد. محققین معتقدند که  $H_2O_2$  به عنوان فاکتور کلیدی در فرآیندهای آسیمیلایون و تحمل به تنش می‌باشد (Neill et al., 2002). بعلاوه، از تجزیه اسیدهای چرب دارای پیوندهای غیراشباع در غشاء سلول‌های گیاهی، مالون دی‌آلدئید (MDA) تولید می‌شود که غلظت آن به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد. تنش شوری با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، موجب آسیب اکسیداتیو به غشاء و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دی‌آلدئید در گیاهان می‌گردد (Tun et al., 2006). گروه دیگری از ترکیبات که به طور معمول در شرایط تنشی در گیاه فعال می‌گردند ترکیبات فنلی می‌باشند. ترکیبات فنلی به عنوان گروه بزرگی از

متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که جزء آنتی اکسیدان‌ها محسوب می‌شوند و در تنش‌های غیر زیستی می‌توانند در روبش رادیکال‌های فعال اکسیژن ایفای نقش کنند.

از طرف دیگر، در محیط‌های شور، کده‌بندی یون‌هایی که بطور بالقوه آسیب‌رسان هستند راهکار موثری جهت سمیت-زدایی یونی فراهم می‌آورد و در عین حال نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول حفظ می‌کند. بعلاوه، انباشتگی یون‌ها در داخل واکوئل، فشار اسمزی در جهت بهبود جذب آب را فراهم می‌نماید. آنتی پورترهای واکوئلی سدیم/پروتون (NHX1)، پروتئین‌های شامه‌ای هستند که تبادل سدیم را در مقابل پروتون در شامه‌های تونوپلاستی کاتالیز می‌کنند. بعلاوه، خروج  $Na^+$  از سیتوپلاسم به درون آپوپلاست از طریق آنتی‌پورتر SOS1 صورت می‌گیرد. شواهد زیادی وجود دارد که بیان بالای این ژن‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی، تحمل به شوری را افزایش می‌دهد (Pardo & Rubio 2011).

شناسائی روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش شوری در گیاه شوند و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاه جلوگیری نمایند، می‌تواند یکی از روش‌های مقابله با این معضل باشد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، گروهی از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی هستند که باعث تغییر در رشد و الگوهای نموی گیاه می‌شوند و تاثیر عمیقی روی فرآیندهای گیاه دارند (Nair *et al.*, 2009). سالیسیلیک‌اسید ( $C_7H_6O_3$ ) تنظیم‌کننده‌ی درون‌زای رشد با ماهیت فنلی است که به وسیله‌ی سلول‌های ریشه تولید می‌شود و دارای نقش کلیدی در تنظیم رشد و نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌های محیطی است (Hayat *et al.*, 2010). سالیسیلیک‌اسید به عنوان یک جزء پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته شده است. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی مانند ترکیبات فنلی می‌شود که گیاهان می‌توانند از طریق القاء آنزیم‌های دفاعی به طیف وسیعی از تنش‌ها پاسخ دهند (Mueller *et al.*, 1993). ثابت شده است که سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش اثرگذاری تنش‌های محیطی از راه افزایش هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین و سی‌توکینین می‌شود (Shakirova *et al.*, 2003).

تریازول‌ها گروه دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد هستند که خاصیت قارچ‌کشی دارند و باعث حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌گردند. این ترکیبات سبب تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی از جمله افزایش میزان کلروفیل، بزرگ شدن کلروپلاست‌ها و افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Jaleel *et al.*, 2009). یکی از این ترکیبات پنکونازول است که به عنوان تنظیم‌کننده‌ی رشد محسوب می‌گردد (Hassanpour *et al.*, 2012).

در پژوهش حاضر، اثرات تعدیل‌کننده سالیسیلیک‌اسید و پنکونازول در کاهش اثرات تنش شوری بر رقم صفه گلرنگ بررسی شد. مطالعه برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و همچنین بررسی بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* به عنوان ژن‌های کلیدی در مقاومت و تحمل گیاه به افزایش شوری خاک نیز از اهداف این تحقیق بوده است تا اینکه بتوان نتیجه گرفت آیا مجموعه تغییرات در محتوای این ترکیبات پس از کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند باعث افزایش تحمل شوری در گلرنگ شود.

## مواد و روش ها

این آزمایش به صورت گلدانی و در گلخانه‌ی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران در تابستان ۱۳۹۴ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. بذره‌های گیاه گلرنگ (رقم صغه، مقاوم به شوری) از موسسه‌ی اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج تهیه گردید. بذور گلرنگ در گلدان‌هایی به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک و پرلیت به نسبت ۲ به ۱ کشت داده شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت شرایط دمایی  $27 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۵ ساعت رو‌شنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. در سن ۲۵ روزگی گیاهان اعمال تنش شوری آغاز گردید. تیمارها، شامل ۳ تیمار NaCl (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار)، تیمار یک میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (Ghassemi-Golezani & Hosseinzadeh-Mahootchi, 2015) و تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر پنکونازول بوده است. سالیسیلیک اسید به صورت یک روز در میان و پنکونازول هفته‌ای یک‌بار بر گیاهان اعمال شد. غلظت‌های NaCl در این پژوهش بر اساس تحقیقات انجام شده در مطالعات پیشین روی گیاه گلرنگ و همچنین با توجه به میزان تحمل شوری خاک توسط گیاه انتخاب شدند. اعمال تنش شوری از طریق تهیه تیمارها در محلول غذایی هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) با رقت یک دوم خاص هر تیمار شوری و آبیاری گلدان‌ها با این محلول به صورت یک روز در میان صورت پذیرفت. بعد از گذشت ۲۱ روز برگ‌های گیاه جمع‌آوری و در یخچال در دمای  $-70$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### تعیین محتوای پروتئین محلول

به‌منظور استخراج محتوای پروتئینی نمونه‌های گیاهی، از بافر استخراج Tris-HCl با pH 6.8 استفاده شد. یک گرم از بافت گیاهی به همراه ۲ میلی‌لیتر از بافر استخراج شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) سانتریفوژ گردید (J2-21 M, Beckman, Palo Alto, USA). برای سنجش میزان غلظت پروتئین موجود در عصاره پروتئینی استخراج شده از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). بدین منظور ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی عصاره گیاهی ترکیب و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (UV-160, Shimadzu, and Tokyo, Japan) خوانده شد.

### تعیین محتوای پرولین آزاد

به‌منظور استخراج و سنجش محتوای پرولین آزاد موجود در نمونه‌ها، ۱ گرم از بافت تر گیاه توسط ۴ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ در هاون چینی سائیده شد (Bates *et al.*, 1973). محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر از روشناور حاصل با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر اسید



نین‌هیدرین (شامل ۱/۲۵ میلی‌گرم نین‌هیدرین حل شده در ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار و ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال) و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله به حمام یخ منتقل گردید. سپس به محلول واکنش ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و جذب محلول در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان پرولین بر حسب میکروگرم پرولین به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید.

#### تعیین محتوای گلاسیسین بتائین

مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی در ۳۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه برای تعیین محتوای گلاسیسین بتائین حل شد (Greive & Grattan, 1983). به محلول حاصل، معرف یدید پتاسیم سرد و اسید سولفوریک ۲ نرمال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان مقدار ۹ میلی‌لیتر ۱ و ۲ دی کلرواتان به محلول اضافه گردید. در نهایت، پس از گذشت ۳-۳/۵ ساعت به کمک منحنی استاندارد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۵ نانومتر خوانده شد.

#### تعیین محتوای پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )

برای سنجش محتوای پراکسید هیدروژن مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر گیاه توسط ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد TCA در حمام یخ استخراج شد (Velikova et al., 2000). عصاره‌ی به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم اضافه و در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از پراکسید هیدروژن رسم و محتوای پراکسید هیدروژن نمونه‌ها (با ضریب خاموشی  $0.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید.

#### پراکسیداسیون لیپیدها

به‌منظور تعیین محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بر اساس محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) تولید شده، مقدار ۰/۲ گرم بافت تر گیاه توسط ۲ میلی‌لیتر TCA (اسیدتری‌کلرواستیک) ۰/۱ درصد استخراج شد (Heath & Packer, 1968). عصاره‌ی حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و نمونه‌ها به سرعت سرد گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط و دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی حاصل از سانتریفوژ در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید (با ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مول بر سانتی‌متر) که محصول پراکسیداسیون لیپیدهاست، براساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

## تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل

مقدار ۰/۱ گرم از بافت خشک گیاهی توسط متانول ۸۰ درصد در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت استخراج شد (Ranganna, 1986). عصاره‌ی حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف و تبخیر شد و پس از انحلال مجدد در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از معرف فولین برای تعیین محتوای کل ترکیبات فنلی استفاده گردید. در نهایت، جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد.

## بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)

برای این بررسی از روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. برای آماده‌سازی عصاره برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ۰/۱ گرم از بافت گیاهی توسط ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۳ ساعت در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. رادیکال DPPH رادیکال آزاد پایداری به رنگ بنفش است و در اثر واکنش با آنتی‌اکسیدان‌ها احیا می‌شود و به زرد کم‌رنگ تغییر رنگ می‌دهد. واکنش در یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل هیدرات (DPPH) (غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت‌های مورد نظر انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش توسط متانول مطلق به ۴ میلی‌لیتر رسید. مخلوط‌های واکنش به مدت ۳۰ دقیقه، در غیاب نور نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد تنها دارای ۳ میلی‌لیتر متانول و یک میلی‌لیتر رادیکال DPPH متانولی است. درصد بازداری از DPPH نمونه‌ها با مقایسه‌ی نمونه‌های عصاره و نمونه‌ی شاهد و با استفاده از معادله زیر به دست آمد:

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

که در آن I% برابر با درصد بازداری DPPH،  $A_{\text{control}}$  جذب شاهد و  $A_{\text{sample}}$  جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر بوده‌اند.

## بررسی بیان ژن‌ها

RNA کل با استفاده از کیت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) استخراج شد. در مراحل استخراج RNA از هضم DNase روی ستون (On-Column DNase Digestion) برای از بین بردن هر گونه حضور DNA ژنومی مطابق با دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه Qubit (Invitrogen) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شدند.

برای ساخت cDNA نمونه RNA (۳ میکرولیتر) به همراه ۰/۵ میکرولیتر Oligo (dT) و ۰/۵ میکرولیتر راندوم هگزامر به میکروتیوبی سترون با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر منتقل شد. توسط آب تیمار شده با DEPC حجم محلول به ۱۲ میکرولیتر رسانده

شد. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و برای سرد شدن به روی یخ منتقل گردید. سپس ۴ میکرولیتر بافر تکثیر، ۲ میکرولیتر dNTP و یک میکرولیتر Reverse transcriptase به محلول فوق اضافه و مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شد. محصول واکنش برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

برای طراحی پرایمرها (جدول ۱) از نرم افزارهای Oligo7 و Gene Runner (6.5.50) استفاده شد. جستجو با نرم‌افزار Blast با ژنوم گلرنگ انجام شد تا از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل گردد. نتایج نشان داد که پرایمرها دارای محل‌های اتصال منحصر به خود هستند و به طور اختصاصی به ژن‌های هدف متصل می‌گردند. بعلاوه، پرایمرها توسط برنامه Gene Runner بررسی شده‌ی تا از نظر درصد GC، دمای Tm و نیز عدم وجود دایمر با یکدیگر اطمینان حاصل گردد. از ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرها برای بررسی بیان ژن‌ها با روش Real-Time PCR

Gene	Product	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Actin</i>	Actin	TGTTCCAGCCATCTCATGTTGG	TCATGCGATCAGCAATTCAGG
<i>SOS1</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	CACGTCCCAAGAAGGCGCTGAT	CCAGCGCTTTGCCCATCATTTTC
<i>NHX1</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	TCGGGGAAGGCGTCGTGAAT	CCCAACAAAACCCCGCTCACTC

برای بررسی بیان ژن از روش کمیت سنجی نسبی توسط دستگاه Real-Time PCR (Applied Biosystems) و از Master mix SYBR Green Rox که حاوی رنگ آشکارساز سایبرگرین است استفاده شد. برنامه دمایی-زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر ژن مرجع به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اختصاصی اتصال آغازگرهای دو ژن هدف ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در دستگاه اجرا شد.

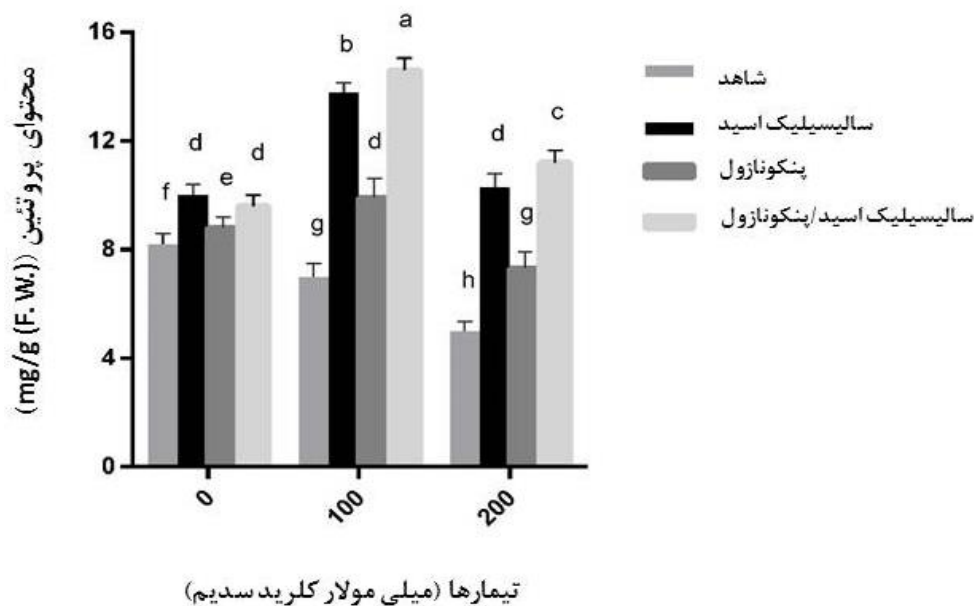
تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) بر روی داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) مورد تحلیل قرار گرفت. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها در سطح خطای ۰/۰۵ با آزمون دانکن (DMRT)<sup>۱</sup> انجام شد. از نرم افزار Graphpad Prism 7.03 برای رسم نمودارها استفاده شد.

## نتایج

### محتوای پروتئین محلول

تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین محلول در گیاهان گلرنگ شد (شکل ۱). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان محتوای پروتئین‌ها را در گیاهان شاهد و تحت تنش افزایش داد. بالاترین محتوای پروتئین مربوط به گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و پنکونازول بود. در این گیاهان محتوای پروتئین به بیش از دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.



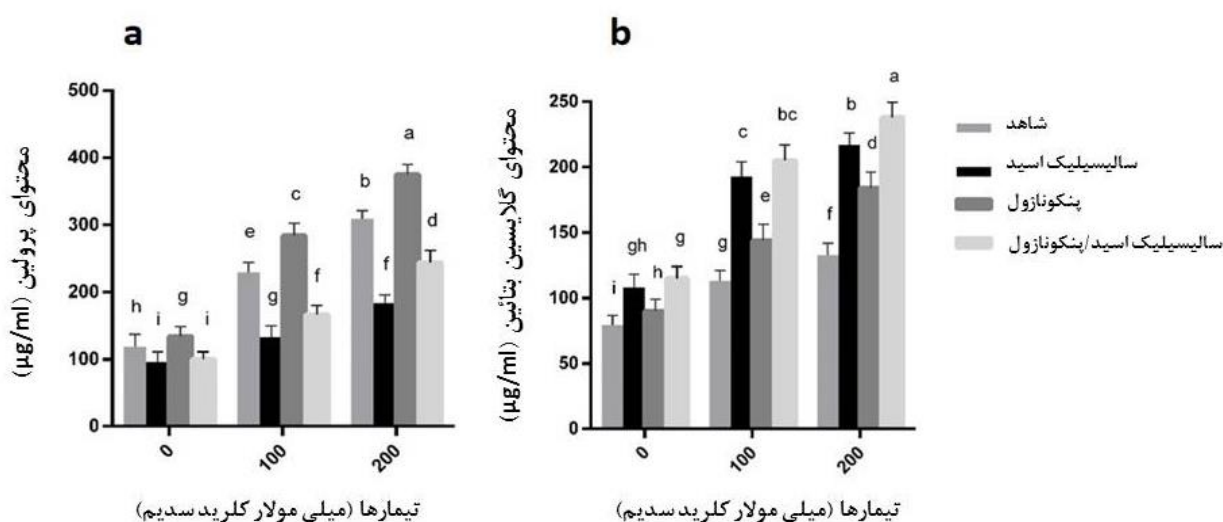
شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار سالیسیلیک اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای پروتئین محلول در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P \leq 0.05$ ).

### محتوای پرولین و گلایسین بنائین

<sup>۱</sup>Duncans Multiple Range Test

نتایج نشان داد که محتوای پرولین تحت تنش شوری در گیاهان افزایش معنی داری داشت (شکل ۲-ا) تیمار سالیسیلیک اسید باعث کاهش محتوای این ترکیب در گیاهان شاهد و تحت تنش شد، در حالی که تیمار پنکونازول به تنهایی و همزمان با سالیسیلیک اسید محتوای پرولین را به طور معنی داری افزایش داد. بیشترین محتوای پرولین در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و تیمار پنکونازول مشاهده شد.

گلاسیسین بتائین، از دیگر اسمولیت‌های سازگار است که محتوای آن در گیاهان تنش دیده افزایش معنی داری داشت (شکل ۲-ب). محتوای این ترکیب به طور چشمگیری تحت تنش شوری افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان محتوای این ترکیب را به طور معنی داری افزایش داد. بالاترین محتوای گلاسیسین بتائین در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان دو تنظیم کننده بود، به طوری که محتوای آن نزدیک به دو برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار) و تیمار سالیسیلیک اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای پرولین (a) و گلاسیسین بتائین (b) در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ( $P \leq 0.05$ ).

### محتوای پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )

محتوای پراکسید هیدروژن در گلرنگ با افزایش غلظت کلرید سدیم به تدریج افزایش یافت (شکل ۳-ا). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی دار این محتوا گردید. بیشترین محتوای  $H_2O_2$  در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و تیمار همزمان دو تنظیم کننده مشاهده شد.

### پراکسیداسیون لیپیدها

مالون دی آلدئید به عنوان فرآورده‌ی نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها است و به عنوان شاخص آسیب غشایی به شمار می‌آید. میزان پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان تجمع محتوای مالون دی آلدئید در بافت گیاهی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش شوری در گیاهان افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۳-ب). تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی‌دار محتوای مالون دی آلدئید در گیاهان شاهد و تحت تنش شد درحالی که، تیمار پنکونازول محتوای آن را کاهش داد. کاربرد هم‌زمان دو تنظیم‌کننده نیز باعث کاهش معنی‌دار محتوای MDA در گیاهان شد. بالاترین محتوای MDA در گیاهان تحت تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

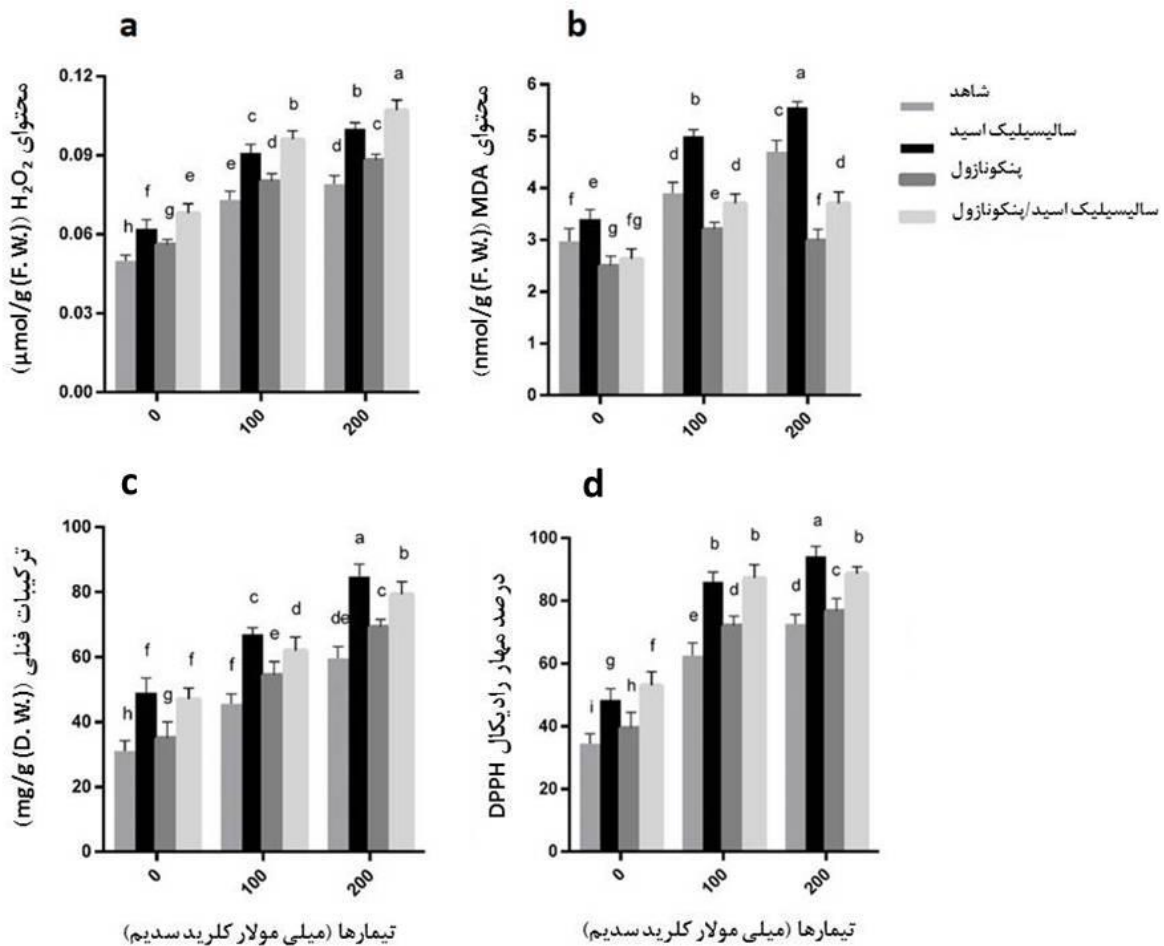
### محتوای ترکیبات فنلی

محتوای ترکیبات فنلی کل با افزایش غلظت کلرید سدیم به‌تدریج افزایش یافت (شکل ۳-ج). تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به‌تنهایی و هم‌زمان در گیاهان شاهد و تحت تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی گردید. بالاترین محتوای این ترکیبات در گیاهان تحت تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

### فعالیت آنتی‌اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بر اساس میزان فعالیت جاروبگری رادیکال آزاد DPPH تعیین شد (شکل ۳-د). فعالیت جاروبگری DPPH در گلرنگ تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک اسید و پنکونازول به

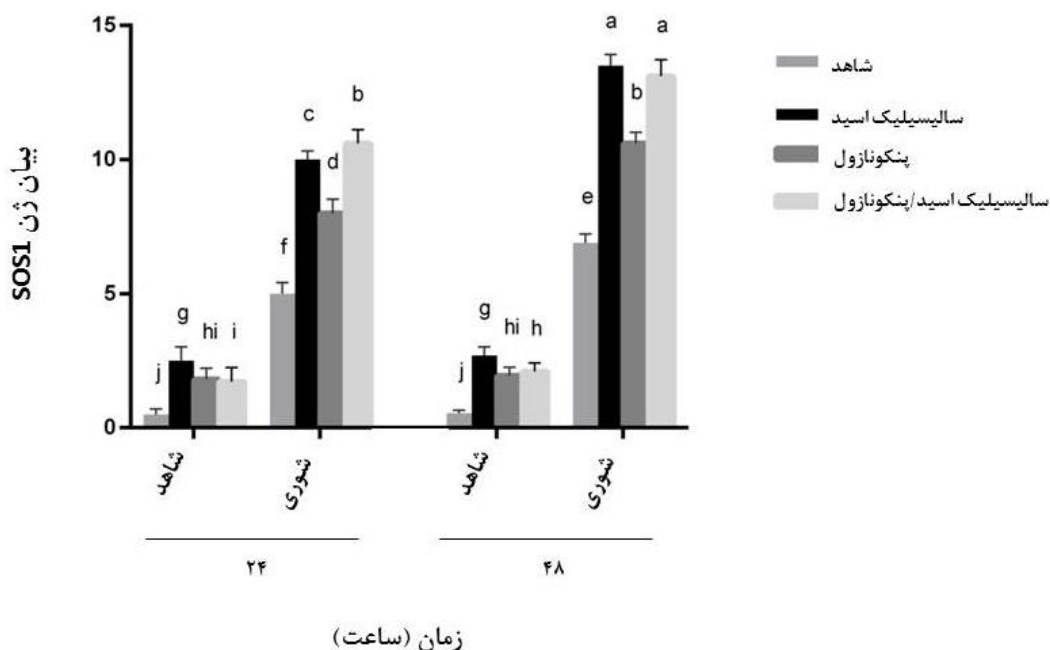
تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. بالاترین میزان فعالیت در گیاهان تحت تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار سالیسیلیک اسید بود.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار سالیسیلیک‌اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) روی محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a)، MDA (b) ترکیبات فنلی کل (c) و فعالیت جاروب‌گری رادیکال‌های آزاد (d) در اندام هوایی گیاه گل‌رنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P≤0.05).

### بررسی بیان ژن *SOS1*

میزان بیان ژن *SOS1* در گیاهان تحت تیمار کلرید سدیم به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۴). تیمار SA و PEN به تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی دار بیان این ژن گردید. بیشترین میزان بیان ژن *SOS1* پس از ۴۸ ساعت از برداشت و در گیاهان تحت تنش شوری و تیمار SA به تنهایی و همزمان با PEN بود.

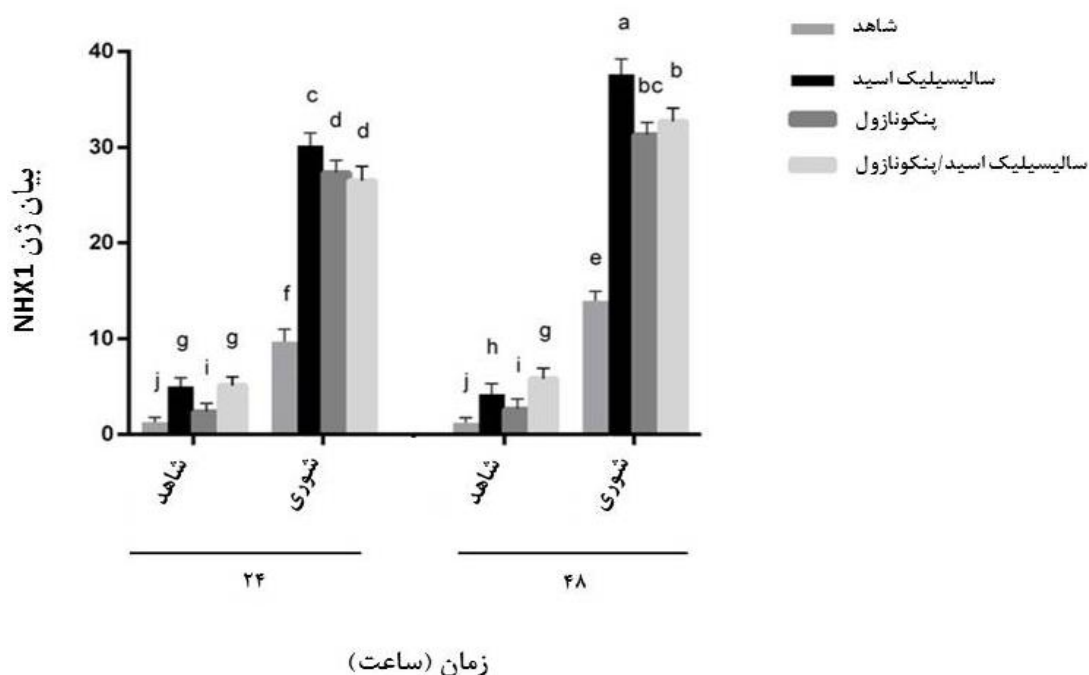


شکل ۴- آنالیز بیان ژن *SOS1* تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، تیمار سالیسیلیک اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از برداشت در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ( $P \leq 0.05$ ).

### بررسی بیان ژن *NHX1*

میزان بیان ژن *NHX1* در گیاهان تحت تیمار کلرید سدیم به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۵). تیمار SA و PEN به تنهایی و همزمان در گیاهان شاهد و تحت تنش باعث افزایش معنی دار بیان این ژن گردید. بیشترین میزان بیان ژن *NHX1* پس از ۴۸ ساعت از برداشت و در گیاهان تحت تنش شوری و تیمار SA مشاهده شد.





شکل ۵- آنالیز بیان ژن *NHX1* تحت تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، تیمار سالیسیلیک اسید (1mM) و پنکونازول (15mg/l) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از برداشت در اندام هوایی گیاه گلرنگ. میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد نشان داده شده است. ستون‌هایی با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P \leq 0.05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

تنش شوری از طریق ایجاد محدودیت در جذب عناصر غذایی، کمبود آب قابل استفاده گیاه و سمیت عناصر غذایی، کاهش قدرت رشد سلولی را به همراه دارد (Enferad *et al.*, 2004). نسبت بالای سدیم به پتاسیم طی تنش شوری، واکنش‌های آنزیمی مختلفی را در سیتوپلاسم تحت تاثیر قرار می‌دهد. پتاسیم عنصری مهم در سنتز پروتئین به شمار می‌آید (Parida & Das, 2005). بنابراین کاهش در محتوای پروتئین‌ها را می‌توان به عنوان اثر مخرب سدیم در نظر گرفت که با تاثیر منفی بر آنزیم‌های موثر در سنتز پروتئین منجر به کاهش محتوای آن می‌شود. نتایج مشابه در *Raphanus sativus* (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) و *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2007) نیز مشاهده شده است.

افزایش پروتئین‌های محلول توسط SA و PEN در گلرنگ مشاهده شد. SA در تولید پروتئین‌های دفاعی و انواع متفاوتی از کینازها و روبیسکو تاثیرگذار می‌باشد (Parvaiz & Satyawati, 2008). احتمال می‌رود SA بتواند با تاثیر بر آنزیم‌های مسیر سنتز و یا تجزیه پروتئین‌ها در افزایش میزان آنها دخالت داشته باشد. بعلاوه، محققان دریافته‌اند که افزایش محتوای پروتئین در گیاهان به‌واسطه‌ی PEN می‌تواند به دلیل افزایش تولید سیتوکینین تحت کاربرد خارجی PEN باشد (Hassanpour *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که بین تنظیم‌کننده‌های SA و PEN اثر هم‌افزایی وجود دارد به‌طوری‌که اعمال هم‌زمان آنها در

گلرنگ باعث افزایش بیشتر محتوای پروتئین محلول گردید. تنظیم اسمزی به عنوان یک مکانیسم سازشی دخیل در تحمل گیاه به تنش است که به حفظ فشار تورگور کمک می‌کند. حفظ فشار تورگور معمولاً با تجمع متابولیت‌هایی همچون پرولین و گلايسين بتائين همراه است که متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند (Orcutt & Nilsen, 2000). در این تحقیق، محتوای پروتئین تحت تنش شوری کاهش یافت در حالی که محتوای پرولین افزایش یافت. احتمالاً افزایش محتوای پرولین به دلیل هیدرولیز پروتئین و یا بازدارندگی سنتز پروتئین باشد (Jaleel *et al.*, 2008). محلول‌پاشی برگی SA در این تحقیق سبب کاهش محتوای پرولین در گیاهان شد (شکل ۲-ا). نتایج ما با نتایج حاصل از بررسی اثر SA بر گونه‌های مختلف گیاهی مانند *Phaseolus vulgaris* (Palma *et al.*, 2009) و *Artemisia annual* L. (Aftab *et al.*, 2011) تحت تنش شوری مطابقت دارد. این نتایج نشان داده‌اند که SA با کاهش محتوای پرولین اضافی در شرایط تنشی باعث برقراری تعادل اسمزی در سیتوزول می‌گردد. تیمار PEN نیز باعث افزایش بیشتر محتوای پرولین گردید. نتایج مشابهی در گیاهان بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) (Hojati *et al.*, 2011) و پونه معطر (*Mentha Pulegium*) (Hassanpour *et al.*, 2013) مشاهده شد. افزایش بیشتر محتوای پرولین با تیمار تریازول با ایجاد تعدیل اسمزی بهتر به پایداری بیشتر غشاء و آنزیم‌ها در شرایط تنشی کمک نمود و منجر به افزایش میزان فتوسنتز شد (Zhang *et al.*, 2007). اعمال همزمان SA و PEN محتوای پرولین را کاهش داد که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر کاهندگی این دو تنظیم‌کننده باشد.

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی اثرات مثبت اعمال خارجی گلايسين بتائين روی رشد گیاهان تحت تنش شوری است (Ashraf & Foolad, 2007; Singh & Gautam, 2013). پژوهشگران نشان داده‌اند که پیش‌تیمار بذرهاى گوجه‌فرنگی با SA افزایش تولید گلايسين بتائين را تحت تنش شوری به دنبال دارد. آنها ثابت کرده‌اند که SA نقش القاکننده روی بتائين آلدئید به عنوان پیش‌ساز گلايسين بتائين دارد (Singh & Gautam, 2013). همچنین PEN به‌طور چشمگیری در پاسخ به تنش دهیدراسیون افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که تحمل به دهیدراسیون به واسطه‌ی اعمال خارجی PEN می‌تواند دلیلی بر افزایش محتوای گلايسين بتائين باشد. اعمال همزمان دو تنظیم‌کننده بر گیاهان نیز اثرات هم‌افزایی دارد و محتوای گلايسين بتائين را افزایش می‌دهد.

پراکسید هیدروژن به طور طبیعی در گیاه تولید می‌شود. این ترکیب پاسخ‌های دفاعی متنوعی را در سلول هدف‌گیری می‌کند و نیز باعث تجمع SA و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌گردد (Shirasu *et al.*, 1997). مطالعات بسیاری این ادعا را پشتیبانی کرده‌اند؛ از جمله تیمار گیاه تنباکو با H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> که باعث القای محتوای SA می‌شود (Leon *et al.*, 1995). بر اساس نتایج حاصل مشخص شد که تیمار SA هم‌زمان با کاهش تنش باعث افزایش محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاهان می‌شود. پیشنهاد شده است که SA با اتصال و در پی آن بازداشتن فعالیت آنزیمی کاتالاز/SABP (پروتئین متصل شونده به SA)، مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را افزایش می‌دهد و به عنوان پیامی برای بیان ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت گیاه عمل می‌کند. بنابراین، کاتالاز پیام SA را از راه اتصال

با آن دریافت و سپس آن پیام را با ممانعت از فعالیت آنزیمی خود منتقل می‌نماید و در نتیجه مقدار  $H_2O_2$  افزایش می‌یابد. افزایش  $H_2O_2$  توسط تریازول‌ها نیز در گیاه *Catharanthus roseous* گزارش شده است (Jaleel *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد تریازول‌ها نه تنها از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کنند، بلکه علائمی شبیه به تنش را نیز جهت افزایش سطح  $H_2O_2$  القاء می‌کنند. در واقع تریازول‌ها با افزایش سطح  $H_2O_2$  می‌توانند منجر به افزایش تحمل تنش شوند. در این پژوهش، تیمار همزمان SA و PEN منجر به افزایش بیشتر محتوای  $H_2O_2$  شد که نشان‌دهنده‌ی اثر هم‌افزایی این دو ترکیب است.

سطح MDA حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء به‌عنوان شاخصی برای آسیب اکسایشی به کار می‌رود (Demiral & Türkan, 2005). در این تحقیق، محتوای MDA با افزایش تنش شوری افزایش یافت و تیمار SA باعث افزایش بیشتر آن شد. به نظر می‌رسد که SA با افزایش تولید  $H_2O_2$  از طریق مهار فعالیت کاتالاز منجر به افزایش MDA می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست آمده توسط محققان دیگر در بررسی اثر SA در افزایش محتوای MDA در سایر گونه‌های گیاهی تحت تنش مطابقت دارد (Esra & Ustun, 2012; Schmid-Siegert *et al.*, 2012). تیمار PEN در گیاهان باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها شد. کاهش MDA توسط ترکیبات تریازولی در گندم نیز گزارش شده است (Berova *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد که ترکیبات تریازولی با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها باعث مقاومت به تنش شوری در گلرنگ شدند. کاهش معنی‌دار محتوای MDA در گلرنگ تحت اعمال همزمان دو تنظیم‌کننده می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر کاهندگی این ترکیبات باشد.

مطالعات بسیاری در ارتباط با تاثیر تنش‌های اسمزی روی ترکیبات فنلی صورت گرفته است. آنها نشان دادند که تجمع ترکیبات فنلی به عنوان مکانیسم سازش جهت روبش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آسیب سلول می‌باشد (Harborne & Williams, 2000). افزایش ترکیبات فنلی به دنبال تیمار با SA در این تحقیق می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم PAL باشد (Hahlbrock & Scheel, 1989). همچنین افزایش این ترکیبات تحت تیمار PEN نشان‌دهنده‌ی این است که این تنظیم‌کننده نیز می‌تواند باعث کاهش اثرات معکوس تنش شوری شود. نتایج حاصل از این تحقیق مشابه با فرضیه Fletcher و Hofstra (۱۹۹۰) می‌باشد. آنها پیشنهاد کردند که تریازول‌ها با افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند باعث افزایش تحمل تنش شوند. این دو تنظیم‌کننده اثر هم‌افزایی دارند که نشان می‌دهد می‌توانند به صورت همزمان برای مقابله با شرایط تنش مورد استفاده قرار گیرند.

عدم تعادل بین تولید و حذف ROS باعث ایجاد تنش اکسایشی می‌شود. در تمامی گیاهان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی رابطه مستقیم دارد. Peterson و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی جو دوسر را با روش DPPH اندازه‌گیری و میزان ترکیبات کل عصاره را تعیین کردند. این تحقیق نشان داد بین میزان ترکیبات فنلی و توان آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده رابطه مستقیمی وجود دارد. در تحقیق حاضر فعالیت رادیکال DPPH در پاسخ به تنش افزایش یافت و تیمار دو

تنظیم‌کننده منجر به افزایش بیشتر آن شد. افزایش هم‌عرض سطوح ترکیبات فنلی با فعالیت DPPH نشان می‌دهد افزایش فعالیت DPPH ممکن است به دلیل افزایش سطح ترکیبات فنلی توسط SA و PEN باشد که اثر هم‌افزایی داشتند.

طبق مطالعات انجام شده، افزایش سدیم در محیط اطراف ریشه موجب انتشار کلسیم به سیتوزول می‌گردد و توسط پروتئینی به نام SOS3 حس می‌شود و تشکیل کمپلکس SOS3 با SOS2 را تسریع می‌کند (Halfter *et al.*, 2000) که می‌تواند باعث فسفریلاسیون و فعالیت آنتی‌پورتر SOS1 شود (Quintero *et al.*, 2002). بعلاوه، NHX1 آنتی‌پورتری در غشای تونوپلاست است و شواهد زیادی وجود دارد که بیان بالای آن تحمل به شوری را افزایش می‌دهد. به‌عنوان مثال، در برنج، پس از بیان ژن *NHX1* افزایش تحمل به شوری مشاهده شد، در صورتی که برنج‌های تراریخته توانایی رشد کمتری داشتند (Fukuda *et al.*, 2004). سالیسیلیک اسید با روش‌های مختلف از جمله بخش‌بندی سدیم، تعدیل اسمزی و ساخت پروتئین‌کینازها در اثر تنش، موجب سازگاری به تنش می‌شود (Singh & Gautam, 2013). اطلاعات موجود نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید MAP kinases فعال می‌کند (Mikołajczyk *et al.*, 2000). کینازها علاوه بر تنش شوری به تیمارهای سالیسیلیک اسید نیز واکنش نشان می‌دهند و بیان آنها، تحت تیمار سالیسیلیک اسید افزایش می‌یابد، بنابراین افزایش بیان ژن‌های *SOS1* و *NHX1* می‌تواند ناشی از تغییر در بیان ژن‌های کدکننده‌ی کینازها باشد. به نظر می‌رسد که SA و PEN با افزایش فعالیت کینازهایی مانند SOS2 که در مسیر پاسخ به تنش شوری قرار دارند باعث القای بیان *SOS1* و *NHX1* شوند.

در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که تنش شوری اثرات مخربی در گیاه گلرنگ دارد. این اثرات از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود که انباشتگی این ترکیبات باعث پراکسیداسیون لیپیدها و اختلال در متابولیسم سلول می‌گردد. کاربرد سالیسیلیک اسید و پنکونازول باعث بهبود رشد گیاه و کاهش اثرات منفی تحت تنش شوری می‌شود. این دو تنظیم‌کننده با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و همچنین بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر تحمل شوری باعث افزایش مقاومت به تنش شوری می‌شوند. بنابراین، با توجه به اینکه این ترکیبات نسبتاً ارزان و در دسترس می‌باشند، برای افزایش مقاومت گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی به شوری می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

## منابع

زینلی، ا. ۱۳۷۸. گلرنگ (شناخت تولید و مصرف)، چاپ اول، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Aftab, T., Khan, M. M. A., da Silva, J. A. T., Idrees, M. & Naeem, M. (2011). Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 30(4): 425-435.

Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M. & Tahir, G. (2004). Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *International Journal of Environmental Science & Technology* 1(3): 221-225.

- Ashraf, M. & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany* 59(2): 206-216.
- Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. & Murata, Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166(2): 146-156.
- Bates, L., Waldren, R. & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1): 205-207.
- Berova, M., Zlatev, Z. & Stoeva, N. (2002). Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulg. J. Plant Physiol* 28(1-2): 75-84.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Demiral, T. & Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and experimental botany* 53(3): 247-257.
- Enferad, A., Poustini, K., Hosseini, N. M. & Khajeh-Ahmad-Attari, A. (2004). Physiological responses of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties to salinity. *JWSS-Isfahan University of Technology* 7(4): 103-113.
- Esra, K. & USTUN, A. S. (2012). Phenylalanine Ammonia Lyase Activity in Stem of Pepper (*Capsicum annum* L.) Infected by *Phytophthora capsici* L. *Gazi University Journal of Science* 25(2): 307-312.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. & Tanaka, Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology* 45(2): 146-159.
- Ghassemi-Golezani, K. & Hosseinzadeh-Mahootchi, A. (2015). Improving physiological performance of safflower under salt stress by application of salicylic acid and jasmonic acid. *WALIA journal* 31: 104-109.
- Greive, C. & Grattan, S. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary-amino compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual review of plant biology* 40(1): 347-369.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(7): 3735-3740.
- Harborne JB, Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta physiologiae plantarum* 34(4): 1537-1549.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, R. A., Niknam, V., Najafi, F. & Razavi, K. (2013). Penconazole induced changes in photosynthesis, ion acquisition and protein profile of *Mentha pulegium* L. under drought stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19(4): 489-498.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and experimental botany* 68(1): 14-25.

- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 125(1): 189-198.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347(2nd edit).
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Ghanati, F & Panahi, M. (2011). Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in *Matricaria chamomilla* plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology* 168(8): 782-791.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P. & Panneerselvam, R. (2008). Exogenous application of triadimefon affects the antioxidant defense system of *Withania somnifera* Dunal. *Pesticide biochemistry and physiology* 91(3): 170-174.
- Jaleel, C. A., Kishorekumar, A., Manivannan, P., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Gopi, R., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2007). Alterations in carbohydrate metabolism and enhancement in tuber production in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) under triadimefon and hexaconazole applications. *Plant Growth Regulation* 53(1): 7-16.
- Jaleel, C. A., Zhao, C., Mohamed, S., Al-Juburi, H. J., Moussa, H. R., Gomathinayagam, M. & Panneerselvam, R. (2009). Alterations in sucrose metabolizing enzyme activities and total phenol content of *Curcuma longa* L. as affected by different triazole compounds. *Frontiers of Biology in China* 4(4): 419- 423.
- Khadri, M., Tejera, N. & Lluch, C. (2007). Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environmental and experimental botany* 60(2): 211-218.
- Leon, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant physiology* 108(4): 1673-1678.
- Mikołajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszyńska, G., Klessig, D. F. & Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *The plant cell* 12(1): 165-178.
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E. & Zenk, M. H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(16): 7490-7494.
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S. D. & Panneerselvam, R. (2000). Influence of triadimefon on the metabolism of NaCl stressed radish. *Biologia Plantarum* 43(1): 67-72.
- Nair, V. D., Jaleel, C. A., Gopi, R. & Panneerselvam, R. (2009). Changes in growth and photosynthetic characteristics of *Ocimum sanctum* under growth regulator treatments. *Frontiers of Biology in China* 4(2): 192-199.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1237-1247.
- Orcutt, D. & Nilsen, E. (2000). *The physiology of plants under stress, volume 2: soil and biotic factors*. New York: John Wiley and Sons.
- Palma, F., Lluch, C., Iribarne, C., García-Garrido, J. M. & García, N. A. T. (2009). Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation* 58(3): 307-316.

- Pardo, J. M. & Rubio, F. (2011). Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters in plant signaling. *Transporters and pumps in plant signaling*, Springer. 65-98.
- Parida, A. K. & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 60(3): 324-349.
- Parvaiz, A. & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment* 54(3): 89.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K. & Pardo, J. M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13): 9061-9066.
- Rahman, S., Miyake, H. & Takeoka, Y. (2002). Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* 5(1): 33-44.
- Ranganna, S. (1986). *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products*. Tata McGraw-Hill Education.
- Said-Al Ahl, H. & Omer, E. (2011). Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *Herba polonica* 57(1): 72-87.
- Schmid-Siegert, E., Loscos, J. & Farmer, E. E. (2012). Inducible malondialdehyde pools in zones of cell proliferation and developing tissues in Arabidopsis. *Journal of Biological chemistry* 287(12): 8954-8962.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. & Fatkhutdinova, D. R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant science* 164(3): 317-322.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The plant cell* 9(2): 261-270.
- Singh, P. K. & Gautam, S. (2013). Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta physiologiae plantarum* 35(8): 2345-2353.
- Tsegaw, T., Hammes, S. & Robbertse, J. (2005). Paclobutrazol-induced leaf, stem, and root anatomical modifications in potato. *HortScience* 40(5): 1343-1346.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S. & Scherer, G. F. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47(3): 346-354.
- Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science* 151(1): 59-66.
- Wuyts, N., De Waele, D. & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(5): 308-314.
- Zhang, M., Duan, L., Tian, X., He, Z., Li, J., Wang, B. & Li, Z. (2007). Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology* 164(6): 709-717.

## Improving salt resistance of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through growth regulators: Salicylic acid and Penconazole

F.Shaki<sup>1</sup>, H. Ebrahimzadeh Maboud<sup>2</sup>, V. Niknam<sup>3</sup>

Received:2018.1.10

Accepted:2019.12.7

### Abstract

Salinity is one of the most important environmental factors that limit plant growth and its productivity. In addition, a significant part of agricultural lands has been affected by salinity. Therefore, identifying the methods which reduce the salinity effects on plants to prevent plant yield loss can be one way to cope with this problem. In this study, the effects of salicylic acid and penconazole were investigated on some physiological and molecular parameters in safflower under salinity. Sodium chloride (0, 100, 200 mM), salicylic acid (1mM), and penconazole (15mg/l) were applied for 21 days on plants. Results revealed that protein content decreased under salinity while Proline, Glycine betaine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, Phenolics, and DPPH activity increased as well as *SOS1* and *NHX1* genes expression. Exogenous application of salicylic acid and penconazole increased protein, glycine betaine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and phenolic contents, DPPH activity, as well as *SOS1* and *NHX1* genes expression under salinity but proline content decreased by salicylic acid and MDA content decreased by penconazole. Additionally, the results showed that the interaction of these two regulators could have antagonistic or synergic effects on plants. Overall, it seems that the exogenous application of these growth regulators can cause the adaptability in safflower to salinity. Due to the low price and availability, the use of these components can be considered in order to increase safflower resistance to salinity.

**Keywords:** *NHX1* antiporter, Penconazole, Safflower, Salinity, Salicylic acid, *SOS1* antiporter.

---

1- PhD student, University of Tehran, Science Campus, Faculty of Life Sciences

2,3- Professor, University of Tehran, Science Campus, Faculty of Life Sciences

\* (corresponding author: ebizadeh@ut.ac.ir)



## بررسی عوامل محیطی موثر بر خصوصیات گلابی وحشی (*Pyrus syriaca* Boiss.) در جنگل زردلان

### ایلام

حجت اله فتاحی<sup>۱</sup>، جعفر حسین زاده<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

### چکیده

استان ایلام یکی از رویشگاه‌های طبیعی گونه گلابی وحشی (*Pyrus syriaca* Boiss.) در ایران است. در این بررسی رویشگاه عمده‌ی این گونه در استان ایلام (منطقه زردلان) مورد مطالعه قرار گرفت. در محدوده‌ی مورد مطالعه، با تلفیق نقشه‌های شیب، جهت و ارتفاع، واحدهای کاری معین و در هر واحد با توجه به مساحت، حداقل سه قطعه نمونه تصادفی تعیین و خصوصیات توپوگرافی آنها ثبت و در قالب پلات‌های ده آری دایره‌ای شکل کلیه پارامترهای کمی و کیفی گلابی وحشی اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج نشان داد که گلابی وحشی در شیب‌های ۱۵ تا ۳۰ درصد دارای بیشترین ارتفاع و قطر برابر سینه است. در جهت‌های شمالی بهترین شرایط از لحاظ سلامت تاج، تقارن تاج و کیفیت تنه گلابی وحشی مشاهده شد و بهترین کیفیت تنه در ارتفاعات میانی وجود دارد، ارتباط معنی داری بین ارتفاع از سطح دریا با سایر متغیرهای کمی و کیفی گلابی وحشی دیده نشد.

**واژه‌های کلیدی:** ایلام، زاگرس، زردلان، عوامل محیطی، گلابی وحشی،

### مقدمه

استان ایلام با مساحتی حدود دو میلیون هکتار، بخشی از جنگل‌های زاگرس با مساحت حدود ۶۴۰ هزار هکتار را در بر می‌گیرد. با توجه به تنوع آب و هوایی، جوامع و تیپ‌های متعدد درختی، درختچه‌ای، بوته‌ای و علفی در آن وجود دارد. یکی از گونه‌های مهم جنگلی که دارای رویشگاه منحصر به فردی است و نقش مهمی در تأمین معیشت روستائیان و عشایر ساکن منطقه زردلان شهرستان شیروان چرداول از توابع استان ایلام دارد، گونه گلابی وحشی (*Pyrus syriaca* Boiss.) است. با توجه به بررسی‌های به‌عمل آمده، وسعت این رویشگاه حدود ۳۰۰۰ هکتار است و به لحاظ اکولوژیکی رویشگاهی منحصر به فرد در استان می‌باشد. این رویشگاه طبیعی همانند مورد مشابه خود در استان فارس (Hamzhepour et al., 2010) با توجه به تولید میوه خوراکی و تولید بذر دارای اهمیت اقتصادی و معیشتی خاصی در بین روستائیان و عشایر منطقه است.

۱- کارشناسی ارشد، اداره کل منابع طبیعی ایلام، ایران

۲- دانشیار گروه علوم جنگل، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران.

\* (نویسنده مسئول: J.hoseinzadeh@ilam.ac.ir)

متأسفانه برداشت میوه، چرای بی‌رویه عرصه‌های جنگلی، تخریب جنگل‌ها و توسعه کشاورزی، به‌ویژه در سال‌های اخیر موجودیت این گونه را در شرایطی به خطر انداخته است که هیچ‌گونه برنامه‌ای برای توجه به این رویشگاه منحصر بفرد وجود ندارد. بدیهی است که لازمه هر گونه برنامه‌ریزی و اجرای طرح‌های بنیادی مدیریت، اصلاح و احیاء منابع طبیعی تجدید شونده، حفاظت از آب و خاک، جلوگیری از خسارات ناشی از سیل و غیره و در نهایت چگونگی بهره‌برداری از این منابع و شناخت کامل پوشش گیاهی و عوامل مؤثر بر آن است (Fatahi *et al.*, 2000).

مهمترین اصل در حفاظت یک اکوسیستم شناخت دقیق عناصر و گونه‌های تشکیل دهنده آن و مشخص کردن نیازها و خصوصیات اکولوژیکی فردی و اجتماعی گونه‌های آن است (Barnes *et al.*, 1998). در حقیقت مدیریت و برنامه‌ریزی دقیق طرح‌های حفاظتی و اجرایی در جنگل نیازمند شناسایی نیازهای اکولوژیک تک تک گونه‌های جنگلی منطقه می‌باشد (Manafi, 2004). در رابطه با نیاز رویشگاهی گونه‌های مختلف زاگرس تحقیقاتی صورت گرفته است که از جمله آنها می‌توان به مهدی‌فر (2004)، جهانبازی و همکاران (2003) و ثاقب طالبی و همکاران (2004)، در بررسی نیاز رویشگاهی گونه بلوط دارمازو، جهانبازی (2003)، در بررسی رویشگاه نارون در استان چهارمحال و بختیاری، حسین‌زاده (2004) در بررسی شرایط رویشگاهی گونه‌های بادام و همچنین حسین‌زاده و همکاران (2015) در بررسی شرایط رویشگاهی گونه قره تاج اشاره نمود.

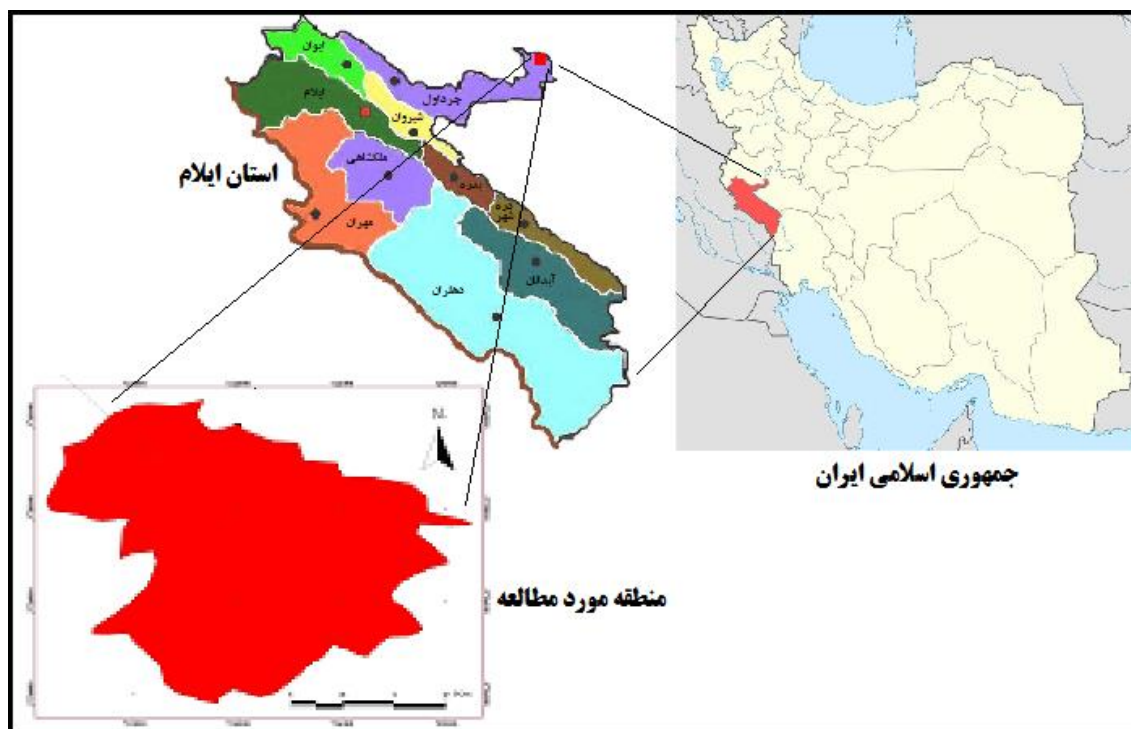
در رابطه با گلایی وحشی می‌توان به تحقیق حمزه‌پور و همکاران (2010) اشاره کرد که به بررسی عوامل مؤثر بر گسترش گلایی وحشی در منطقه سپیدان استان فارس پرداختند. بزرگی و بهاروند (2013) نیز الگوی پراکنش مکانی ذخیره‌گاه‌های جنگلی گلایی وحشی در چم حصار دلفان استان لرستان را بررسی کردند. تنوع شرایط اکولوژیک در محدوده‌ی جنگل‌های زاگرس و از جمله استان ایلام، موجب گسترش گونه‌های درختی و درختچه‌ای متعددی در منطقه شده است که بسیاری از آنها به لحاظ خوراکی، دارویی و صنعتی از اهمیت خاصی برخوردارند. شناخت دقیق شرایط رویشگاهی این گونه‌ها کمک شایانی در برنامه‌های حفظ، احیاء و توسعه آنها خواهد بود. در این تحقیق سعی شده است ضمن تشریح وضعیت توده طبیعی گونه گلایی وحشی در منطقه زردلان ایلام، شرایط و نیازهای رویشگاهی آن مورد بررسی قرار گیرد تا از طریق شناخت لازم، گام نخست در راستای برنامه‌ریزی برای حفاظت و بهبود شرایط این رویشگاه برداشته شود.

## مواد و روش‌ها

### مشخصات منطقه مورد مطالعه

منطقه‌ی مورد مطالعه با مساحت ۳۰۴۶ هکتار در شمال شرقی شهرستان شیروان چرداول و در فاصله یکصد و هشتاد کیلومتری از مرکز استان ایلام، بین طول‌های شرقی ۴۷° ۲۸' ۱۲" تا ۴۷° ۲۲' ۴۸" و عرض‌های شمالی ۳۳° ۵۷' ۳۶" تا ۳۳° ۵۴' ۰۰"

۳۳° واقع گردیده است (شکل ۱). بلندترین نقطه منطقه ۲۰۴۰ متر و پایین‌ترین آن ۱۲۴۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارد. حداکثر و حداقل شیب منطقه نیز ۴۵ و ۵ درصد می باشد.



شکل ۱: موقعیت منطقه‌ی مورد مطالعه در استان ایلام و کشور

به گزارش هواشناسی ایلام، بر مبنای ایستگاه سینوپتیک چرداول به‌عنوان نزدیک‌ترین ایستگاه هواشناسی، میزان بارندگی سالانه، طی دوره آماری ۲۰ ساله ۳۲۷/۸ میلی‌متر است که از این میزان ۸۹/۲ میلی‌متر در فصل بهار ۰/۲ میلی‌متر در تابستان و ۹۱/۲ میلی‌متر در فصل پاییز و ۱۴۷/۲ میلی‌متر در فصل زمستان است. رژیم بارش منطقه بیشتر زمستانه است و بارندگی‌های فصل پاییز از اواسط مهرماه آغاز می‌شود و در آذرماه به اوج خود می‌رسد. در فصل زمستان به‌ویژه به‌من‌ماه ارتفاعات منطقه شاهد ریزش برف هستند. حداکثر مطلق درجه حرارت ۴۷ درجه سانتی‌گراد مربوط به تیرماه و حداقل مطلق آن ۱۰- درجه سانتی‌گراد مربوط به بهمن‌ماه است. اقلیم نمای آمبروزه اقلیم منطقه را نیمه خشک معتدل نشان می‌دهد.

## روش تحقیق

پس از بازدید جنگل و تعیین محدوده‌ی مورد مطالعه، مرز آن روی نقشه توپوگرافی به مقیاس ۱/۵۰۰۰۰ مشخص گردید. سپس با استفاده از پارامترهای مورد نظر (شیب، جهت و ارتفاع از سطح دریا) طبقه‌بندی منطقه صورت گرفت و نقشه‌های مربوط به آنها تهیه شد. برای این منظور سه طبقه ارتفاعی (۱۲۴۰ تا ۱۵۰۰ متر، ۱۵۰۰ تا ۱۷۶۰ متر و ۱۷۶۰ تا ۲۰۲۰ متر)، چهار جهت جغرافیایی اصلی (شمالی، جنوبی، شرقی و غربی) و سه کلاسه شیب (۰ تا ۱۵ درصد، ۱۵ تا ۳۵ درصد و ۳۵ تا ۴۵ درصد)

تفکیک گردید. سپس از تلفیق آنها، واحدهای کاری حاصل شد و باتوجه به وسعت هر واحد کاری، حداقل ۳ قطعه نمونه بصورت تصادفی در آن مشخص و خصوصیات این نقاط از نظر موقعیت در نقشه ثبت و در قالب قطعات نمونه ۱۰ آری دایره‌ای شکل (Tahmasebi, 1995) اطلاعات مورد نیاز شامل کلیه پارامترهای کمی و کیفی مورد نظر از جمله قطر برابر سینه، ارتفاع کل، طول تنه، قطر تاج، کیفیت تاج (تاج متقارن، تاج دو شاخه، چند شاخه)، و کیفیت یا سلامت تنه برداشت شد. در مرکز هر قطعه نمونه اصلی، ریز قطعه‌های ۱۰ مترمربعی برای بررسی وضعیت تجدید حیات و زادآوری گونه‌ی مورد نظر و سایر گونه‌ها منظور شده است.

در نهایت اطلاعات کمی و کیفی جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 19.0 و Excel 2013 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این راستا از آزمون F یا تحلیل واریانس ANOVA برای متغیرهای کمی، آزمون کای اسکویر برای متغیرهای کیفی و نیز از LSD برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد.

## نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج تحلیل واریانس مقایسه‌ی ویژگی‌های کمی گلابی وحشی از قبیل تراکم، قطر برابر سینه، ابعاد تاج و ارتفاع درختان را در کلاس‌های مختلف شیب نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، تراکم، ارتفاع و قطر برابر سینه گلابی وحشی در کلاس‌های شیب، در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار است و عمدتاً در طبقه‌ی شیب زیاد دارای کمترین مقدار این ویژگی‌ها است. بیشترین تراکم، ارتفاع و قطر برابر سینه گلابی وحشی در طبقه شیب میانه یعنی ۱۵ تا ۳۰ درصد دیده می‌شود. مقایسه‌ی بین قطر و ارتفاع تاج هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری را با شیب‌های مختلف نشان نداده است، در حالی که درصد تاج پوشش دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ است. در این مورد هم بیشترین درصد تاج پوشش در طبقه شیب میانه و کمترین آن در کلاس شیب زیاد است.

جدول ۱: تحلیل واریانس مقایسه‌ی ویژگی‌های کمی گلابی وحشی در کلاس‌های مختلف شیب

آماره P	طبقه درصد شیب			شاخص
	۳۰-۴۵	۱۵-۳۰	۰-۱۵	
*۸/۰۳	۲/۶۳ <sup>a</sup>	۶/۵۶ <sup>b</sup>	۳/۹۸	تراکم
*۲/۵۱	۲/۸۴ <sup>b</sup>	۲/۹۵ <sup>a</sup>	۲/۸۹	ارتفاع
*۸/۹۵	۷/۸	۹ <sup>a</sup>	۸/۲۹ <sup>b</sup>	قطر برابر سینه
۸/۰۵	۶/۴	۶/۷۶	۶/۸۳	قطر تاج
۱۵/۳۵	۱/۶۰	۱/۱۷	۱/۳۶	ارتفاع تاج
**۹/۶۰	۲/۳۹ <sup>c</sup>	۱۰/۰۱ <sup>b</sup>	۳/۷۵ <sup>a</sup>	تاج پوشش

و a b نماد گروه‌ها، \* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و \*\* معنی‌دار در سطح ۰/۰۱.

جدول ۲ همبستگی بین درجه‌ی سلامت تاج با شیب، ارتفاع از سطح دریا و جهت جغرافیایی را نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، بین سلامت تاج گلابی وحشی با درصد شیب و ارتفاع از سطح دریا هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری وجود ندارد. اما وضعیت سلامت تاج با جهت جغرافیایی همبستگی معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ نشان می‌دهد. وضعیت سلامت تاج نمونه‌های مورد بررسی در دامنه‌های روبه شمال مطلوب‌تر اما در جهت‌های جنوبی نامطلوب است.

جدول ۲: رابطه‌ی شاخص سلامت تاج با شیب، ارتفاع و جهت جغرافیایی با استفاده از آزمون Chi-square

متغیر	درجه آزادی	مقدار	سطح معنی‌داری
شیب	۹	۹/۹۱	۰/۰۶۸
ارتفاع از سطح دریا	۶	۵/۳۰	۰/۱۱۱
جهت جغرافیایی	۹	۴۷/۰۲	۰/۰۰۰

جدول ۳ همبستگی بین تقارن تاج و شاخص کیفیت تنه را با شیب، ارتفاع از سطح دریا و جهت جغرافیایی نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود بین تقارن تاج و ویژگی‌های محیطی شیب و ارتفاع از سطح دریا هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری وجود ندارد. اما شاخص تقارن تاج در جهت‌های جغرافیایی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ با جهت جغرافیایی است، به طوری که بیشترین تقارن در جهت‌های شمالی مشاهده شده است.

همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، بین کیفیت تنه و شیب همبستگی معنی‌داری مشاهده نشده است. اما بین متغیر وابسته‌ی کیفیت تنه با عوامل ارتفاع از سطح دریا و جهت جغرافیایی رابطه معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ مشاهده شده است. به عبارتی می‌توان گفت که کیفیت تنه در جهت‌های شمالی از وضعیت مطلوب‌تری نسبت به سایر جهت‌ها برخوردار بوده است. همچنین می‌توان گفت که نمونه‌های مورد بررسی در ارتفاعات میانی (۱۷۵۰-۱۵۰۰)، از وضعیت مطلوب‌تری از لحاظ کیفیت تنه برخوردار بوده‌اند.

جدول ۳: ضریب Chi-square برای تعیین درجه‌ی همبستگی بین تقارن تاج و کیفیت تنه با شیب، ارتفاع و جهت جغرافیایی

متغیر	تقارن تاج		کیفیت تنه	
	درجه آزادی	ضریب کای	درجه آزادی	ضریب کای
شیب	۳	۵/۶۸	۶	۲۱/۵۳
ارتفاع از سطح دریا	۲	۸/۸۹	۴	۲۲/۵۱
جهت جغرافیایی	۳	۱۵/۹۵	۶	۲۵/۳۱

نتایج تحقیق نشان داده که گلابی وحشی در منطقه زردلان ایلام از نظر شاخص‌های تراکم، ارتفاع و قطر برابر سینه در شیب‌های میانی دارای وضعیت مطلوب بوده است. از شیب در بسیاری از مطالعات به عنوان عاملی موثر بر وضع خاک و پراکنش

پوشش گیاهی یاد شده است. در شیب کم، فرسایش کم و عمق خاک بیشتر است و آبشویی عناصر مغذی کمتر می شود، لذا مناسب بودن شاخص های ذکر شده ی گلایی وحشی در شیب های کمتر از ۳۰ در صد در منطقه ی زردلان، مورد انتظار است. فتاحی و همکاران (Fatahi *et al.*, 2000) در مطالعه ی جامعه مازودار-گاوزبان در مریوان، که غالباً بین ارتفاع ۱۳۲۰ تا ۱۵۰۰ متر از سطح دریا و بر روی دامنه های شمالی و شمال غربی و مناطقی با شیب ۱۵ تا ۳۰ درصد قرار دارد. خاک مطلوب قهوه ای کلاسیک با عمق متوسط تا عمیق و با بافت لیمونی تا لیمونی رسی این جامعه را با چنین شیبی مربوط دانسته است. بدیهی است که با افزایش شیب دامنه، احتمال استقرار زادآوری گلایی وحشی، که در کیفیت آینده توده اثر دارد، کمتر است. جزیره ای و ابراهیمی رستاقی (Jazirehee and Ebrahimi Rastaghi, 2003) شیب، جهت، ارتفاع از سطح دریا و برخی عوامل دیگر را از جمله عوامل مهم و مؤثر بر بذردهی و زادآوری درختان جنگلی عنوان کرده اند. دانیتا و ایوانچی (Danita and Ivanchi, 1994) در رومانی در تحقیق خود روی انواع اکوسیستم های جنگلی نشان دادند که همبستگی معنی داری بین تیپ خاک، شیب زمین و پوشش جنگلی وجود دارد.

همچنین نتایج نشان داد که شاخص های سلامت تاج، تقارن تاج و کیفیت تنه گلایی وحشی در جهت های شمالی وضعیت بهتری دارد. تفاوت در میزان رطوبت هوا، تابش نورخورشید، درجه حرارت و وزش بادهای منطقه ای در جهت های مختلف، تأثیر چشمگیری بر حاصلخیزی، رطوبت و عمق خاک و در نتیجه پراکنش و رویش گیاهان دارد. این تأثیر به خصوص در مناطقی که میزان بارندگی و رطوبت در حد پایینی قرار دارد، قابل توجه است (Kabrick and Shifley, 2004). در این باره، حمزه پور و همکاران (Hamzhepour *et al.*, 2010) در بررسی تیپ گیاهی گلایی-شن منطقه سپیدان فارس، حضور گلایی وحشی را غالباً در دامنه های شمالی گزارش نموده و حضور آن در دامنه های دیگر را به ندرت ذکر کرده اند. همچنین گلشیری و همکاران (Golshiri *et al.*, 2014) در بررسی ارتباط پوشش گیاهی با برخی از ویژگی های رویشگاهی در منطقه فریدون شهر اصفهان، نشان دادند که عامل جهت روی تراکم پوشش گیاهی مؤثر است، به طوری که جهت های جنوبی و غربی از نظر ترکیب و تراکم پوشش گیاهی با جهت های شمالی و شرقی اختلاف معنی داری دارند و اغلب از تراکم کمتری برخوردار هستند، که این امر به تشدید فرسایش خاک در این جهت ها می انجامد.

یافته های تحقیق در خصوص ارتباط شاخص های رویشی گلایی وحشی با عامل ارتفاع از سطح دریا نشان داد که کیفیت تنه در ارتفاعات میانی (۱۵۰۰ تا ۱۷۵۰ متر) بهترین وضعیت را دارد اما ارتفاع از سطح دریا با سایر متغیرهای کمی و کیفی بررسی شده هیچگونه ارتباط معنی داری را نشان نداده است. حسینی (Hosseini, 2015) نشان داد که ارتفاع از سطح دریا بر تنوع، غنا و یکنواختی گونه ای اشکوب درختی دارای تأثیر معنی دار است و طبقات ارتفاعی میانی در جنگل هیانان ایلام، بالاترین تنوع و غنای گونه ای را دارد.

- Barnes, B.V., Zak, D.R. and Spurr, S.H. (1998). *Forest Ecology*. John Wiley and Sons Inc., New York, 774 Pp.
- Bozorgi, A. and Baharvand, R. (2013). Investigation of spatial distribution pattern of wild pear forest storages in Cham Hesar Delfan, Lorestan province. The First National Conference on Agriculture and Sustainable Natural Resources, the Higher Education Institute of Mehr Arvand. (In Persian)
- Danita, N. and Ivanchi, T. (1994). Forest ecosystem types in the Moldova republic. *Revista*.
- Fatahi, M., Ansari, N., Abasi, H.R. and Khanhasani, M., (2000). Management of Zagros Forests. Research Institute of Forests and Rangelands, 240: 471 Pp. (In Persian)
- Golshiri, R., Vahabi, M.R. and Tarkesh- Esfahani, M. (2014). Relationship between vegetation and some of the site features in Fereydoun city, Isfahan. MSc Thesis, Esfahan industrial University, Esfahan, Iran. 129 Pp. (In Persian)
- Hamzehpour, M., Sagheb-Talebi, Kh., Bordbar, K., Joukar, L., Pakparvar, M. and Abbasi, A.R. (2010). Impact of environmental factors on distribution of wild pear (*Pyrus glabra* Boiss.) in Sepidan region, Fars province. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 18(4): 499-516. (In Persian)
- Hosseini. A. (2015). Effect of gradient altitude on the diversity of tree species in oak forests of Hayanan, Ilam. *Journal of Natural ecosystems of Iran*, 6(1): 1-9. (In Persian)
- Hosseinzadeh, J. (2004). An Investigation on Effects of some Ecological Factors on Distribution of Different species of *Amygdalus* in Ilam province. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 9(1): 151-176. (In Persian)
- Hosseinzadeh, J., Tahmasebi, M. and Mohammadpour, M. (2015). Vegetative and site characteristics of *Anagyris foetida* L. in Zagros forests. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 23(3): 393-401. (In Persian)
- Jahanbazi, H., Mirbadin, A.R., and Talebi, M. (2001). Determination of diameter increment of Persian oak (*Quercus brantii*) in West- Iran (Chaharmahal va Bakhtiari Province). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 5(1): 1-33. (In Persian)
- Jahanbazi, H., Heydari, H., Sagheb Talebi, Kh. And Khatamsaz, M. (2003). Site demands of *Ulmus boissieri* in Bazoft Tangehoonii Chahar Mahal -va- Bakhtyari province. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 8(1): 1-58. (In Persian)
- Jazirehee, M.H., and Ebrahimi Rastaghi, M. (2003). *Silviculture of Zagros*. Tehran university press, 2633, 560pp. (In Persian)
- Kabrick, M.J. and Shifley, R.S. (2004). Oak forest composition, site quality, and dynamics in relation to site factors in the southeastern Missouri Ozarks: USDA Forest Service, 311 p.
- Manafi, H. (2004). A Study of Some Ecological Characteristics of White Oak in Arasbaran Forests. MSc Thesis, Guilan University, Rasht, Iran. 98 Pp. (In Persian)
- Mehdifar, D. (2004). Investigation of habitat requirement of *Quercus infectoria* oliv in Shine region of Lorestan province. MSc Thesis, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 118 Pp. (In Persian)
- Sagheb Talebi, Kh., Sajedi, T. and Yazdian, F. (2004). A Look at Iran's Forests. Research Institute of Forests and Rangelands, 339: 27 Pp. (In Persian)

Tahmasebi, M. (1995). Investigating and determining the most suitable dimensions of the grid and sampling surface with desire precision oak forests of Zagros. MSc Thesis, Guilan University, Rasht, Iran. 156 pp. (In Persian)



## **Study of environmental factors affecting the characteristics of *Pyrus syriaca* Boiss. in Zarddalan forest, Ilam province of Iran**

H. Fathi<sup>1</sup>, J. Hosseinzadeh<sup>2\*</sup>

**Received:2018.5.30**

**Accepted:2019.11.9**

### **Abstract**

Ilam province is one of the natural habitats of wild pear (*Pyrus syriaca* Boiss.) in Iran. Fruit harvesting, inappropriate grazing of forest areas, deforestation and agricultural developments have endangered the existence of the species in recent years. In this study, the major habitats of the species, which located in the Zardalan forest in the north eastern city of Chardavol in Ilam province, were studied. After specifying the studied area on the map of 1:50000 through using desired parameters, the maps of slopes, directions and elevations were prepared and then by synthesizing them together, work units were determined. In each unit, according to its area, at least three circular sample plots with area of 1000 m<sup>2</sup> randomly chose and environmental characteristics such as slope, direction, elevation, geographical longitude and latitude were determined. Then all the qualitative and quantitative parameters of wild pear were measured and recorded in the plots. The results showed that wild pear in intermediate slopes (15 to 30 percent) has the highest height and diameter at breast height. It was observed that, in the point of crown health, crown shape and trunk quality, north areas are the most suitable habitats for wild pear. The findings also showed that the best trunk quality is at altitude between 1500 to 1750m, but there is no significant correlation between altitude and other qualitative and quantitative parameters of wild pear.

**Keywords: Ilam , Zagros , Zardalan, Environmental factors, , *Pyrus syriaca*.**

---

1- Master of Science, Natural Resources Administration, Ilam, Iran

2- Associate Prof., Department of Forest Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran.

\*(Corresponding Author: J.hosseinzadeh@ilam.ac.ir)

## اصلاح جهشی به منظور افزایش توان تجمع کادمیوم در درختچه گز در مرحله کالوس

پروین کریمی<sup>۱</sup>، مینا تقی‌زاده\*<sup>۲</sup>، موسی سلگی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

### چکیده

گیاه پالایی به عنوان روشی مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست، در پاک‌سازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به کار می‌رود. پژوهش حاضر با هدف بررسی مقاومت و پالایندگی کالوس‌های درختچه‌ی گز تحت تاثیر القای جهش با استفاده از اتیل متان سولفونات انجام شد. در مرحله‌ی اول بهینه کردن القای کالوس و جهش در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف 2,4-انجام شد. آزمایش سوم شامل ارزیابی میزان مقاومت و پالایش کالوس در غلظت‌های صفر تا چهل میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در دو نوع ریزنمونه تیمار شده و نشده با EMS بود. غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان زنده‌مانی و القای کالوس کمترین زمان را ایجاد نمود. اعمال EMS با غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه بیشترین میزان زنده‌مانی و کمترین میزان سیاه شدن ریزنمونه‌ها را ایجاد کرد. بیشترین میزان تجمع کادمیوم به میزان ۱۰۵۳/۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک کالوس در غلظت چهل میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به دست آمد.

**واژه‌های کلیدی:** اتیل متان سولفونات، جهش‌زایی، فلزات سنگین، کشت بافت، گیاه پالایی

### مقدمه

در سال‌های اخیر، حجم زیاد آلاینده‌های محیط زیست ناشی از فعالیت‌های انسانی به یک مشکل عمده در زندگی بشر تبدیل شده است (Soudek *et al.*, 2011). فلزات سنگین با انتقال و تجمع در بدن حیوانات و انسان و ایجاد جهش منجر به تخریب DNA و سرطان‌زایی می‌گردند (Knasmüller *et al.*, 1998). کادمیوم نقش زیستی شناخته شده‌ای در گیاهان ندارد ولی در غلظت‌های زیاد یکسری تغییرات بیوشیمیایی، ساختاری و فیزیولوژیکی را القا می‌کند (Nagajyoti *et al.*, 2010). این فلز در آژانس ثبت بیماری‌ها و مواد سمی آمریکا به عنوان هفتمین عنصر خطرناک رده‌بندی شده است (Clemens & Ma, 2016). به منظور حذف کادمیوم و آلاینده‌های دیگر از نواحی آلوده، روش‌های زیستی به طور موفقیت‌آمیز به کار گرفته شده‌اند (Zacchini *et al.*, 2009). گیاه پالایی در سال‌های اخیر به عنوان یک راهکار مفید و مقرون به صرفه برای کاهش آلودگی‌های خاک با فلزات

۱- دانشجوی فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

\*نویسنده مسئول: m-taghizadeh@araku.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

سنگین مورد توجه قرار گرفته است. این روش ظرفیت گیاهان بومی را برای استخراج فلز از خاک از طریق جذب ریشه‌ای با ویژگی‌های فراابش آن‌ها برای پاک‌سازی مناطق آلوده مورد استفاده قرار می‌دهد (Soudek *et al.*, 2011). پالایش گیاهی ویژگی‌های زیستی و فیزیکی خاک را حفظ و بازیابی زیستی فلزات سنگین را فراهم می‌کند و روش سازگار با محیط زیست، نسبتاً ارزان و ساده می‌باشد (Yang *et al.*, 2002).

بیوتکنولوژی گیاهی با استفاده از کشت سلول و تبدیل بافت به یک ابزار اصلاحی کاربردی در اصلاح مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی مانند تنش‌های فلزات سنگین و ایجاد محیط مناسب برای گزینش گیاهان مقاوم به این تنش را در مدت زمان کوتاه و فضای کم فراهم می‌کند (Taghizadeh *et al.*, 2015). کشت کالوس مدلی مناسب برای مطالعات سوخت و سازهای سلولی، ارزیابی مقاومت به فلزات سنگین و فرآیندهای سم‌زدایی در گیاهان می‌باشد و نسبت به گیاه کامل سازمان‌دهی سلولی و بافت ساده‌تر دارد و بیشتر تحت تاثیر شرایط محیط و تنش فلز قرار می‌گیرد (Nehnevajova *et al.*, 2007). تکنیک جهش‌زایی به‌طور گسترده در اصلاح گیاهان با ایجاد تنوع ژنتیکی و تولید آل‌ل‌های جدید با اهداف مختلف به کار گرفته می‌شود (Piotto *et al.*, 2014). این تکنیک با هدف تعیین ظرفیت سلول‌های گیاهی در تحمل، جذب، سم‌زدایی، سوخت و ساز و ذخیره گسترده‌ی وسیعی از آلاینده‌های فلزی و آلی در کنار کشت درون‌شیشه‌ای در مطالعات بسیار به کار گرفته شده است و فرصت‌هایی نظیر قابل کنترل بودن محیط، القای تنوع، ایجاد جمعیت انبوه، گزینش و تکثیر سریع به‌دست می‌دهد (Xu *et al.*, 2012). ماده جهش‌زا EMS (Ethyl methanesulfonate) یکی از موثرترین و پرکاربردترین مواد مورد استفاده در القای جهش در تحقیقات زیستی است (Zhang *et al.*, 2014).

درخت گز (*Tamarix sp.*) یک گیاه مهم مقاوم به شوری است که به‌طور گسترده در اراضی شنی و مناطق شورقلیایی نواحی خشک و نیمه خشک می‌روید (Ma *et al.*, 2011). بر اساس گزارشی پنج درصد از کادمیوم جذب شده توسط اندام هوایی درخت گز از طریق غدد نمکی موجود در برگ‌های گز دفع شده است. تجمع ۲۸۵ نانومول کادمیوم در گرم وزن خشک در اندام هوایی و دفع ۹/۸ نانومول در گرم ماده خشک در طی هشت روز قرارگیری گیاهچه‌ها در معرض محلول دارای چهل و پنج میکرومولار کادمیوم گزارش شده است (Hagemeyer & Waisel, 1988). تجمع پنج قسمت در میلیون کادمیوم در کشت هیدروپونیک *T. smyrnensis* کشت شده در محلول هیدروپونیک به‌مدت ده روز گزارش شده است. این در حالی است که افزودن نمک با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون در محیط کشت میزان تجمع کادمیوم را به چهل قسمت در میلیون در این گیاه افزایش داد (Manousaki *et al.*, 2009). همچنین *T. smyrnensis* در بستر کشت دارای شانزده میلی‌گرم کادمیوم و ۸۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک بستر، تجمع ۲۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک گیاه و ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم را در برگ‌ها نشان داده است. در این بررسی تجمع عمده‌ی سرب در ریشه و کادمیوم در برگ‌ها به‌دست آمد و افزایش غلظت نمک

در محیط کشت میزان انتقال کادمیوم به برگ‌ها را افزایش داد؛ در صورتی که در انتقال سرب موثر نبود. علاوه بر این دفع مقادیر قابل توجه کادمیوم و سرب از غدد نمکی در سطوح برگ‌ها این گیاه گزارش شده است (Kadukova et al., 2008). دفع ۰/۱ میکروگرم کادمیوم در گرم ماده خشک برگ در سطوح برگ‌ها *T. smyrnensis* از طریق کریستال‌های نمکی ترشح شده از بافت غددی نشان داد که ریشه‌های این گیاه مقاوم به کادمیوم، انتخاب‌پذیری کم در جذب یون‌ها از خاک دارد و ترکیب ترشحات این غدد به ترکیب محیط ریشه بستگی دارد. دفع کادمیوم از طریق غدد برگ‌ها می‌تواند توجیه‌کننده‌ی غلظت کم این فلز در شاخساره (۰/۳ قسمت در میلیون) و یکی از سازوکارهای تحمل تنش فلزات سنگین در این گیاه باشد (Manousaki et al., 2008). به‌طور کلی گیاهان مقاوم به شوری سازگاری بهتری نسبت به تنش‌های محیطی مانند فلزات سنگین دارند و برای مطالعات گیاه‌پالایی پیشنهاد می‌شوند (Ghanaya et al., 2007). بنابراین گز می‌تواند به عنوان یک گزینه نویدبخش در حذف فلزات سنگین نه تنها در خاک‌های معمولی، بلکه در خاک‌های شور در نظر گرفته شود (Ma et al., 2011).

بر این اساس هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی پتانسیل استفاده از کشت درون شیشه‌ای درختچه‌ی زینتی گز و القای تنوع با استفاده از ماده جهش‌زای EMS به‌عنوان عاملی برای افزایش تحمل گیاه به فلز کادمیوم، افزایش قابلیت تجمع فلزی آن و مدلی برای گیاه پالایی بود.

## مواد و روش‌ها

### آزمایش اول - اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی گز

پایه‌های مادری با قلمه‌گیری از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران از رقم زینتی گز *Tamarix aphylla* در اواسط اسفندماه ۱۳۹۴ تهیه و در گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشگاه اراک ریشه‌دار شدند. از قطعات انتهایی یا میانی ساقه‌ی حاصل رشد فصل جاری همراه با فلس و ساقه‌ی یک‌ساله بدون فلس به طول یک الی دو سانتی‌متر برای تهیه‌ی ریزنمونه استفاده شد. این آزمایش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ریزنمونه‌های ساقه‌ی فصل جاری و یک‌ساله گز، بر مراحل کالوس‌زایی انجام شد. ریزنمونه‌ها توسط اتانول هفتاد درصد به مدت شصت ثانیه و سپس هیپوکلریت سدیم بیست درصد به مدت ده دقیقه گندزایی شدند. ریزنمونه‌های گز تحت تیمار پنج غلظت مختلف 2,4-D شامل غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت MS (تکمیل شده با سی گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار) قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک رشد دارای دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند و پس از گذشت یک هفته، هر روز ارزیابی آن‌ها به‌منظور ثبت آغاز زمان انگیزش کالوس صورت گرفت. پس از گذشت یک ماه شاخص‌های حجم کالوس، درصد القای کالوس و میزان ترشح فنل ارزیابی و ثبت شد. حجم کالوس بر اساس درجه‌بندی نمره داده شد. عدم تشکیل کالوس رتبه صفر، حجم کم (قطر توده کالوس کمتر از ۰/۵ سانتی‌متر) رتبه یک، حجم متوسط (بین ۰/۵ - ۱ سانتی‌متر) رتبه سه و حجم زیاد (بیش از ۱ سانتی‌متر)

رتبه پنج داده شد. میزان تجمع فنل و درصد سیاه شدن بافت ریزنمونه در پنج سطح یک تا نه ارزیابی شد؛ بدین ترتیب که فقدان ترشحات قهوه‌ای در ریزنمونه با شماره یک و قهوه‌ای شدن خیلی زیاد و مرگ ریزنمونه با شماره نه مشخص شد (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵؛ گنجی، ۱۳۹۵). آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل نوع ریزنمونه و غلظت هورمون 2,4-D با پنج تکرار اجرا شد.

### آزمایش دوم- بهینه کردن القای جهش در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

به‌منظور بهینه کردن شرایط القای جهش در ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های فصل جاری گز دو عامل غلظت و مدت زمان اعمال EMS ارزیابی شدند. در این آزمایش ریزنمونه‌ها در دو غلظت متفاوت ۰/۲ و ۰/۴ درصد EMS و در سه سطح زمانی صفر، سی و شصت دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند. تکان دادن مداوم محلول برای تماس بیشتر با ریزنمونه‌ها در طی این زمان انجام گرفت. بعد از اتمام زمان‌های مورد نظر، ریزنمونه‌ها با احتیاط خارج و به‌منظور حذف بقایای ماده‌ی جهش‌زای سمی هشت مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند؛ سپس گندزدایی آن‌ها به‌روش اتانول هفتاد درصد به‌مدت شصت ثانیه و هیپوکلریت سدیم بیست درصد به‌مدت ده دقیقه انجام شد. ریزنمونه‌های گندزدایی شده در محیط کشت دارای 2,4-D با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. پس از گذشت یک هفته زنده‌مانی ریزنمونه‌ها ارزیابی و ثبت شد؛ سپس بررسی کشت‌ها به‌منظور ثبت زمان آغاز انگیزش کالوس هر روز انجام شد. اندازه‌گیری حجم کالوس، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و ترشح فنل انجام گرفت و درصد القای کالوس ثبت گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل غلظت ماده‌ی جهش‌زای EMS و زمان اعمال آن بر ریزنمونه‌های گز اجرا شد.

### آزمایش سوم- بررسی میزان مقاومت و پالایش گز در مرحله کالوس نسبت به کادمیوم

در این آزمایش از کالوس‌های هشت هفته‌ای حاصل از ریزنمونه‌های تحت تیمار EMS (غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه) و شاهد (بدون تیمار EMS) استفاده گردید. کالوس‌ها تقریباً در اندازه‌های مشابه و یکسان در محیط کشت MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و نیترات کادمیوم  $(\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$  در غلظت‌های مختلف صفر، ده، بیست و چهل میلی‌گرم بر لیتر انتقال داده شدند و تحت شرایط مشابه در اتاقک رشد قرار گرفتند. این آزمایش نیز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو نوع ریزنمونه و غلظت نیترات کادمیوم اجرا شد. پس از چهل روز صفات مربوط به کالوس‌زایی بررسی و ثبت گردید. ارزیابی صفات در این آزمایش بر مبنای نرخ رشد نسبی (Relative Growth Rate)، کالوس، وزن تر و خشک، شاخص تحمل (Index of Tolerance)، محتوای آب کالوس (Callus water content)، نشت یونی (Electrolyte leakage)، میزان تجمع فلز در توده‌های کالوس و فاکتور تجمع زیستی (Bioconcentration Factor) انجام گرفت.

## اندازه‌گیری صفات

صفات کیفی کالوس مانند حجم، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها میزان ترشح فنل و سیاه شدن کالوس به صورت درجه‌بندی

ارزیابی و ثبت شد.

نرخ رشد نسبی کالوس‌ها با توجه به فرمول زیر محاسبه شد (Patade *et al.*, 2008):

$$\%RGR = [(w_f - w_i) \times 100] / w_i$$

$W_i$  نشان‌دهنده وزن اولیه کالوس و  $W_f$  نشان‌دهنده وزن نهایی در تیمارهای مختلف می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب در کالوس‌های تحت تیمار با استفاده از فرمول زیر انجام گرفت (Errabii *et al.*, 2006):

$$WC = (W_f - W_d) / W_d$$

در این فرمول  $W_f$  برابر با وزن تر کالوس و  $W_d$  وزن خشک کالوس را نشان می‌دهد.

شاخص میزان تحمل بر پایه نرخ رشد نسبی کالوس‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Al-Bahrany & Al-Khayri, 2004).

$$INTOL = RGR_t / RGR_c$$

$RGR_t$  نمایان‌گر نرخ رشد نسبی کالوس در تیمار و  $RGR_c$  نرخ رشد نسبی کالوس در شاهد را نشان می‌دهد.

میزان تجمع فلز کادمیوم با استفاده از روش Israr و همکاران (۲۰۰۶) در دستگاه اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت‌شونده القایی (ICP-OES) با طول موج ۲۲۸/۸۰۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت کادمیوم در هریک از تیمارها بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک گیاهی محاسبه و ثبت گردید. فاکتور تجمع زیستی در کالوس‌ها به‌عنوان نسبت غلظت عناصر کم‌یاب در بافت‌های گیاهی در مواجهه با محیط‌های دارای مقادیر بیشتر این عناصر محاسبه می‌شود. این فاکتور با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Iori *et al.*, 2012):

$$BCF = P/E$$

$P$  در این فرمول غلظت عنصر در بافت گیاهی ( $mg/kg$  ماده خشک) و  $E$  غلظت عنصر در محیط کشت ( $mg/L$ ) را نشان می‌دهد

میزان نشت یونی در کالوس‌ها با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد و با فرمول زیر محاسبه گردید (Azevedo

*et al.*, 2005):

$$EL\% = (L_t / L_a) \times 100$$

در این فرمول  $L_t$  معرف هدایت الکتریکی محلول قبل از قرارگیری در بن‌ماری و  $L_a$  هدایت الکتریکی محلول پس از گرمادهی می‌باشد.

## نتایج و بحث

## آزمایش اول - اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی گز

با توجه به جدول مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت هورمون 2,4-D افزایش تا سطح یک میلی‌گرم در لیتر اثر تحریکی بر درصد انگیزش کالوس داشت. غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به ترتیب با میانگین ۹۴ و ۹۶ درصد کالوس‌زایی، بیشترین میزان القای کالوس را در ریزنمونه‌های گز باعث شده‌اند. وجود هورمون 2,4-D در غلظت‌های صفر و زیاد در محیط کشت اثر منفی بر حجم کالوس نشان داد و کاهش حجم کالوس القایی در ریزنمونه‌های گز را به دنبال داشت؛ به گونه‌ای که افزایش غلظت این اکسین تا میزان یک میلی‌گرم در لیتر روند افزایشی حجم کالوس را ایجاد کرد و بیشترین حجم کالوس (۴/۲۶) را در این گیاه به خود اختصاص داد. محیط کشت دارای هورمون یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین ۱۱/۴۰ روز کمترین زمان القای کالوس را ایجاد کرد؛ اگرچه با محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. از طرف دیگر افزایش غلظت 2,4-D به بیش از سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ترشح فنل را به میزان بسیار زیاد در ریزنمونه‌ها افزایش داد؛ به نحوی که کمترین میزان ترشح فنل (۰/۸۶) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D ترشح شد (جدول ۱). ریزنمونه‌های فصل جاری با ایجاد اختلاف معنی‌دار نسبت به ریزنمونه‌های ساقه‌ی یک‌ساله کمترین زمان انگیزش کالوس را نشان دادند. همچنین ریزنمونه‌های فصل جاری ترشح فنل کمتر را نسبت به ساقه‌ی یک‌ساله در محیط کشت نشان دادند (جدول ۲). به‌طور کلی با در نظر گرفتن تمامی نتایج، تیمار یک میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بر ریزنمونه‌های فصل جاری به دلیل ایجاد حداکثر سرعت انگیزش، حجم و القای کالوس به‌عنوان محیط کشت بهینه جهت القای کالوس در گیاه گز معرفی می‌شود.

جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت هورمون 2,4-D بر صفات کالوس‌زایی گز

2,4-D (mg/L)	القای کالوس (درصد)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	زمان انگیزش کالوس (روز)	ترشح فنل (درجه‌بندی)
صفر	۵۴/۰ <sup>b</sup>	۰/۶۳ <sup>C</sup>	۱۲/۳۰ <sup>a</sup>	۱/۱۵ <sup>ab</sup>
۰/۵	۹۴/۰ <sup>a</sup>	۳/۴۴ <sup>b</sup>	۱۱/۷۰ <sup>a</sup>	۰/۸۶ <sup>a</sup>
۱	۹۶/۰ <sup>a</sup>	۴/۲۶ <sup>a</sup>	۱۱/۴۰ <sup>a</sup>	۱/۴۷ <sup>bc</sup>
۲	۵۰/۰ <sup>b</sup>	۰/۷ <sup>C</sup>	۲۰/۳۰ <sup>b</sup>	۱/۶۰ <sup>c</sup>
۴	۵۰/۰ <sup>b</sup>	۰/۷ <sup>C</sup>	۲۲/۸۰ <sup>c</sup>	۳/۶۱ <sup>d</sup>

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین اثر نوع ریزنمونه بر صفات کالوس‌زایی گز

تیمار	زمان انگیزش کالوس (روز)	ترشح فنل (درجه بندی)
ساقه یک‌ساله	۱۷/۴۰ <sup>b</sup>	۲/۳۶ <sup>b</sup>
ساقه فصل جاری	۱۴/۰۰ <sup>a</sup>	۱/۱۰ <sup>a</sup>

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

افزایش غلظت هورمون 2,4-D تا سطح یک میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی بیشتر و انگیزش سریع‌تر در ریزنمونه‌های گز را القا نمود. غلظت‌های خیلی کم و زیاد اکسین در محیط کشت کاهش کالوس‌زایی را در ریزنمونه‌ها نشان داد. بدین ترتیب می‌توان گفت ریزنمونه‌های گز در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به غلظت‌های کم اکسین خارجی برای القای کالوس نیاز دارند و غلظت زیاد این هورمون در تعادل هورمونی موجود میان اکسین و سایتوکینین درونی گیاه تداخل ایجاد می‌کند. هم‌سو با این نتایج، غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین انگیزش کالوس در مدت زمان پنج الی هفت روز در ریزنمونه‌های ریشه برنج ایجاد نمود (Hoque & Mansfield, 2004). معمولاً به‌منظور کاربرد اکسین در غلظت زیاد در محیط‌های کشت بافت از غلظت‌های زیاد 2,4-D استفاده نمی‌شود زیرا منجر به سرکوب ریخت‌زایی در گیاهان می‌گردد (Sharma *et al.*, 2013). از طرفی با توجه به زمان انگیزش کالوس کمتر، حجم و درصد القای کالوس یکسان در ریزنمونه‌های فصل جاری با ساقه‌ی یک‌ساله می‌توان گفت این ریزنمونه‌ها جهت القای کالوس‌زایی انتخاب مناسبی می‌باشند. مرحله‌ی نمو ریزنمونه نقش مهمی در القای کالوس‌ها و باززایی گیاهان ایفا می‌کند (Hoque & Mansfield, 2004). در این آزمایش بهترین تیمار با ترشح فنل کمتر در ریزنمونه‌های فصل جاری و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد و با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌ی رشد در محیط کشت میزان ترشح فنل افزایش یافت. به‌طور مشابه در کشت بافت پرنده بهشتی (*Strelitzia reginae*) افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سایتوکینین روند افزایشی در ترشح فنل را نشان داده است (North *et al.*, 2012).

### آزمایش دوم - بهینه کردن القای جهش در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل تیمارهای مختلف غلظت در زمان EMS نشان داد که افزایش غلظت و زمان کاربرد این ماده با کاهش در میزان صفات کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های گز همراه بوده است. میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گز در غلظت زیاد ماده جهش‌زای EMS به میزان بسیار زیاد، کاهش یافت. بیشترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه در غلظت ۰/۲ درصد EMS و زمان ۳۰ دقیقه اعمال آن بعد از شاهد مشاهده گردید. حداکثر غلظت و زمان استفاده از EMS در ریزنمونه‌ها منجر به از بین رفتن آن‌ها گردید و مرگ کامل ریزنمونه‌ها را نتیجه داد. بیشترین میزان القای کالوس پس از شاهد، در تیمار غلظت ۰/۲ درصد EMS به‌مدت سی دقیقه صورت گرفت و تفاوت معنی‌دار را با سایر تیمارها ایجاد کرده است. در سایر تیمارهای اعمال EMS القای کالوس در حد صفر بود و اثر منفی افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS بر کالوس‌زایی در گز را نشان داد و

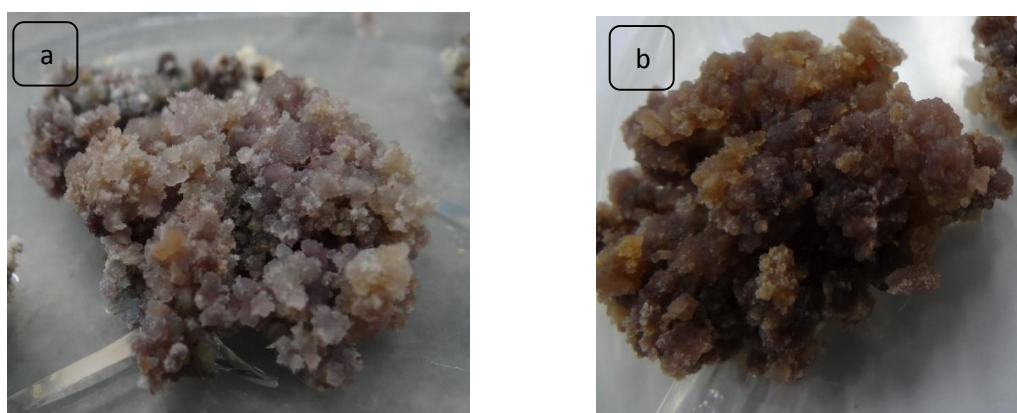


ریزنمونه‌ها با وجود زنده‌مانی تحت تنش شدید حاصل از افزایش غلظت و زمان استفاده از EMS واکنش کالوس‌زایی در محیط کشت را نشان ندادند. حجم کالوس القایی نیز به‌طور مشابه با درصد القای کالوس تحت تاثیر افزایش غلظت و زمان اعمال EMS قرار گرفت و تنها در ریزنمونه‌های حاصل از تیمار غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه حجم کالوس مطلوب به‌دست آمده است (جدول ۳). افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS با افزایش معنی‌دار میزان فنل در ریزنمونه‌ها همراه بوده است. بدین ترتیب که کمترین میزان ترشح فنل (۴/۰۱) در بین تیمارها پس از شاهد در غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه کاربرد EMS حاصل شد. بنابراین هر دو عامل افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS اثر مشابه بر افزایش ترشح فنل داشت. از نظر مورفولوژیکی نیز کالوس‌های حاصل از اثر EMS بر ریزنمونه‌ها، کالوس‌های متفاوت از لحاظ شکل، نوع و رنگ بودند. این کالوس‌ها بافت فشرده‌تر و رنگ سفید تا خاکستری داشتند و مانند کالوس‌های شاهد، شفاف نبودند (شکل ۱).

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل غلظت به‌مدت EMS بر صفات القای کالوس و ترشح فنل در ریزنمونه‌های گز در شرایط درون‌شیشه‌ای

غلظت EMS (%)	زمان اعمال EMS (دقیقه)	زنده‌مانی ریزنمونه (درجه‌بندی)	القای کالوس (درصد)	حجم کالوس (درجه‌بندی)	ترشح فنل (درجه‌بندی)
۰	۰	۱۰/۶۶ <sup>a</sup>	۹۳/۳۳ <sup>a</sup>	۳/۸۳ <sup>a</sup>	۰/۹۰ <sup>a</sup>
۰/۲	۳۰	۸/۰۰ <sup>b</sup>	۶۶/۶۶ <sup>b</sup>	۲/۸۳ <sup>b</sup>	۴/۰۱ <sup>b</sup>
۰/۲	۶۰	۳/۳۳ <sup>c</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۸/۰۶ <sup>c</sup>
۰/۴	۰	۱۰/۶۶ <sup>a</sup>	۹۳/۳۳ <sup>a</sup>	۳/۸۳ <sup>a</sup>	۰/۹۰ <sup>a</sup>
۰/۴	۳۰	۱/۳۳ <sup>d</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۸/۳۳ <sup>c</sup>
۰/۴	۶۰	۱/۰۰ <sup>d</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰ <sup>c</sup>	۹/۰۰ <sup>c</sup>

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.



شکل ۱: مقایسه‌ی بافت کالوس حاصل از (a) ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS با غلظت ۰/۲ درصد و (b) ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS

در این آزمایش تیمار غلظت ۰/۲ درصد و زمان سی دقیقه اعمال EMS به عنوان تیمار مطلوب از نظر میزان زنده‌مانی و صفات القای کالوس به دست آمد. در این تیمار کمترین میزان اثر نامطلوب EMS بر این صفات در ریزنمونه‌ها مشاهده شد که احتمالاً به دلیل غلظت کم ماده جهش‌زا است که ترمیم ناشی از آسیب فیزیولوژیکی در مواد گیاهی راحت‌تر انجام می‌گیرد. به‌طور مشابه کاربرد کمترین غلظت و زمان EMS بر سلول‌های جنینی چغندر قند میزان زنده‌مانی و باززایی آن‌ها را در سطح قابل قبول گزارش کرده است (Wei et al., 2014).

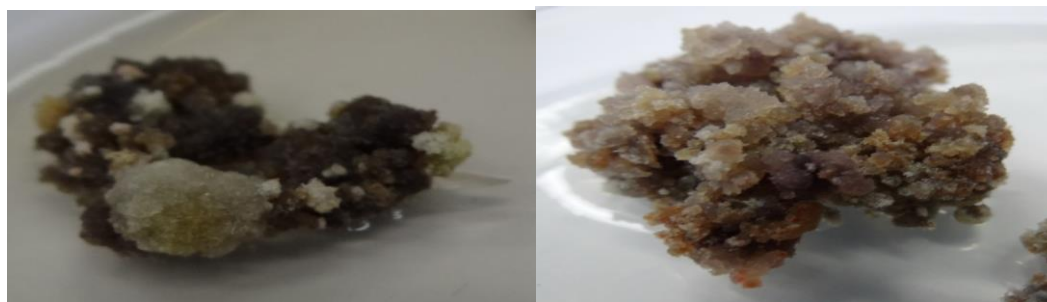
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان اعمال EMS میزان زنده‌مانی، درصد و حجم القای کالوس در ریزنمونه‌ها به شدت کاهش یافت. همچنین افزایش غلظت EMS بر ریزنمونه‌ها اثر بیشتر بر عدم زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نسبت به افزایش زمان اعمال EMS نشان داد. زمان کوتاه اعمال EMS اجازه‌ی جذب میزان لازم از ماده جهش‌زا برای القای جهش را فراهم نمی‌کند. از طرف دیگر زمان‌های طولانی تماس به‌ویژه در غلظت‌های کم ماده جهش‌زا، شانس زنده‌مانی ماده‌ی گیاهی را فراهم می‌کند (Omar & Novak, 1990). هم‌سو با این نتایج افزایش غلظت و زمان کاربرد EMS در ریزنمونه‌های برگ‌ی گیاه دارویی *Asteracantha longifolia* کاهش میزان زنده‌مانی و باززایی را نشان داده است (Behera et al., 2012). افزایش غلظت و زمان اعمال تیمار EMS بر کالوس برموداگرس با کاهش قطر و افزایش میزان نکرور شدن کالوس همراه بود (تقی‌زاده، ۱۳۹۰). ریزنمونه‌های گز تحت تیمار EMS افزایش ترشح فنل و سیاه شدن بافت را متناسب با غلظت و مدت زمان کاربرد EMS نشان دادند. به‌طور مشابه استفاده از تیمار EMS در سلول‌های جنینی نیشکر در غلظت‌های متفاوت، قهوه‌ای شدن مواد گیاهی را با افزایش غلظت EMS در محدوده ۰/۲ - ۰/۰۵ درصد در زمان‌های مختلف نشان داده است (Wei et al., 2014).

کاهش زمان انگیزش کالوس در ریزنمونه‌های تحت تیمار EMS به مدت سی دقیقه نسبت به شاهد دیده شد. نقش تحریکی EMS بر القای کالوس نیز ممکن است با اثر بر زمان فعال شدن سنتز پروتئین‌ها در ارتباط باشد. کاهش زنده‌مانی در ریزنمونه‌ها را می‌توان به اثر سمیت ژنی EMS بر توانمندی (Totipotency) و انعطاف‌پذیری (Plasticity) سلول‌ها در ریزنمونه ارتباط داد (Behera et al., 2012). تماس مستقیم EMS با بافت و جنین‌های سوماتیکی، منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی شدید در ریزنمونه‌ها می‌گردد (Omar & Novak, 1990). ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS، کالوس‌های متفاوت از لحاظ شکل، رنگ و ساختار نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS ایجاد کردند. این کالوس‌ها اگرچه زمان انگیزش کمتری را نشان دادند ولی حجم کالوس کمتری را نیز نسبت به شاهد تولید کردند (شکل ۱). به‌طور مشابه کالوس‌های خرمای تیمار شده با EMS اثر نامطلوب بر نمو جنین را نشان داده است (Omar & Novak, 1990). ساختار این کالوس‌های تحت تیمار EMS گرانوله‌تر بود و بافت آبی کمتری نسبت به کالوس‌های شاهد داشتند. به‌علاوه در این کالوس‌ها نقاط رنگی موجود در کالوس‌های شاهد دیده نشد و نقاط سبز رنگ حاوی کلروفیل نیز در این کالوس‌ها وجود نداشت (شکل ۱). تغییر در رنگ برگ‌ها در اغلب

تیمارهای جهش‌زا رایج است (Alcantara *et al.*, 1996). EMS می‌تواند جهش‌هایی مانند جهش‌های کلروفیلی در گیاهان ایجاد کند که مستقیماً به مدت زمان تماس EMS با بافت در یک غلظت خاص بستگی دارند (Kim *et al.*, 2006).

### ازمایش سوم- بررسی میزان مقاومت و پالایش گز در مرحله‌ی کالوس نسبت به کادمیوم

کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در محیط کشت دارای کادمیوم با همان بافت و رنگ به رشد خود ادامه دادند. در صورتی‌که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط دارای کادمیوم به‌ویژه در غلظت‌های بالا ابتدا ترشح فنل زیاد را نشان دادند که در خود بافت کالوس تجمع یافتند و تا حدی سیاه‌شدن کالوس را موجب شد و بخشی از بافت کالوس‌های قبلی از بین رفت. اما پس از گذشت دو هفته کالوس‌های سفید، شیری تا خاکستری رنگ با بافت متراکم روی کالوس‌ها شروع به رشد کرد و ماهیت بافت و رنگ کالوس بسیار تغییر کرد. این کالوس‌ها فشرده و غیر آبدار بودند و نسبت وزنی بیشتری را نسبت به بافت آبدار کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS ایجاد نمودند. همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS نقاط قهوه‌ای قرمز رنگ در محیط دارای کادمیوم داشتند در صورتی‌که این مورد در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS دیده نشد (شکل ۲).



شکل ۲: بافت کالوس در محیط کشت دارای کادمیوم ۲۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS (سمت چپ) و حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS (سمت راست)

بررسی اثرات متقابل کاربرد EMS در غلظت کادمیوم نشان داد که کالوس‌های حاصل از تیمار EMS، وزن خشک بیشتر با تفاوت معنی‌دار در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS نشان دادند اما وزن خشک آن‌ها در محیط بدون کادمیوم و غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌دار ایجاد نکرد. افزایش غلظت کادمیوم همبستگی مثبت با میزان نشت یونی در هر دو نوع کالوس داشت. بیشترین میزان نشت یونی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS (۷۳/۹۵ درصد) به‌دست آمد که تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها نشان داد. نشت یونی در کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم

(۵۴/۸۵) به طور معنی داری کمتر از کالوس‌های تیمار نشده با EMS در همین غلظت به دست آمد. میزان تجمع کادمیوم در بافت کالوس گز در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS، روند افزایشی تجمع کادمیوم با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت را نشان داد. بیشترین میزان جذب کادمیوم در تیمار ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم با ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS (۱۰۵۳/۵۶) قسمت در میلیون) و پس از آن ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط کشتی با همین غلظت کادمیوم (۹۲۳/۰۹) به دست آمد. در این آزمایش بیشترین میزان فاکتور تجمع زیستی در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS به دست آمد که البته تفاوت معنی دار با ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در غلظت‌های ۱۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم را نشان نداد. ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در محیط‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم و ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط ۲۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم به طور مشابه کمترین سطح فاکتور تجمع را نشان داده‌اند. به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده از اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر صفات رشدی هر دو نوع کالوس تیمار شده با EMS و تیمار نشده با EMS، مهار رشدی کالوس در معرض کادمیوم را وابسته به غلظت نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه‌ی میانگین اثرات متقابل اعمال EMS و غلظت‌های کادمیوم بر ویژگی‌های رشدی کالوس و تجمع کادمیوم

فاکتور تجمع زیستی	میزان تجمع کادمیوم (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	نشت یونی (درصد)	وزن خشک (گرم)	غلظت کادمیوم (میلی گرم در لیتر)	اعمال EMS
-	۸/۴۶ <sup>e</sup>	۴۲/۳۲ <sup>a</sup>	۰/۵۰ <sup>cd</sup>	صفر	
۱۲/۶۴ <sup>b</sup>	۱۲۶/۴۶ <sup>de</sup>	۴۴/۱۹ <sup>ab</sup>	۰/۵۴ <sup>bc</sup>	۱۰	کالوس حاصل از ریزنمونه تیمار نشده با EMS
۱۱/۱۶ <sup>b</sup>	۲۲۳/۲۳ <sup>cd</sup>	۴۹/۷۳ <sup>c</sup>	۰/۵۲ <sup>c</sup>	۲۰	
۲۶/۳۳ <sup>a</sup>	۱۰۵۳/۵۶ <sup>a</sup>	۷۳/۹۵ <sup>e</sup>	۰/۳۱ <sup>e</sup>	۴۰	
-	۱۰/۰۵ <sup>e</sup>	۴۳/۵۵ <sup>a</sup>	۰/۶۰ <sup>bc</sup>	صفر	
۲۵/۴۰ <sup>a</sup>	۲۵۴/۰۵ <sup>c</sup>	۴۷/۰۲ <sup>bc</sup>	۰/۹۳ <sup>a</sup>	۱۰	کالوس حاصل از ریزنمونه تیمار شده با EMS
۱۰/۱۶ <sup>b</sup>	۲۰۳/۲۱ <sup>cd</sup>	۴۹/۵۱ <sup>c</sup>	۰/۶۸ <sup>b</sup>	۲۰	
۲۳/۰۷ <sup>a</sup>	۹۲۳/۰۹ <sup>b</sup>	۵۴/۸۵ <sup>d</sup>	۰/۳۷ <sup>de</sup>	۴۰	

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

تحت شرایط تنش غلظت کم کادمیوم، افزایش میزان اکثر صفات رشدی مانند حجم، وزن تر و خشک و رشد نسبی نسبت به شاهد دیده شد و بیشترین اثر تحریکی در کالوس‌های تحت تیمار غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. القای اثر تحریکی کادمیوم در غلظت کم بر میزان وزن خشک در مطالعه‌ی اثر این فلز در کشت سلولی سویا گزارش شده است (Sobkowiak *et al.*, 2004). کاهش میزان رشد تنها در غلظت‌های زیاد کادمیوم، نشان‌دهنده‌ی توانایی گیاه در حفظ و بقای

خود در یک سطح معین از تنش فلز کادمیوم بوده است. در این آزمایش غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم اگرچه اثر تحریکی معنی دار در صفات رشدی کالوس‌ها ایجاد نکرد اما در صفات وزن خشک، تر و میزان رشد نسبی، میزانی مشابه با سطح شاهد را نشان داد. به‌طور مشابه غلظت‌های کم سرب (صفر الی چهل میلی گرم در لیتر) اثر مثبت بر رشد کالوس برموداگرس را نشان داد (تقی‌زاده، ۱۳۹۰). غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم در کالوس طاووسی (*Spartium junceum*) تفاوت معنی دار در وزن خشک کالوس ایجاد نکرد (گنجی، ۱۳۹۵). غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم نشان داد که حضور این میزان از فلز برای القای اثر بازدارندگی رشد کالوس‌های گز کافی است. کاهش قابل توجه در حجم، وزن تر و خشک کالوس، میزان رشد نسبی و شاخص تحمل تنش در این غلظت از کادمیوم در کالوس‌های گز حاصل شد و تا حد زیادی منجر به از بین رفتن کالوس‌ها گردید. حداقل میزان این صفات در این غلظت کادمیوم با ترشح بالای فنل، نشت یونی و آسیب تنش‌های اکسیداتیو حاصل از حضور کادمیوم در محیط در ارتباط است که در این غلظت به بالاترین میزان رسید و در کالوس‌ها به میزان بسیار زیاد سیاه شدن بافت را ایجاد نمود. هر چند برخی از کالوس‌ها نیز مجدداً شروع به احیا کردند و رشد بسیار کمی را نشان دادند ولی میزان رشد ناکافی بود. در غلظت‌های زیاد کادمیوم، کاهش رشد کالوس همبستگی مثبت با تجمع بالای این فلز توسط کالوس داشته است. کمترین میزان وزن تر کالوس طاووسی در غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم دیده شد (گنجی، ۱۳۹۵). قرارگیری کالوس برموداگرس در معرض تنش فلز سرب تا غلظت صد میلی گرم در لیتر کاهش رشد کالوس‌ها را نشان داد (تقی‌زاده، ۱۳۹۵). انواع مختلفی از سازوکارها برای توضیح اثر تحریکی فلزات پیشنهاد شده است که یکی از این سازوکارها عمل یون‌های فلزی به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم‌های دخیل در سوخت‌وساز سایتوکینین‌ها است که رشد گیاهان را تسریع می‌کند (Nyitrai et al., 2003). افزایش غلظت فلزات سنگین همچنان بر تجمع و انتقال عناصر ضروری برای گیاه اثر گذار است (Kabata-Pendias, 2010). کاهش میزان رشد در گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف فلزات سنگین، اغلب در نتیجه اثرات مستقیم (سمیت تجمع فلزات سنگین در بافت‌ها) و یا غیرمستقیم (محدود کردن تامین آب و مواد غذایی) رخ می‌دهد (Nedjimi & Daoud, 2009). گیاه گز تا غلظت بیست میلی گرم در لیتر کادمیوم توانایی مطلوب در کنترل این تنش را نشان داد، ولی در غلظت‌های بالاتر این سیستم‌های دفاعی تحت تاثیر سمیت یون‌های کادمیوم سرکوب شدند و کارایی لازم را نداشتند.

ترشح فنل با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت کالوس گز رابطه مستقیم داشت. محیط کشت دارای ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم با سیاه شدن و تقریباً از بین رفتن کالوس‌ها همراه بود. قهوه‌ای شدن کالوس آفتابگردان (*Helianthus annuus*) در غلظت زیاد کادمیوم و تجمع مواد فنلی محلول در سیتوپلاسم ریشه کاج اسکاتلندی (*Pinus sylvestris*) تیمار شده با غلظت پنجاه میکرومولار کادمیوم در سیستم کشت هیدروپونیک، گزارش شده است (Azevedo et al., 2005). قهوه‌ای شدن و مرگ کامل کالوس طاووسی در معرض غلظت کادمیوم ۴۰ میلی گرم در لیتر ایجاد شد (گنجی، ۱۳۹۵). تجمع ترکیبات ثانویه با رشد سلول رابطه‌ی عکس دارد (Castro et al., 2016). کادمیوم به عنوان تنش‌زا، یک عامل تنش قوی و القای ایجاد گونه‌های فعال

اکسیژن در گیاهان شناخته شده است (Seregin & Ivanov, 2001). کادمیوم با ایفای نقش واسطه‌ای در فعال‌سازی آنزیم لیپوکسیژناز (LOX) که منجر به تشکیل هیدروپراکسیدازهای لیپیدی می‌گردد، اختلال در فعالیت غشایی را موجب می‌شود. بنابراین در غلظت‌های زیاد کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسکوربات کاهش می‌یابد و در ضمن، تخریب غشای سلولی و اندامک‌ها در نتیجه تنش اکسیداتیو شدید رخ می‌دهد (Shekhawat *et al.*, 2010) و ترشح بیشتر مواد فنلی در بافت، با افزایش نشت یونی، اکسیده شدن این ترکیبات و سیاه شدن کالوس‌ها را موجب می‌شود. از آن‌جا که کالوس‌های حاصل از تیمار EMS تحمل بیشتر نسبت به تخریب و نشت یونی در برابر غلظت‌های زیاد کادمیوم نشان دادند، ترشح فنل کمتری نیز در آن‌ها دیده شد. در این آزمایش وزن خشک بیشتری در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS در حضور کادمیوم در مقایسه با کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمارنشده با EMS به‌دست آمد. در واقع بیشترین میزان وزن خشک کالوس در نمونه‌های تیمار شده با EMS در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم حاصل شد. به‌طور کلی کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در مواجهه با شرایط تنش کادمیوم صفات رشدی مطلوب‌تری را نسبت به کالوس‌های تیمارنشده با EMS نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً اثر EMS در ریزنمونه‌های گز در جهت تقویت و تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه گز به‌گونه‌ای پیش رفته است که منجر به کاهش آسیب‌های فلز سنگین و در نتیجه افزایش معنی‌دار وزن خشک کالوس و سایر فاکتورهای رشدی نسبت به ریزنمونه‌های تیمارنشده با EMS گردید. بدین ترتیب با توجه به افزایش در صفات رشدی، تجمع کادمیوم و فاکتور تجمع زیستی در کالوس حاصل از ریزنمونه‌های تیمار EMS شاید بتوان رخ دادن جهش در ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS را احتمال داد. مشابه با این نتایج، گیاهچه‌های داوودی بازرایی شده از تیمار EMS ویژگی‌های متفاوت رشدی را نشان داده‌اند (Schum & Preil, 1998). افزایش میزان نشت یونی در هر دو نوع کالوس مورد ارزیابی در این آزمایش به‌دست آمد. به‌طور مشابه در ذرت افزایش غلظت کادمیوم افزایش نشت یونی را در گیاهچه‌ها موجب شده است (Hussain *et al.*, 2013b). آسیب غشای سلولی، القای تنش اکسیداتیو و بنابراین افزایش میزان نشت یونی وابسته به غلظت کادمیوم در گیاهان نشان داده شده است (Cui & Wang, 2006).

شاخص تحمل تنش، فاکتوری برای ارزیابی میزان رشد گیاه در محیط دارای فلزات سنگین می‌باشد. این فاکتور در کالوس‌های گز وابسته به غلظت کادمیوم بود و در ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS نیز میزان بیشتری را نشان داد. مشابه با این نتایج، در کشت کالوس درخت *Sesbania drummondii* قادر به تحمل غلظت کم کادمیوم است و در غلظت بیشتر کاهش میزان رشد و شاخص تحمل را نشان داده‌اند (Israr *et al.*, 2006). در کالوس‌های گز تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم نقاط قرمز رنگ به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر به‌وضوح مشاهده شد. در کشت کالوس‌های نیشکر در غلظت‌های مختلف کادمیوم به‌ویژه در غلظت‌های بیشتر، وجود نقاط قهوه‌ای قرمز رنگ در کالوس را گزارش کرده‌اند (Fornazier *et al.*, 2002). پروتئین IRT1 به‌عنوان انتقال‌دهنده آهن، منگنز و روی در گیاهان شناخته شده است که کادمیوم می‌تواند جذب این عناصر را از طریق این پروتئین

مختل نماید (Korshunova *et al.*, 1999). کادمیوم یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی است که به آسانی با آهن که یکی از عناصر بسیار مهم در رشد و متابولیسم گیاهی می‌باشد تقابل دارد. بنابراین علائم کلروزه شدن بافت به دلیل کمبود آهن در نتیجه رقابت این عنصر با کادمیوم برای اشغال مکان‌های غشایی دیده می‌شود (Siedlecka & Krupa, 1999). همچنین رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز می‌تواند در نتیجه اکسیده شدن ترکیبات سلولی به دلیل قرار رفتن در معرض کادمیوم یا حتی تشکیل آنتوسیانین باشد (Fornazier *et al.*, 2002).

میزان تجمع کادمیوم در بافت کالوس‌های گز با غلظت کادمیوم همبستگی مثبت داشت؛ به نحوی که بیشترین میزان تجمع در ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به دست آمد؛ اگرچه کالوس‌ها شاخص تحمل کمتر و بیشترین میزان نشت یونی را در این غلظت نشان دادند. میزان تجمع کادمیوم در کشت کالوس گلرنگ (Namjooyan *et al.*, 2012) و کشت سلولی کاج (Thangavel *et al.*, 2007) وابسته به غلظت و در بافت‌های برگ گیاه دارویی سیلن وابسته به غلظت و زمان قرارگیری گیاهان در معرض تنش کادمیوم گزارش گردید (Vitória, 2001). کالوس گلرنگ میزان تجمع ۳۳۴ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم ماده خشک را در محیط کشت دارای صد میکرومولار کادمیوم نشان داد (Namjooyan *et al.*, 2012). کالوس طاووسی، تجمع وابسته به غلظت کادمیوم را با حداکثر جذب ۷۹۱ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم ایجاد کرد (گنجی، ۱۳۹۵). این مطالعه نشان داد هر دو نوع کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گز به تنش فلز کادمیوم در غلظت‌های کم مقاوم است و این عنصر را در بافت، بدون نشان دادن کاهش رشدی معنی‌دار در طی دوره ۴۵ روزه ذخیره کرد. گیاهان فرارناباشت‌گر فلز کادمیوم مناسب برای اهداف گیاه‌پالایی، باید بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک را ذخیره نمایند و نسبت فلز سنگین ذخیره شده در شاخساره به ریشه بیشتر از یک باشد (Lutts *et al.*, 2004). میزان تجمع کادمیوم در کالوس گز با توجه به غلظت مورد استفاده در محیط کشت در محدوده ۱۰۵۳-۱۲۶ میلی‌گرم در لیتر در غلظت‌های مختلف کادمیوم در محیط کشت اندازه‌گیری شد؛ بنابراین احتمالاً این گیاه را می‌توان از گیاهان فرارناباشت‌گر کادمیوم معرفی کرد. از طرف دیگر میزان تجمع در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS و به‌ویژه در تیمار غلظت ده میلی‌گرم در لیتر کادمیوم بیشتری به دست آمد. کالوس این گیاه علائم سمیت قابل مشاهده را تنها در برابر تنش کادمیوم شدید نشان داد. ضمن این که حداکثر میزان تجمع کادمیوم موجود در بافت با بیش از ۱۰۵۳/۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک کالوس گز در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به دست آمد. به این ترتیب می‌توان گفت این گیاه با جذب کادمیوم در غلظت مناسب و تولید زیست‌توده‌ی بالا می‌تواند در فرآیندهای گیاه‌پالایی مورد استفاده قرار گیرد. در کالوس‌های گز میزان نسبی آب موجود در بافت تحت تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف کادمیوم قرار نگرفت. مشابه با این نتایج گیاهچه‌های گز تیمار شده با سرب در غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌دار در محتوای نسبی آب نشان ندادند؛ بنابراین سمیت فلزات منجر به القای تنش آبی ثانویه حداقل در طی دوره آزمایش نشده است (Manousaki *et al.*, 2009). نشت یونی نیز به‌طور مستقیم تحت تاثیر

شدت تنش فلزات سنگین در کالوس گز قرار گرفت. این نتایج می‌تواند با تخریب غشایی تنش اکسیداتیو در ارتباط باشد؛ زمانی که سلول قادر به مهار تنش اکسیداتیو نباشد تخریب غشایی رخ می‌دهد و با افزایش نشت املاح/الکترولیت همراه است (Azevedo *et al.*, 2005). کالوس گز بیشترین میزان فاکتور تجمع زیستی را در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در هر دو نوع ریزنمونه تیمار شده و تیمار نشده با EMS (به ترتیب ۲۳ و ۲۶) و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر با ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS (۲۵/۴۰) نشان داد. در صنوبر میزان فاکتور تجمع زیستی وابسته به نوع کلون و غلظت گزارش شده است (Zacchini *et al.*, 2009). کاهش میزان فاکتور تجمع زیستی در ریزنمونه‌های تحت تیمار کادمیوم را می‌توان به توانایی حفظ ورود و جریان فلز توسط سلول نسبت داد و همین‌طور به دلیل افزایش میزان فاکتور تجمع زیستی در نتیجه اختلال در قابلیت و عملکرد غشای سلولی دانست (Iori *et al.*, 2012) که میزان نشت یونی و کاهش رشد در کالوس گز در تیمارهای با غلظت زیاد کادمیوم را نشان می‌دهد. در کالوس‌های حاصل از تیمار EMS در غلظت ده میلی‌گرم در لیتر کادمیوم احتمالاً جهش در جهت افزایش القای سازوکارهای دفاعی گیاه و جذب و تجمع کادمیوم در بافت بدون نشان دادن اثرات نامطلوب صورت گرفت.

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت گزینش درون‌شیشه‌ای کالوس‌های گز، ابزار مناسبی در گزینش لاین‌های اصلاح شده در مقاومت به کادمیوم بود. به‌طور کلی نتایج نشان داده است که کالوس *T. aphylla* با تجمع بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم در بافت، به همراه تحریک رشدی و زنده‌مانی مطلوب در شرایط درون‌شیشه‌ای، به احتمال زیاد به‌عنوان یک گیاه فرانباشت‌گر کادمیوم ارزیابی می‌شود. علاوه بر این میزان زیست‌توده‌ی زیاد، گستردگی و عمق زیاد ریشه در این گیاه نیز می‌تواند آن را به‌عنوان یک گزینه‌ی مناسب جهت گیاه‌پالایی معرفی نماید. در این تحقیق همچنین کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار شده با EMS در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم با تجمع دو برابری کادمیوم نسبت به کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های تیمار نشده با EMS و نیز افزایش مقاومت نسبت به حضور کادمیوم، احتمالاً کارآیی مطلوب استفاده از اصلاح جهشی در ایجاد لاین‌های مقاوم به فلزات سنگین و افزایش ظرفیت انباشت کادمیوم در گیاه گز را نشان دادند.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک که پشتیبانی مالی این طرح را در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد

تقبل نمودند سپاسگزاری می‌شود.



## منابع

- گنجی، م. (۱۳۹۵). توانایی ماده جهش‌زای EMS در مقاومت و پالایندگی درختچه زینتی طاووسی نسبت به کادمیوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی دانشگاه اراک، ۲۱۱ ص.
- تقی‌زاده، م. (۱۳۹۰). ارزیابی قابلیت چمن در گیاه‌پالایی سرب، القای درون‌شیشه‌ای و ردیابی مولکولی آن. رساله دریافت درجه دکتری در رشته علوم باغبانی دانشگاه تهران، ۲۱۰ ص.
- تقی‌زاده، م.، سلگی، م. و شهرجردی، ا. (۱۳۹۵). بررسی اثرات ضد میکروبی برخی ترکیبات اسانسی جهت گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های توت فرنگی. زیست فناوری گیاهان دارویی، ۳: ۲۱-۱۰.
- Al-Khayri, J. and Al-Bahrany, A. (2004). Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum*, 48: 105-108.
- Azevedo, H., Glória Pinto, C.G. and Santos, C. (2005). Cadmium effects in sunflower: membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *Journal of plant nutrition*, 28: 2233-2241.
- Behera, M., Panigrahi, J., Mishra, R.R. and Rath, S.P. (2012). Analysis of EMS induced in vitro mutants of *Asteracantha longifolia*(L.) Nees using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 11: 39-47.
- Castro, A.H.F., Braga, K.D.Q., Sousa, F.M.D., Coimbra, M.C. and Chagas, R.C.R. (2016). Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). *Revista Ciência Agronômica*, 47: 143-151.
- Clemens, S. and Ma, J.F. (2016). Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annual review of plant biology*, 67: 489-512.
- Cui, Y. and Wang, Q. (2006). Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. *Plant Soil and Environment*, 52: 523-529.
- Errabii, T., Gandonou, C.B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M. and Skali-Senhaji, N. (2006). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1488-1493.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J., Molina, S.M. and Smith, R.J., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. (2002). Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 71: 125-131.
- Hagemeyer, J. and Waisel, Y. (1988). Excretion of ions (Cd<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) by *Tamarix aphylla*. *Physiologia Plantarum*, 73: 541-546.
- Hoque, M.E. and Mansfield, J.W. (2004). Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *Indica* rice genotypes. *Plant cell, tissue and organ culture*, 78: 217-23.
- Hussain, I., Akhtar, S., Ashraf, M.A., Rasheed, R., Siddiqi, E.H. and Ibrahim, M. (2013). Response of maize seedlings to cadmium application after different time intervals. *Hindawi Publishing Corporation Agronomy*, 2013: 1-9.

- Iori, V., Pietrini, F., Massacci, A. and Zacchini, M. (2012). Induction of metal binding compounds and antioxidative defence in callus cultures of two black poplar (*P. nigra*) clones with different tolerance to cadmium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108: 17-26.
- Israr, M., Sahi, S. and Jain, J. (2006). Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* callus. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50: 121-127.
- Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants. Taylor & Francis Group, New York, CRC press, 507.
- Kadukova, J., Manousaki, E. and Kalogerakis, N. (2008). Pb and Cd accumulation and phyto-excretion by salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *International journal of Phytoremediation*, 10: 31-46.
- Kim, Y., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K. (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Protocols*, 101-103.
- Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., God, R. and Kundi, M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 420: 37-48.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L. and Pakrasi, H.B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant molecular biology*, 40: 37-44.
- Lutts, S., Lefèvre, I., Delpérée, C., Kivits, S. and Dechamps, C., Robledo, A. and Correal, E. (2004). Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality*, 33: 1271-1279.
- Ma, H., Tian, C., Feng, G. and Yuan, J. (2011). Ability of multicellular salt glands in *Tamarix* species to secrete Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> selectively. *Science China Life Sciences*, 54: 282-289.
- Manousaki, E., Kadukova, J., Papadantonakis, N. and Kalogerakis, N. (2008). Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of *Tamarix smyrnensis* growing on contaminated non-saline and saline soils. *Environmental Research*, 106: 326-332.
- Manousaki, E., Kokkali, F. and Kalogerakis, N. (2009). Influence of salinity on lead and cadmium accumulation by the salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *Journal of chemical technology and biotechnology*, 84: 877-883.
- Nagajyoti, P., Lee, K., and Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216.
- Namjooyan, S., Khavarinejad, R., Bernard, F., Namdjoyan, S. and Piri, H. (2012). The effect of cadmium on growth and antioxidant responses in the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) callus. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry*, 36: 145-152.
- Nedjimi, B. and Daoud, Y. (2009). Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204: 316-324.
- Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K.H. and Schwitzguébel, J.P. (2007). In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Reports*, 26: 429-437.
- North, J., Ndakidemi, P. and Laubscher, C. (2012). Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of Physical Sciences*, 7: 638-646.

- Nyitrai, P., Bóka, K., Gáspár, L., Sárvári, É., Lenti, K. and Keresztes, Á. (2003). Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1175-1183.
- Omar, M. and Novak, F. (1990). In vitro plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 20: 185-190.
- Patade, V.Y., Suprasanna, P. and Bapat, V. (2008). Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and in vitro selection for salt tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultural Sciences in China*, 7: 1147-1152.
- Piotto, F.A., Tulmann-Neto, A., Franco, M.R., Boaretto, L.F. and Azevedo, R.A. (2014). Rapid screening for selection of heavy metal-tolerant plants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14: 1-7.
- Schum, A. and Preil, W. (1998). Induced mutations in ornamental plants. In *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Kluwer Academic publisher, Dordrecht, Springer, 333-366.
- Seregin, I. and Ivanov, V. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48: 523-544.
- Sharma, A., Bhansali, S. and Kumar, A. (2013). In vitro callus induction and shoot regeneration in *Eclipta alba* (L.), Hassk. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 3: 43-46.
- Shekhawat, G.S., Verma, K., Jana, S., Singh, K., Teotia, P. and Prasad, A. (2010). In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of *Brassica juncea*. *Protoplasma*, 239: 31-38.
- Shu, Q., Forster, B.P., Nakagawa, H. and Nakagawa, H. (2012). *Plant mutation breeding and biotechnology*. CAB International and FAO, 591.
- Siedlecka, A. and Krupa, Z. (1999). Cd/Fe interaction in higher plants-its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, 36: 321-331.
- Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucinska, R. and Deckert, J. (2004). Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta Bioghimica Polonica-English Edition*, 51: 219-222.
- Soudek, P., Petrová, Š. and Vaněk, T. (2011). Heavy metal uptake and stress responses of hydroponically cultivated garlic (*Allium sativum* L.). *Environmental and experimental botany*, 74: 289-295.
- Taghizadeh, M., Kafi, M. and Fattahi-Moghadam, M.R (2015). Breeding by In vitro Culture to Improve Tolerance and Accumulation of Lead in *Cynodon Dactylon* L. *Journal of Agriculture and Science Technology*, 17: 1851-1860.
- Thangavel, P., Long, S. and Minocha, R. (2007). Changes in phytochelatin and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress. *Plant cell, tissue and organ culture*, 88: 201-216.
- Vitória, A.P., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57: 701-710.
- Wei, P., Zhi, J., Qin, L., Cen, X., Zhu, H. and Zhou, F. (2014). Effects of EMS Treatments on Multiplication and Differentiation of Sugarcane Embryonic Cell Clusters. *Agricultural Biotechnology*, 3: 40-43.
- Yang, X., Long, X., Ni, W. and Fu, C. (2002). *Sedum alfredii* H: a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. *Chinese Science Bulletin*, 47: 1634-1637.

- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L. and Massacci, A. (2009). Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197: 23-34.
- Zhang, X.C., Millet, Y., Ausubel, F.M. and Borowsky, M. (2014). Next-Gen Sequencing-Based Mapping and Identification of Ethyl Methanesulfonate-Induced Mutations in *Arabidopsis thaliana*. In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 4648.

## ***In vitro* mutation breeding of *Tamarix aphylla* to increase Cd tolerance and accumulation**

P. Karimi<sup>1</sup>, M. Taghizadeh<sup>2\*</sup>, M. Solgi<sup>3</sup>

Received:2018.2.3

Accepted:2019.11.9

### **Abstract**

Phytoremediation as a cost-effective and environmentalist friendly technique used to eliminate polluted soils with heavy metals contamination. The present study was aimed to evaluate the resistance and remediation of *Tamarix aphylla* calli treated by in vitro mutagenic agent; with EMS. At the first step, optimizing of callus induction and mutation in media containing different concentrations of 2,4-D was performed. The third experiments involved the evaluating of resistance and remediation rate of callus to Cadmium at the concentrations of 0-40 mg L<sup>-1</sup> in both treated and untreated with EMS. The highest rate of survival and induction of callus was induced by the concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D in the shortest time. EMS at concentration of 0.2% and 30 minute, made the maximum survival and minimum blacking phenomenon of explants. The highest accumulation of Cadmium 1053.56 mg kg/L DW was obtained from callus treated by 40 mg/L Cadmium.

**Keywords:** EMS, Mutation, Heavy metals, , Phytoremediation, Tissue culture.

---

1- MSC Student Arak University Horticultural, Iran

2- Assistance professor, Department of Horticulture, University of Arak, Iran

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

3- Associate professor, Department of Horticulture, University of Arak, Iran

## کاربرد بیوجار و اسید هیومیک برای افزایش مقاومت به تنش خشکی در گل آهار

سپیده کشاورزفرد<sup>۱</sup>، موسی سلگی\*<sup>۲</sup>، حسین باقری<sup>۲</sup>، ایمان شهرجردی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

### چکیده

استفاده از اسید هیومیک و افزودن بیوجار به خاک می‌تواند به عنوان راهکاری مؤثر در کاهش آثار تنش خشکی در گل آهار (*Zinnia elegans L.*) باشد. در این پژوهش تاثیر فاکتورهای بیوجار (صفر، ۲۰ و ۴۰ گرم در کیلوگرم خاک گلدان)، اسید هیومیک (صفر، ۲۰۰ و ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سطح آبیاری (پنجاه و صد درصد ظرفیت زراعی) بررسی شد. بر طبق نتایج به دست آمده، تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل فسفر و پتاسیم برگ‌ها ولی افزایش میزان کارتنوئید، نشت یونی، پرولین، عناصر نیتروژن و منیزیم می‌شود. اسید هیومیک با کاهش تنش خشکی باعث تولید پرولین کم در گیاهان می‌گردد. اثر متقابل بیوجار و اسید هیومیک بر میزان کلروفیل *a* و کل، نیتروژن و فسفر معنی‌دار بود. استفاده از اسید هیومیک باعث مقابله با تنش خشکی و استفاده از آن تحت شرایط تنش خشکی توصیه می‌شود. استفاده از بیوجار نیز برای کمبود عناصر غذایی فسفر و نیتروژن توصیه می‌شود.

### واژه‌های کلیدی: اسید هیومیک، بیوجار، تنش خشکی، گل آهار

### مقدمه

گیاهان طی دوران رشد خود با تنش‌های متعدد محیطی مواجه می‌شوند، که هر یک از آن‌ها می‌توانند با توجه به میزان حساسیت و مرحله‌ی رشدی گیاه اثرات متفاوتی بر رشد و عملکرد داشته باشند. کمبود آب از مهم‌ترین عوامل محیطی کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی، باغی و دارویی به خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیاست (حیدری و میری آزاد مینایی، ۱۳۹۲). تنش طولانی مدت رطوبتی بر تمام فرآیندهای متابولیکی گیاه اثر می‌گذارد و اغلب موجب کاهش تولید گیاه می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010). کشور ایران دارای آب‌وهوای خشک و نیمه‌خشک است و کمبود آب یکی از مشکلات

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

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

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

۳- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

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

اساسی کشاورزی ایران می‌باشد. بنابراین وقوع تنش خشکی در دوره رشد گیاهان امری اجتناب‌ناپذیر است. واکنش گیاهان مختلف و حتی رقم‌های مختلف از یک گیاه نسبت به تنش خشکی متفاوت است (خدابنده و جلیلیان، ۱۳۷۶؛ Vieira *et al.*, 1991).

تنش‌های مختلف محیطی منجر به تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بسیاری می‌شوند که به طرز نامطلوبی رشد و باردهی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند و مانع بروز پتانسیل ژنتیکی کامل گیاه می‌شوند (Rodriguez *et al.*, 2005). در مناطقی با اقلیم خشک و نیمه‌خشک در طی بروز تنش خشکی، گیاهان با ذخیره مواد تنظیم‌کننده‌ی اسمزی همانند اسیدهای آمینه، قندها، برخی از یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها سعی در مقابله با تنش دارند (Reddy *et al.*, 2004). شرایط محیطی تنش‌زا از گیاهی به گیاه دیگر متفاوت است (وفابخش و همکاران، ۱۳۸۷) و عموماً خشک‌سالی مهم‌ترین عامل محدودکننده‌ی رشد گیاه و تولید محصول در سراسر نقاط جهان است (Abedi & Pakniyat, 2010).

از راهکارهایی که برای حفظ و گسترش فضای سبز در مناطقی که دچار کم‌آبی و شوری می‌باشند، می‌توان به آن پرداخت، استفاده از گونه‌های زینتی مقاوم به خشکی و شوری یا القاء مقاومت به این تنش‌ها از طریق روش‌های اصلاح نباتات و فیزیولوژیکی است (بیات و همکاران، ۱۳۹۱). گل آهار به‌عنوان یک گل زینتی پرکاربرد از گیاهان خانواده کلاپرک‌سانان (Asteraceae) با گل‌های رنگارنگ و بومی مکزیک است (Dole & Wilkins, 2005) آهار از جمله گل‌های تابستانه می‌باشد که در حاشیه‌کاری، باغچه و به‌عنوان گل بریدنی استفاده می‌شود (حکمتی، ۱۳۸۲). هم‌چنین این گل به‌دلیل دوره گلدهی طولانی که از اواخر بهار تا اواسط پاییز ادامه دارد و نیز تحمل آن به خشکی و گرمای زیاد، از ارزش بالایی در فضای سبز برخوردار است. این گل، زمین‌های مرطوب و آفتابگیر را می‌پسندد و در دماهای بالا رشد سریعی دارد (بیرقدرا و همکاران، ۱۳۹۵؛ ابراهیم‌زاده و سیفی، ۱۳۷۵؛ Dole & Wilkins, 2005).

در طول سال‌های گذشته، کاربرد برگی (به‌صورت محلول‌پاشی) تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و مولکول‌های زیستی به‌عنوان روشی جدید در افزایش عملکرد و کیفیت محصول در شرایط تنش غیرزنده مورد توجه قرار گرفته است (Nayyar *et al.*, 2005). اسید هیومیک یک ترکیب پلیمری طبیعی آلی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به‌وجود می‌آید که می‌تواند برای افزایش محصول و کیفیت آن به‌کار گرفته شود (Aiken *et al.*, 1985). تأثیر اسید هیومیک بر رشد گیاه ممکن است به‌صورت مستقیم (افزایش کل وزن خشک گیاه) و یا به‌صورت غیرمستقیم (افزایش راندمان مصرف کود و کاهش فشرده‌گی خاک) باشد. اسید هیومیک با افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، ظرفیت نگهداری آب در خاک و هم‌چنین ایفای نقش بر نفوذپذیری غشاء به‌عنوان ناقل پروتئین، فعال کردن تنفس، چرخه‌ی کربس، فتوسنتز و تولید آمینواسید و آدنوزین تری فسفات باعث افزایش رشد گیاهان می‌شود (Muscolo *et al.*, 2013).

از سوی دیگر بیوجار یک ترکیب کربنی آلی عمدتاً پایدار و مقاوم است که از حرارت دادن زیست‌توده، معمولاً در دماهای بین ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط اکسیژن کم (ترجیحاً نبود اکسیژن) تولید می‌شود (Lehmann *et al.*, 2009). افزایش آب قابل‌دسترس در اثر افزودن بیوجار به دلیل تغییری است که بیوجار به واسطه‌ی سطح ویژه‌ی بالا در توزیع اندازه ذرات و تخلخل خاک ایجاد کرده است (Sun *et al.*, 2014). افزودن بیوجار سبب کاهش چگالی ظاهری می‌شود (Laird *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). یکی از مهم‌ترین پارامترهای فیزیکی خاک که به شدت تولید محصول را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد، آب در دسترس گیاه است. مطالعات اخیر نشان دادند که بیوجار سبب افزایش ظرفیت نگهداری آب می‌شود (Martinsen *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2013).

این تحقیق به منظور ارائه‌ی راهکاری برای کاهش مصرف آب و بهبود ویژگی‌های رشدی گل آهار انجام گرفت. بدین منظور به بررسی تأثیر بیوجار و اسید هیومیک در گذر از تنش خشکی و بهبود ویژگی‌های رشدی گل آهار پرداخته شد. با بررسی ویژگی‌های ظاهری و بیوشیمیایی رشدی گل آهار، میزان مقاومت به تنش خشکی به دست آمد و بیوجار و اسید هیومیک به عنوان کاهش‌دهنده تنش‌ها و برطرف نمودن مشکلات کم‌آبی معرفی شدند.

## مواد و روش‌ها

### تیمارها، مکان، زمان و شرایط آزمایش:

این تحقیق در گلخانه‌ی تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشگاه اراک در زمستان سال ۱۳۹۶ و بهار سال ۱۳۹۷ به صورت گلدانی انجام پذیرفت. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. فاکتورها شامل بیوجار (سه سطح: صفر، بیست و چهل گرم در کیلوگرم خاک)، اسید هیومیک (سه سطح: صفر، دویست و پنجاه و پانصد میلی‌گرم بر لیتر) و ظرفیت زراعی (دو سطح پنجاه و صد درصد ظرفیت زراعی) بود. گلدان‌های مورد استفاده پنج کیلویی بودند و جهت تعیین درصد ظرفیت زراعی (FC)<sup>۱</sup> به روش وزنی عمل شد.

در ابتدا بستری از کوکوپیت تهیه گردید و داخل سینی‌های نشا ریخته شد. سپس بذره‌های گل آهار درون سینی‌های نشا کاشته شدند و بستر مرطوب گردید. پس از آن آبیاری یک روز در میان انجام گردید. پس از گذشت حدود پنج روز بذرها جوانه زدند و نشاها ظاهر شدند. مراقبت از نشاها و آبیاری آن‌ها تا زمانی که نشاها دارای چهار برگ حقیقی شدند، ادامه پیدا کرد. سپس نشاها درون گلدان‌هایی که از قبل آماده شده بود، انتقال داده شدند. گلدان‌های مورد استفاده نیز از جنس پلاستیک با قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر بودند و بستر کشت گلدان‌های در نظر گرفته شده شامل مخلوطی از یک قسمت خاک لوم، یک قسمت ماسه و دو قسمت کود دامی پوسیده بود. سطح زیرین گلدان با وزن مشخصی از سنگ‌ریزه پر شد و سپس

<sup>۱</sup> - Field capacity



بیوچار با وزن مشخص به مخلوط خاکی اضافه شد و مخلوط خاکی مورد نظر درون گلدان ریخته شد. تمامی گلدانها در شرایط مناسب و یکسان نگهداری شدند. میانگین دما ۲۵ درجه سانتی گراد، و رطوبت گلخانه پنجاه درصد و شدت نور ۴۰۰ تا ۵۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه بود. در مدت آزمایش گیاهان از نظر بیماری و آفت مورد بررسی مداوم قرار گرفتند.

طول دوره این آزمایش ۹۵ روز بود و شروع آزمایش اسفندماه ۱۳۹۶ و پایان آن خردادماه سال ۱۳۹۷ بود. پس از انتقال نشاها به گلدان (زمانی که گیاهچهها قوی شدند) اعمال تیمارهای تنش و محلول پاشی اسید هیومیک (به صورت هفتگی) انجام گردید و تا پایان دوره آزمایش ادامه یافت. شروع محلول پاشی دو هفته قبل از شروع تنش و دو هفته بعد از انتقال نشا بود. عمل محلول پاشی به صورت افشانه کردن محلول روی تمام قسمت‌های برگ‌های گیاه صورت پذیرفت. پس از پایان آزمایش، میزان کلروفیل، کارتنوئید، پرولین، نشت یونی، میزان عناصر نیتروژن، فسفر، منیزیم، پتاسیم و کلسیم گیاه مورد سنجش قرار گرفتند.

### اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کارتنوئید

به منظور اندازه‌گیری کلروفیل از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده گردید. ۰/۲ گرم برگ تازه از برگ‌های گل آهار را در هاون چینی ریختمیم و با استفاده از نیتروژن مایع آن را خرد و به خوبی له کردیم. ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ در صد به نمونه اضافه، و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت شش هزار rpm (دور در دقیقه) به مدت ده دقیقه قرار داده شد. سپس جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳،۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytica Gena-200plus) خوانده شد. جذب‌های خوانده شده (A) را در فرمول‌های (۴-۱) زیر قرار دادیم و مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید برحسب میلی گرم کلروفیل استخراج شده در هر گرم بافت تر برگ محاسبه گردید.

$$\text{Chlorophylla (chl a)} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V/100W \quad \text{(فرمول ۱)}$$

$$\text{Chlorophyllb (chl b)} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V/100W \quad \text{(فرمول ۲)}$$

$$\text{Total Chlorophyll (Tchl)} = \text{chl a} + \text{chl b} \quad \text{(فرمول ۳)}$$

$$\text{Carotenoides} = 100(A_{470}) - 3.27(\text{mgchl a}) - 104(\text{mgchl b})/227 \quad \text{(فرمول ۴)}$$

در این رابطه، A: جذب ثبت شده، A663: میزان جذب در طول موج ششصد و شصت و سه نانومتر، A645: میزان جذب در طول موج ششصد و چهل و پنج نانومتر، A470: میزان جذب در طول موج چهارصد و هفتاد نانومتر، W: وزن تر نمونه برحسب گرم و V: حجم محلول صاف شده.

## اندازه‌گیری پرولین

به‌منظور اندازه‌گیری میزان پرولین از روش اندازه‌گیری بتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) استفاده شد. نمونه‌های برگ‌ی توسط ازت مایع در داخل هاون چینی خرد شد. برای هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیک سه درصد به‌وسیله سمپلر برداشته و روی نمونه گیاهی خردشده ریخته شد. عصاره‌ی حاصل در فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. فالکن‌های حاوی عصاره، درون سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با پانزده هزار دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه (برای جداسازی مواد اضافی از محلول) قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌ی صاف شده‌ی رویی را با ۲ میلی‌لیتر شناساگر ناین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک خالص در لوله آزمایش ریخته و به‌مدت یک ساعت در دمای نود درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌های آزمایش، چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه و ورتکس شد تا دو فاز جداگانه ایجاد گردید. مقدار دو میلی‌لیتر از فاز رویی توسط سمپلر برداشته، در داخل کووت ریخته شد و در دستگاه اسپکتوفتومتر قرار گرفت. سپس میزان جذب در طول موج پانصد و بیست نانومتر قرائت شد. برای تهیه پرولین‌های استاندارد، ابتدا ۰/۰۱ گرم پودر پرولین در اسید سولفوسالیسیک سه درصد حل شد و به حجم صد میلی‌لیتر رسانده شد و سپس پنج محلول استاندارد با غلظت صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول پایه‌ی مذکور تهیه شد. استاندارد صفر به‌عنوان بلانک دستگاه مورد استفاده قرار گرفت. برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتوفتومتر از تولوئن استفاده شد. غلظت پرولین بر اساس نمودار استاندارد پرولین به‌دست آمد و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر از رابطه زیر (فرمول ۵) محاسبه گردید.

$$X = [(A \times B) / C] / (D / 5) \quad \text{(فرمول ۵)}$$

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

## اندازه‌گیری نشت یونی

برای اندازه‌گیری نشت یونی ابتدا نیم گرم از قسمت وسطی نمونه‌های برگ‌ی تهیه شد. سپس نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر درون فالکن‌های در پیچ دار قرار گرفت و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس فالکن‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (مدل Lutron) اندازه‌گیری شد ( $EC_1$ ). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت یونی در اثر مرگ سلول‌ها، لوله‌های آزمایش در دستگاه بن‌ماری در دمای نود درجه سانتی‌گراد به مدت نود دقیقه قرار داده

شدند و پس از سرد شدن لوله‌ها، مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد ( $EC_2$ ). سپس درصد نشت یونی با استفاده از فرمول زیر (۶) محاسبه شد (Ben Hamed *et al.*, 2007).

$$\text{درصد نشت یونی} = (EC_1/EC_2) \times 100 \quad \text{(فرمول ۶)}$$

### اندازه‌گیری نیتروژن گیاه

برای اندازه‌گیری نیتروژن از روش کج‌دال استفاده شد (Bremner & Mulvaney, 1965). در روش کج‌دال، ازت آمونیاکی ( $N-NH_4$ ) ماده آلی بر اثر ترکیب با اسید سولفوریک غلیظ به صورت سولفات آمونیوم در می‌آید. آمونیوم حاصل شده پس از ترکیب با سود غلیظ در دستگاه تقطیر به گاز آمونیاک تبدیل می‌شود و سپس به وسیله‌ی اسید بوریک جمع‌آوری می‌شود. سرعت فعل و انفعالات فوق با افزایش دما و در حضور کاتالیزور فزونی می‌یابد. در عمل، به منظور افزایش دما، از سولفات پتاسیم و یا سولفات سدیم استفاده می‌شود. در پایان باز تشکیل شده با کمک اسید سولفوریک رقیق (۰/۰۵) تیترا گردید و بدین ترتیب مقدار کل ازت گیاه تعیین شد.

### اندازه‌گیری کلسیم، پتاسیم، منیزیم و فسفر

برای اندازه‌گیری عناصر از روش هضم اسیدی (توسط اسید نیتریک) استفاده می‌گردد. ابتدا نیم گرم از نمونه‌ها توزین شد و داخل لوله‌های شیشه‌ای بلاک دستگاه دایجسشن (کوره یا هضم کننده) ریخته شد. سپس روی هر نمونه‌ی داخل لوله بیست میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه گردید و لوله‌های حاوی نمونه در داخل کوره قرار داده شد. ابتدا به مدت یک ساعت با پنجاه درجه سانتی‌گراد و در ادامه به مدت چهار ساعت با صد و پنجاه درجه سانتی‌گراد در دستگاه دایجسشن هضم گردید. در مرحله‌ی آخر بعد از خنک شدن، نمونه‌ها به صورت مایع کاملاً شفاف در آمدند و با کاغذ صافی واتمن چهل و دو صاف گردیدند و به حجم صد میلی‌لیتر رسانده شدند. در ادامه یک نمونه Blank (نمونه بدون نمونه‌ی گیاهی و فقط حاوی مواد مورد استفاده در آزمایشگاه) ساخته شد. در پایان غلظت عناصر انتخابی در این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی (ICP-OES) اندازه‌گیری شد. دستگاه، غلظت نهایی فلز را در نمونه‌های فوق در حد ق‌سمت در میلیون و یا ق‌سمت در میلیارد محاسبه می‌کند. (Standard methods, 2005).

### تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) اجرا شد. داده‌های حاصله با استفاده از آنالیز آماری ANOVA و توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹،۴) تجزیه شدند. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی‌دار بودن

تفاوت آماری بین میانگین تیمار در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (2010) استفاده  
 جدول ۱: تجزیه‌ی واریانس تاثیر سطوح گوناگون بیوجار، اسید هیومیک و تنش خشکی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و میزان عناصر در گل آهار

میانگین مربعات											منبع تغییرات	درجه آزادی
فسفر	منیزیم	پتاسیم	کلسیم	نیتروژن	پرویلین	نشت یونی	کارتونوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a		
۱۴۳۷۴۷ <sup>ns</sup>	۲۵۶۵۳/۴ <sup>ns</sup>	۷۲۲۱۱۲۴۶/۷*	۱۹۹۷۴۷۱۴/۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۳ <sup>ns</sup>	۵۴/۷۲ <sup>ns</sup>	۴۰۴/۹۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۹ <sup>ns</sup>	۲	بیوجار
۱۳۸۴۶۴/۶ <sup>ns</sup>	۲۸۶۰۸۶/۷ <sup>ns</sup>	۱۳۷۸۸۸۰۰/۹ <sup>ns</sup>	۳۴۹۰۱۲۶۲/۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۴۶/۲۱ <sup>ns</sup>	۳۲/۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۳ <sup>ns</sup>	ns/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۸ <sup>ns</sup>	۲	اسید هیومیک
۲۰۵۳۷۴۰ <sup>**</sup>	۷۲۸۷۸۹۳/۴ <sup>**</sup>	۴۵۰۴۵۶۰۰ <sup>ns</sup>	۶۴۸۳۴۹/۸ <sup>ns</sup>	۰/۱۲*	۵۹۳/۷۰ <sup>**</sup>	۱۴۱۷/۰۱ <sup>**</sup>	۰/۰۰۵۸*	۰/۲۷ <sup>**</sup>	**/۰۰۰۶	۰/۱۹ <sup>**</sup>	۱	خشکی
۷۶۹۳۴۴/۷ <sup>**</sup>	۶۴۱۴۹۸/۹ <sup>ns</sup>	۱۹۹۵۲۱۲۷/۱ <sup>ns</sup>	۸۴۲۵۱۷۸/۸ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>**</sup>	۴۸/۸۲ <sup>ns</sup>	۲۶/۷۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۷*	ns/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۳۸*	۴	بیوجار× اسید هیومیک
۲۸۹۶۶۵/۳ <sup>ns</sup>	۲۱۲۵۱۱/۶ <sup>ns</sup>	۴۰۰۱۹۱۳۵/۷ <sup>ns</sup>	۸۹۳۳۴۷۳/۶ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>**</sup>	۲۱/۰۸ <sup>ns</sup>	۳۱۷/۴۱*	۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۱ <sup>ns</sup>	ns/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۸ <sup>ns</sup>	۲	بیوجار× خشکی
۲۶۹۴۹۳/۸ <sup>ns</sup>	۱۸۰۴۸۶/۶ <sup>ns</sup>	۷۰۷۴۹۵۷/۶ <sup>ns</sup>	۲۱۴۰۱۰۹۷/۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۹۴/۰۶*	۵۸/۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	ns/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵ <sup>ns</sup>	۲	اسید هیومیک× خشکی
۴۰۴۶۸۵*	۲۴۷۰۳۳/۶ <sup>ns</sup>	۴۷۲۱۹۳۱۰/۳*	۸۸۳۱۶۷۷/۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۷ <sup>ns</sup>	۴۳/۰۳ <sup>ns</sup>	۵۸/۱۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۵*	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۰۳۶*	۴	بیوجار× اسید هیومیک× خشکی
۱۲۰۹۵۳/۷۸	۲۹۱۸۳۲/۶۳	۱۴۳۳۰۵۰۰	۱۲۴۱۱۷۰۲/۹	۰/۰۲۵	۱۸/۶۲	۶۴/۴۷	۲۸۰۸/۸۲	۶۲۷۱۷/۵۴	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۱۳	۳۶	خطا
۱۰/۵۶	۱۰/۵۹	۶/۸۵	۱۵/۲۴	۶/۵۴	۶۰/۷۵	۲۰/۸۱	۲۰/۵۲	۲۳/۲۶	۲۴/۶۳	۲۲/۸۳	-	ضریب تغییرات (/)

\*: در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. °: در سطح ۵٪ معنی‌دار شده است. ns: عدم معنی‌داری

شد.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل شده از این تحقیق در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین تأثیر سطوح بیوجار، اسید هیومیک و تنش خشکی بر برخی ویژگی‌های گل آهار

تنش خشکی	اسید هیومیک	بیوجار	کلروفیل a (mg/g FW)	کلروفیل b (mg/g FW)	کلروفیل کل (mg/g FW)	پتاسیم (ppm)	فسفر (ppm)
	صفر	صفر	۰/۴۵abcd	۰/۰۹abc	۰/۵۴abcd	۴۷۰۶۱d	۳۶۰۷a
	صفر	۲۰	۰/۵۵ab	۰/۱۲a	۰/۶۷ab	۵۴۷۸۷abc	۳۵۹۶/۳ab
		۴۰	۰/۴۰bcd	۰/۰۸abc	۰/۴۸bcd	۵۶۶۴۱abc	۲۶۶۳/۳cd
۵۰ درصد ظرفیت زراعی	صفر	صفر	۰/۴۴abcd	۰/۰۹abc	۰/۵۴abcd	۵۴۶۱۹abc	۲۹۱۸/۳bcd
	۲۵۰	۲۰	۰/۲۴d	۰/۰۵c	۰/۳۰d	۵۲۶۵۷bcd	۳۴۶۶ab
		۴۰	۰/۵۲abc	۰/۱۲ab	۰/۶۶abc	۵۵۷۸۲abc	۲۴۶۷/۳d
	صفر	صفر	۰/۵۲abc	۰/۱۲۲ab	۰/۶۵abc	۴۹۴۴۵cd	۳۲۰۰abc
	۵۰۰	۲۰	۰/۵۴abc	۰/۱۱ab	۰/۶۵abc	۶۱۹۲۴a	۲۴۸۱d
		۴۰	۰/۳۱cd	۰/۰۶bc	۰/۳۸cd	۵۵۷۲۱abc	۳۴۷۲ab
	صفر	صفر	۰/۵۴ab	۰/۱۱ab	۰/۶۶۶ab	۵۴۹۲۵abc	۳۴۲۶ab
	صفر	۲۰	۰/۶۳a	۰/۱۳a	۰/۷۷a	۵۵۴۷۹abc	۳۲۲۸/۳abc
		۴۰	۰/۴۵abcd	۰/۰۹abc	۰/۵۵abcd	۵۶۴۴۷abc	۳۵۵۱/۳ab
۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی	صفر	صفر	۰/۴۹abc	۰/۱۰abc	۰/۵۹abc	۵۶۵۲۰abc	۳۶۰۴/۳a
	۲۵۰	۲۰	۰/۶۰ab	۰/۱۳a	۰/۷۴ab	۵۸۲۰۴ab	۳۴۸۳/۳ab
		۴۰	۰/۵۷ab	۰/۱۱ab	۰/۶۹ab	۵۵۱۸۸abc	۳۲۰۵abc
	صفر	صفر	۰/۶۰ab	۰/۱۳a	۰/۷۳ab	۵۴۹۲۹abc	۳۵۵۷ab
	۵۰۰	۲۰	۰/۵۷ab	۰/۱۲ab	۰/۶۹ab	۵۳۳۷۲bcd	۳۴۴۳ab
		۴۰	۰/۶۱ab	۰/۱۳a	۰/۷۴ab	۶۰۰۱۴ab	۳۸۸۴/۳a

**کلروفیل a**

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد که تنش خشکی روی میزان کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشت. با اعمال تنش خشکی میزان کلروفیل a کاهش پیدا کرد. بیوچار و اسید هیومیک هیچ‌کدام به‌تنهایی اختلاف معنی‌داری بر میزان کلروفیل a نداشتند اما اثر متقابل این دو اختلاف معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان داد. اثر متقابل بیوچار، اسید هیومیک و تنش خشکی نیز در سطح پنج درصد معنی‌دار شد و نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴-۶) نشان داد بیشترین مقدار کلروفیل a (۰/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به بیوچار بیست گرم در کیلوگرم و بدون کاربرد اسید هیومیک و رژیم آبیاری صد درصد ظرفیت زراعی و کمترین مقدار آن (۰/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به بیوچار بیست گرم در کیلوگرم و اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر در تنش پنجاه درصد ظرفیت زراعی بود.

**کلروفیل b**

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۴-۳) نشان داد که اثر تنش خشکی در سطح یک درصد بر میزان کلروفیل b معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که در هنگام تنش خشکی میزان کلروفیل b کاهش می‌یابد. همچنین اثر متقابل بیوچار، هیومیک و تنش خشکی در سطح پنج درصد بر ویژگی مورد مطالعه معنی‌دار گردید. مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل سه عامل (جدول ۴-۶) نشان داد بیشترین میزان کلروفیل b (۰/۱۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به بیوچار بیست گرم در کیلوگرم، اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر و صد درصد ظرفیت زراعی و کمترین میزان (۰/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) آن در بیوچار بیست گرم در کیلوگرم، اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر در تنش خشکی پنجاه درصد ظرفیت زراعی بود.

**کلروفیل کل**

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد که تأثیر تنش خشکی بر میزان کلروفیل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل کل کاهش یافت. اثر متقابل بیوچار و اسید هیومیک و اثر متقابل بیوچار، اسید هیومیک و خشکی در سطح پنج درصد معنی‌دار گردید. مقایسه میانگین اثر متقابل سه عامل نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل (۰/۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به بیوچار بیست گرم در کیلوگرم، اسید هیومیک صفر و صد درصد ظرفیت زراعی و کمترین میزان آن (۰/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به بیوچار بیست گرم در کیلوگرم، اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر و تنش خشکی پنجاه درصد ظرفیت زراعی بود (جدول ۲). کلروپلاست‌ها و تجزیه کلروفیل در اثر فعالیت آنزیم کلروفیل‌از<sup>۱</sup> و پراکسیداز از جمله عوامل مؤثر بر کاهش غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش کمبود آب محسوب

می‌شوند (سیروس مهر و همکاران، ۱۳۹۳). پیشنهاد شده است که پایداری کلروفیل می‌تواند به‌عنوان معیاری برای گزینش ارقام مقاوم به خشکی مورد استفاده قرار گیرد (Ajithkumar & Panneerselvam, 2014).

کاهش میزان کلروفیل گونه‌های حساس به تنش می‌تواند در نتیجه تخریب ساختار ظریف کلروپلاست، تغییر نسبت چربی-پروتئین رنگیزه‌ها و یا افزایش فعالیت کلروفیلز باشد. هر چه شدت تنش خشکی افزایش پیدا کند، محتوای رنگدانه‌ها کاهش پیدا می‌کند و احتمال کاهش بیشتر در کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a محتمل‌تر است (سیروس مهر و همکاران، ۱۳۹۳). کاهش مقدار کلروفیل a و کلروفیل b به‌عنوان مکانیسم حفاظت نوری به‌کار گرفته می‌شود تا با کاهش جذب نور، از زنجیره‌ی فتوسنتزی گیاه حفاظت نمایند (Salehi, 2003). بهبود سنتز رنگدانه‌ها، هنگام تنش خشکی، در میان دیگر تغییرات، توانایی کاهش غلظت کلروفیل و کاروتنوئید در بافت‌ها را دارد (Kiani *et al.*, 2008) و عمدتاً با تولید گونه‌های فعال اکسیژن در غشا تیلاکوئیدی صورت می‌گیرد (فرشادفر و محمدی، ۱۳۸۲).

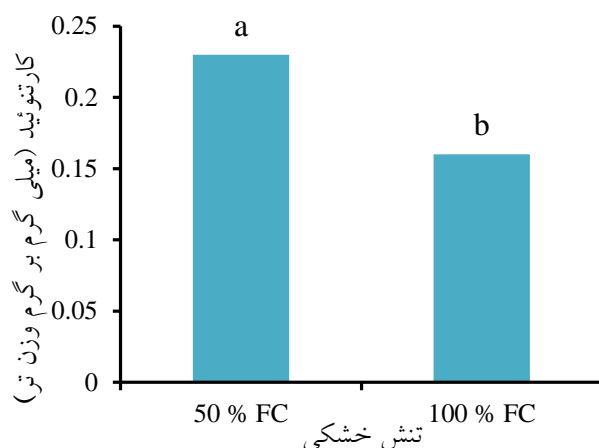
Kholova و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه اثر تنش خشکی بر محتوای کلروفیل در ارقام مختلف ارزن، بیان کردند که محتوای کلروفیل برگ در تمام ارقام کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد و نسبت کلروفیل a/b افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه کلروفیل b و کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگدانه کمکی برای انتقال انرژی در فتوسنتز عمل می‌کنند، نقش مؤثری در حفاظت از سامانه فتوشیمیایی و پایداری آن در شرایط تنش دارند (Farooq *et al.*, 2009). به‌نظر می‌رسد که افزایش نسبت کلروفیل b و کاروتنوئیدها به کلروفیل a یک روش حفاظتی برای مقابله‌ی گیاه در برابر تنش خشکی باشد. تنش خشکی هم‌چنین با افزایش برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اتیلن و آبسزیزیک اسید، فعالیت کلروفیلز را تحریک می‌کند و باعث تجزیه کلروفیل می‌گردد. بنابراین کاهش مقدار کلروفیل مشاهده شده در این تحقیق احتمالاً می‌تواند به‌دلیل کاهش سنتز کلروفیل و افزایش تجزیه‌ی آن باشد.

Karakurt و همکاران (۲۰۰۸) اعلام کردند که اسید هیومیک به‌طور معناداری محتوای کلروفیل برگ‌های فلفل را تحت تأثیر قرار داد و اثر خود را به‌طور اساسی بر محتوای کلروفیل b داشت. واکنش گیاه به تنش خشکی به ماهیت کمبود آب وابسته است و می‌تواند به‌صورت پاسخ‌های فیزیولوژیک کوتاه‌مدت یا بلندمدت باشد. تغییرات محتوای رطوبت برگ و غلظت کلروفیل a و b به‌عنوان یک واکنش کوتاه‌مدت به تنش و معیاری از توان حفظ قدرت منبع در شرایط تنش خشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Saneoka *et al.*, 2004). در آزمایشی Abou-aly و Mady (۲۰۰۹) افزایش ۳۳ تا ۳۸ درصدی کلروفیل a و ۲۷/۸-۱۰/۵۳ درصدی کلروفیل b را در اثر کاربرد اسید هیومیک گزارش کردند. در تحقیق حاضر روند افزایش میزان کلروفیل در محلول پاشی اسید هیومیک مشاهده نشد که با نتایج گزارش مذکور مغایرت داشت.

در آزمایشی دیگر اثر بقایای بیوچار و کمپوست شاخساره درخت برگ نو بر رشد گیاه ذرت تحت شرایط خشکی مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که کلروفیل گیاه ذرت در خاک تیمار شده با بیوچار به طور معنی داری بیشتر از کمپوست و بقایای تازه است (مرادویسی، ۱۳۹۵). ترکیبات آلوکمیخالها که سبب بروز آلوپاتی می‌شوند (که احتمالاً در بقایای اولیه و کمپوست وجود دارند) بر فرآیندهای مهم گیاهی تأثیرگذار هستند و باعث پاسخ‌های متنوع در گیاه می‌شوند که سبب پژمرده شدن یا کلروز گیاه می‌گردند. این ترکیبات سبب کاهش فتوسنتز و اختلال در تنفس می‌شوند (مرادویسی، ۱۳۹۵). در این تحقیق نیز مشاهده می‌کنیم که در شرایط صد درصد ظرفیت زراعی تیمار بدون محلول پاشی اسید هیومیک و بیوچار بیست گرم در کیلو گرم دارای کلروفیل a و کلروفیل کل بیشتری نسبت به تیمار بدون بیوچار است (جدول ۲).

### کارتنوئید

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد که خشکی بر میزان کارتنوئید در سطح آماری پنج درصد معنی دار شد اما بیوچار، اسید هیومیک و اثرات متقابل این عوامل هیچ‌کدام اختلاف معنی داری را نشان ندادند. با افزایش تنش خشکی میزان کارتنوئید نیز افزایش یافت (شکل ۱).



شکل ۱: تأثیر تنش خشکی بر حسب درصد ظرفیت زراعی (FC) بر میزان کارتنوئید در گل آهار

کاروتنوئیدها شامل  $\beta$  کاروتن، گزانتوفیلها و آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند مستقیماً اکسیژن‌های آزاد را غیرفعال کنند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). کاروتنوئیدها انرژی را از مولکول‌های تهییج شده و آزاد اکسیژن می‌گیرند و آن را به انرژی گرمایی تبدیل می‌کنند (Edreva, 2005; کافی و همکاران، ۱۳۹۱). به این ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کنند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). افزایش میزان کاروتنوئیدها در

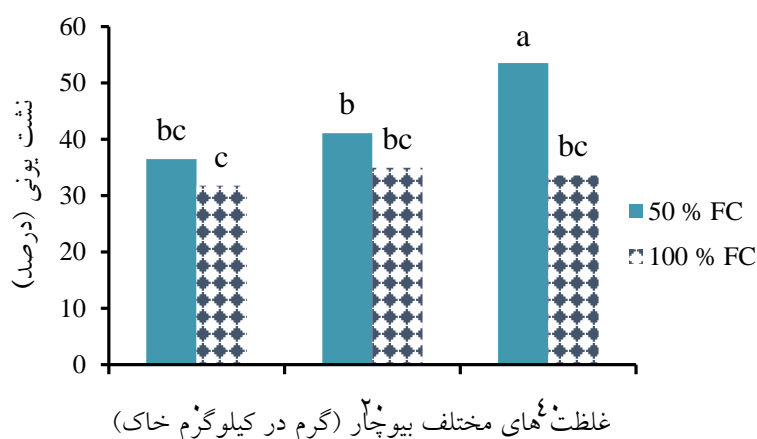


شرایط تنش با توجه به نقش آن‌ها در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای محافظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل) قابل انتظار است. افزایش چشمگیر میزان کارتنوئیدها در مرحله پرشدن دانه و همچنین افزایش آن تحت تنش خشکی، نشان‌دهنده‌ی نقش آن در تعدیل میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشد (نواب‌پور و همکاران، ۱۳۹۴).

گزارش‌های متعددی در مورد افزایش یا کاهش کارتنوئیدها در طی تنش خشکی وجود دارد. میزان کارتنوئیدها در تنش خشکی شدید به‌عنوان یک حامی کلروفیل می‌تواند افزوده شود تا مانع تخریب بیشتر کلروفیل گردد (Abdalla & El-Khoshiban, 2007). بررسی روی بابونه نشان داد که با افزایش کمبود آب از میزان کلروفیل کاسته شد و در مقابل بر مقدار کارتنوئید و آنتوسیانین برگ افزوده گردید (آرزمجو و همکاران، ۱۳۸۹). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مبنی بر افزایش میزان کارتنوئید تحت تنش خشکی با یافته‌های این پژوهشگران همخوانی دارد. استفاده از بیوچار و اسید هیومیک تاثیر معناداری بر میزان کارتنوئید نداشت.

### نشت یونی

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده‌ی بیوچار و خشکی روی صفت نشت یونی تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشت همچنین اثر متقابل بیوچار و خشکی اثر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر روی نشت یونی نشان داد. محلول‌پاشی اسید هیومیک هیچ تأثیری روی میزان نشت یونی نداشت. نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان نشت یونی بیشتر می‌شود. در بررسی اثر ساده‌ی بیوچار مشخص شد که با افزایش بیوچار میزان نشت یونی نیز بیشتر شد. مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل نشان داد که بیشترین نشت یونی مربوط به بیوچار چهل گرم در کیلوگرم خاک و تنش خشکی پنجاه درصد ظرفیت زراعی بود (شکل ۲).

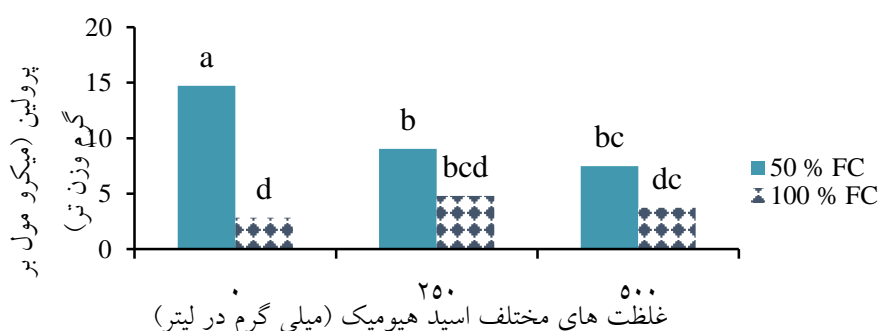


شکل ۲: تأثیر سطوح گوناگون بیوچار و تنش خشکی بر حسب درصد ظرفیت زراعی (FC) بر نشت یونی در گل آهار نشت یونی، نشان‌دهنده‌ی آن است که گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهان شرایط معمول از هدایت الکتریکی (EC) بالاتری برخوردار هستند و این بالاتر بودن EC نشان‌دهنده‌ی پایین بودن پایداری غشای سیتوپلاسمی است. در شرایط تنش خشکی

تجمع گونه‌های فعال اکسیژنی که طی تنش تولید می‌گردند به بسیاری از ترکیبات سلولی نظیر چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و اسیدنوکلیک صدمه می‌زند (جباری و همکاران، ۱۳۸۵). بخش عمده‌ای از سلول‌های زنده از غشاهایی تشکیل شده‌اند که ساختمانی پویا دارند و دارای چرخه‌ی بازسازی چندساعته هستند. زمانی که سلول‌ها به شدت پسابیده می‌شوند آماس آن‌ها از بین می‌روند، پروتوپلاست چروکیده می‌شود و پروتوپلاست در حال خشک شدن با کششی که نتیجه انقباض حجم و چسبیدگی آن به دیواره سلولی است مواجه خواهد شد (کافی و دامغانی، ۱۳۸۱). در تنش‌های شدید بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دولایه‌ای غشا، حالت هگزاگونال (کروی) به خود می‌گیرند و ساختار غشا به ساختار منفذدار تبدیل می‌شود و نشت مواد روی می‌دهد (میرجلیلی، ۱۳۸۴). بنابراین بررسی‌های انجام پذیرفته با نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش میزان نشت یونی هنگام تنش خشکی همخوانی دارد.

## پرولین

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد که خشکی تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد روی میزان پرولین دارد. اثر متقابل خشکی و اسید هیومیک نیز در سطح پنج درصد معنی‌دار شد ولی بیوجار هیچ تأثیر معنی‌داری روی این صفت نداشت. با افزایش تنش خشکی میزان پرولین نیز به مقدار زیادی افزایش یافت. مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک نشان داد که بیشترین مقدار پرولین (۱۴/۷۳ میکرومول بر گرم وزن تر) در خشکی پنجاه درصد ظرفیت زراعی و بدون محلول‌پاشی اسید هیومیک روی گیاه بود و به تدریج با محلول‌پاشی اسید هیومیک میزان پرولین نیز کاهش پیدا کرد به طوری که در گیاهان دارای تنش پنجاه درصد ظرفیت زراعی، کمترین میزان پرولین (۷/۴۷ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به محلول‌پاشی پانصد میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک بود (شکل ۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسید هیومیک باعث کاهش خسارت تنش خشکی در گیاه و متعاقب آن کاهش تولید پرولین در گیاه شد.



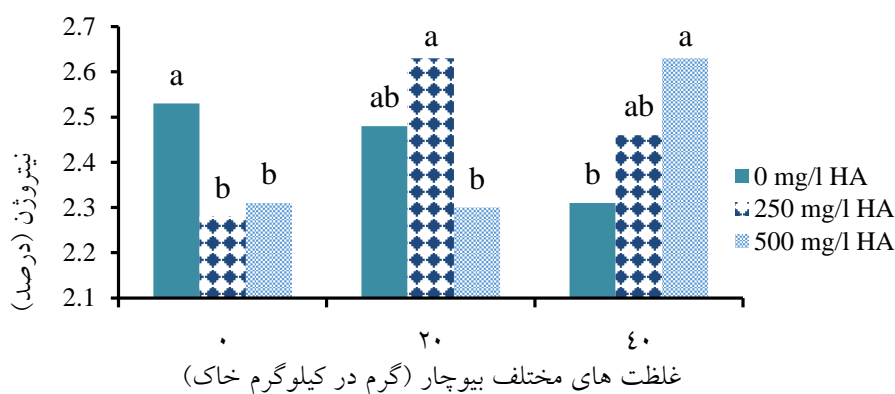
شکل ۳: تأثیر سطوح گوناگون اسید هیومیک و تنش خشکی بر حسب درصد ظرفیت زراعی (FC) بر میزان پرولین در گل آهار

سازوکار دفاعی گیاه در برابر تنش خشکی نیاز به نوعی سازش اسمزی دارد. این سازش اسمزی می‌تواند از طریق سنتز ترکیبات محلول درون سلولی تأمین گردد (Serrano et al., 1999). زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد، تجزیه‌ی پروتئین‌ها

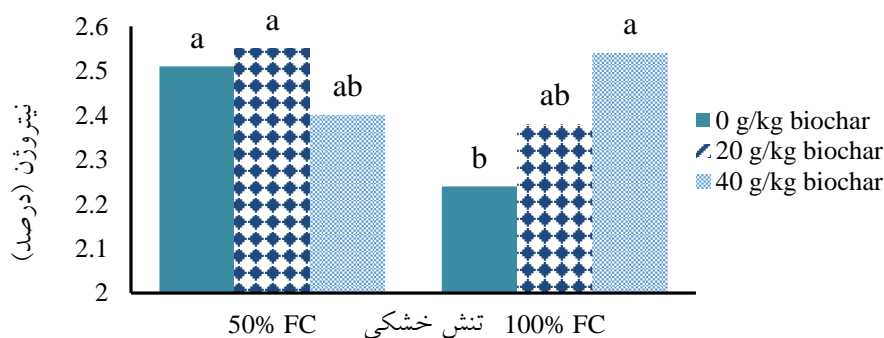
و در نتیجه افزایش آمینواسیدها و آمیدها تسریع می‌شوند. یکی از این آمینواسیدها، پرولین است (Barker *et al.*, 1993). پرولین به‌عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدر رفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، کاهش تأثیر کندکنندگی یون‌ها روی فعالیت آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه پروتئین‌های مختلف، افزایش پایداری برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی، پایداری شکل پروتئین‌ها و در نتیجه حفاظت سامانه‌های غشایی می‌شود (Barker *et al.*, 1993). افزایش پرولین با کاهش پتانسیل آب برگ آغاز می‌شود، که این افزایش منجر به حفظ تورم و کاهش خسارت غشا در گیاهان می‌شود. به این ترتیب با روش تنظیم اسمزی تحمل به تنش کم‌آبی افزایش می‌یابد (Rahdari & Hoseini, 2012). نقش حفاظتی پرولین به غیر از تنظیم اسمزی مربوط به توانایی این ماده در حفظ پایداری غشاهای سلولی و پروتئین‌ها، مهار کردن گونه‌های فعال اکسیژن و بافر کردن پتانسیل احیایی سلول، تحت شرایط تنش است (Matysik *et al.*, 2002). تجمع پرولین به دلیل تنش خشکی می‌تواند ناشی از تحریک سنتز آن یا جلوگیری از تجزیه آن و یا تجزیه پروتئین‌ها باشد (Gomes *et al.*, 2010). به گزارش Saneoka و همکاران (۲۰۰۴) تجمع پرولین رابطه مثبت و مستقیم با افزایش مقاومت به خشکی در تنش‌های خشکی و شوری ایجاد شده در گیاهان دارد. گزارش‌ها نشان داد که در تنش خشکی، غلظت پرولین ممکن است بین سه تا سیصد برابر افزایش یابد (Delauney & Verma, 1993). گیاهان تحت شرایط تنش خشکیمقادیر زیادی آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی مانند پرولین، برای بهبود مقاومت به خشکی تولید می‌کنند. پرولین مانع از اکسیداسیون داخل سلول‌های گیاهی تحت شرایط تنش خشکی می‌شود. استفاده از ترکیبات ارگانیک مانند اسید هیومیک یکی از روش‌هایی است که ممکن است بتواند باعث بهبود بهره‌وری مصرف آب و کاهش اثر تنش خشکی در گیاهان شود. طبق نتایج تحقیقات مشخص شده است که اسید هیومیک سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها، بهبود فعالیت فتوسیستم دو<sup>۱</sup> و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در کلزا می‌شود (Lotfi *et al.*, 2015). تجمع ترکیباتی مانند پرولین تا حدی شرایط را برای جذب آب از محیط ریشه فراهم می‌آورد، اما اتکای گیاهان به این ترکیب هزینه‌بر است و سبب کاهش عملکرد می‌شود (Good & Zaplachinski, 1994). بنابراین می‌توان انتظار داشت که در سطح بالای تنش خشکی، به‌کارگیری اسید هیومیک سبب کاهش تولید پرولین و کاهش اثر خشکی شود. نتایج این تحقیق با یافته‌های محققین دیگر (Zhu & Gong, 2005 ; Manivannan *et al.*, 2007) در مورد افزایش میزان پرولین در طی تنش خشکی همخوانی دارد. همچنین دالوند (۱۳۹۵) گزارش نمود که کاربرد اسید هیومیک سبب کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی و در نتیجه کاهش میزان پرولین در گیاه می‌شود که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

## نیتروژن

نتایج تجزیه‌ی واریانس عنصر نیتروژن نشان داد که تأثیر خشکی در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌داری است (جدول ۱). همچنین اثر متقابل بیوچار و اسید هیومیک و اثر متقابل بیوچار و تنش خشکی بر میزان نیتروژن در سطح یک درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش میزان نیتروژن می‌شود. در بررسی اثر متقابل بیوچار و اسید هیومیک مشخص شد که بیشترین میزان نیتروژن (۲/۶۳ درصد) در تیمارهای بیست گرم در کیلوگرم بیوچار و دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و همچنین تیمار چهل گرم در کیلوگرم بیوچار و پانصد میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک بود. کمترین مقدار (۲/۲۸ درصد) نیز در تیمار بدون بیوچار و اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴). نتیجه می‌گیریم که بیوچار و اسید هیومیک در تعامل با یکدیگر باعث افزایش نیتروژن گیاه شدند. در مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل بیوچار و خشکی مشخص شد که در تنش پنجاه درصد ظرفیت زراعی، بیشترین میزان نیتروژن (۲/۵۵ درصد) در بیوچار بیست گرم در کیلوگرم و کمترین مقدار (۲/۴ درصد) مربوط به بیوچار چهل گرم در کیلوگرم بود و در رژیم آبیاری صد درصد ظرفیت زراعی، با افزایش مقدار بیوچار مقدار نیتروژن نیز بیشتر شد (شکل ۵).



شکل ۴: تأثیر سطوح گوناگون بیوچار و اسید هیومیک (HA) بر میزان نیتروژن در گل آهار



شکل ۵: تأثیر سطوح گوناگون بیوچار و تنش خشکی بر حسب درصد ظرفیت زراعی (FC) بر میزان نیتروژن در گل آهار

اسید هیومیک باعث افزایش جذب نیتروژن می‌شود، این افزایش را می‌توان چنین نیز توجیه کرد که اسید هیومیک با افزایش جذب نیترات توسط افزایش بیان پروتئین حامل نیتروژن در سطح غشای سلولی و همچنین تغییر در میزان کاتیون‌ها جذب نیتروژن را افزایش می‌دهد. همچنین می‌توان اثر هورمونی شبه جیبرلین این ماده را در جذب نیتروژن مؤثر دانست Sharif (2002, Nardi *et al.*). و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که کاربرد اسید هیومیک تجمع نیتروژن را در غلات در مقایسه با گیاهان تیمار نشده افزایش می‌دهد. Ayas و Gulser (۲۰۰۵) گزارش کردند که اسید هیومیک از راه افزایش در محتوای نیتروژن گیاه سبب افزایش رشد، ارتفاع و در نتیجه‌ی آن عملکرد زیست‌توده می‌شود. در بررسی دیگری، کاربرد اسید هیومیک در محلول غذایی موجب افزایش محتوای نیتروژن در اندام هوایی و رشد شاخساره و ریشه در ذرت شد (Tan, 2003). در این تحقیق نیز با افزایش میزان اسید هیومیک میزان نیتروژن بافت‌ها افزایش یافت که با نتایج فوق همخوانی دارد.

طبق نتایج این تحقیق با افزایش کاربرد بیوچار میزان نیتروژن افزایش یافته است. در همین راستا نتایج مطالعات مختلف نیز نشان می‌دهد که کاربرد بیوچار سبب افزایش و بهبود کارایی کودهای نیتروژنی در خاک‌های مختلف و در نهایت جذب بیشتر نیتروژن در گیاه می‌شود (Deenik *et al.*, 2010). Lehmann و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که با کاربرد بیوچار افزایش رشد گیاه به دلیل جذب بیشتر نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، روی و مس می‌باشد. Nigussie و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند که کاربرد بیوچار به مقدار قابل توجهی سبب افزایش جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم در کاهو می‌شود.

## پتاسیم

نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر ساده‌ی بیوچار و اثر متقابل سه‌گانه‌ی بیوچار، اسید هیومیک و خشکی در سطح پنج درصد روی میزان پتاسیم دارای اختلاف معنی‌داری بود. در مقایسه‌ی میانگین سه عامل مشاهده شد که بیشترین میزان پتاسیم (۶۱۹۲۴ قسمت در میلیون) در تیمار بیوچار بیست گرم در کیلوگرم، اسید هیومیک پانصد میلی‌گرم در لیتر و تنش پنجاه درصد ظرفیت زراعی و کمترین میزان آن (چهل و هفت هزار و شصت و یک قسمت در میلیون) در تیمار پنجاه درصد ظرفیت زراعی بدون بیوچار و بدون اسید هیومیک بود (جدول ۲). پس می‌توانیم نتیجه بگیریم که بیوچار و اسید هیومیک هر دو باعث افزایش جذب پتاسیم توسط گیاه شدند.

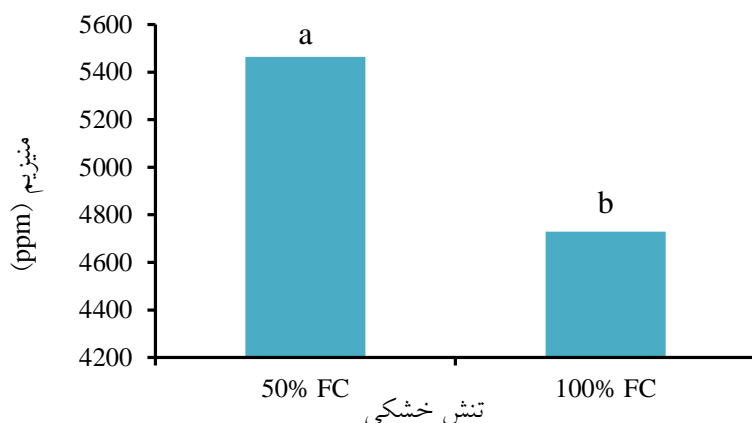
پتاسیم یک عنصر ضروری برای رشد و توسعه گیاهان و مهم‌ترین کاتیون وافر در گیاهان است و سه تا پنج درصد وزن خشک گیاه را پتاسیم تشکیل می‌دهد (Marschner, 1995). وجود پتاسیم کافی نقش مهمی در حفظ پتانسیل آب گیاه و جلوگیری از هدر رفتن آب دارد. از این‌رو در شرایط تنش آبی سبب حفظ فعالیت فتوسنتزی و جلوگیری از کاهش شدید فتوسنتز و تولید مواد فتوسنتزی می‌شود (دانشیان و همکاران، ۱۳۸۱). با افزودن بیوچارها به خاک به دلیل سطح ویژه‌ی بالا، ظرفیت تبادل

کاتیونی زیاد، pH قلیایی و املاح محلول زیاد این ترکیب‌ها، تغییراتی در ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و قابلیت استفاده عناصر غذایی به وجود می‌آید.

Olarieta و همکاران (۲۰۱۱) و نجفی قیری (۱۳۹۴) افزایش قابل توجهی در مقادیر شکل‌های مختلف پتاسیم و همچنین آزادسازی پتاسیم از کانی‌های خاک با کاربرد بقایای مختلف گیاهی و بیوجارهای حاصل از آن‌ها گزارش کرده‌اند. نجفی قیری (۱۳۹۴) افزایش ۴/۴ تا ۷ برابری پتاسیم محلول را در نتیجه افزودن بیوجار حاصل از بقایای گندم، پنبه، ذرت و کنجد به یک خاک آهکی گزارش کرد و بیان نمود که این افزایش با کاربرد بیوجار گندم و کنجد بیشتر از بیوجار ذرت و پنبه بود. افزایش پتاسیم محلول در نتیجه کاربرد بقایای گیاهی و بیوجار به ترکیب آن‌ها به‌ویژه مقدار پتاسیم موجود در آن‌ها، سرعت آزادسازی پتاسیم و تأثیر ملکول‌های آلی بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های خاک، ارتباط دارد. به‌رحال افزودن بیوجار به خاک می‌تواند تأثیرات مثبتی بر فعالیت قارچ‌ها و باکتری‌های خاک از طریق تأثیر بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، جذب ترکیب‌های سمی موجود در خاک و تغییر شرایط برای فعالیت بیشتر برخی میکروب‌ها داشته باشد (Warnock *et al.*, 2007). استفاده از کودهای آلی هیومیکی به‌طور غیرمستقیم از طریق فراهم آوردن عناصر معدنی مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم و همچنین عناصر کم‌مصرف برای ریشه، بهبود ساختار خاک و افزایش نفوذپذیری بستر به آب‌وهوا، زیاد شدن جمعیت میکروبی و افزایش تبادل کاتیونی، باعث حاصلخیزی خاک و در نتیجه افزایش عملکرد و بهبود صفات کیفی در گیاه می‌شوند (Sharif *et al.*, 2002). تأثیر اسید هیومیک بر عملکرد جذب عناصر پرمصرف در نخود، نشان داد که جذب عناصر پرمصرف فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم افزایش یافت و باعث وزن صد دانه و در نهایت افزایش عملکرد گردید (Saki Nejad *et al.*, 2011). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان پتاسیم در نتیجه‌ی افزایش میزان کاربرد بیوجار و اسید هیومیک است که با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد.

### منیزیم

نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که خشکی تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد روی میزان منیزیم داشت اما بیوجار و اسید هیومیک و اثرات متقابل آن‌ها هیچ‌کدام تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (جدول ۱). بیشترین میزان منیزیم (۵۴۶۳/۹ قسمت در میلیون) در تنش خشکی با پنجاه درصد ظرفیت زراعی و کمترین میزان آن (۴۰۷۲۹ قسمت در میلیون) در صد درصد ظرفیت زراعی بود (شکل ۶).



شکل ۶: تأثیر تنش خشکی بر حسب درصد ظرفیت زراعی (FC) بر میزان منیزیم در گل آهار

منیزیم یکی از عناصر ضروری رشد گیاه است و میزان جذب آن به وسیله کاتیون‌های دیگر از جمله پتاسیم، آمونیوم و کلسیم به شدت کاهش می‌یابد. اصلی‌ترین نقش منیزیم در گیاهان، شرکت در ساختمان کلروفیل است که حدود پانزده درصد کل منیزیم را تشکیل می‌دهد و این نسبت بستگی به میزان دسترسی گیاه به منیزیم دارد. به طوری که در شرایط کمبود، این نسبت افزایش یافته و به حدود سی درصد منیزیم کل می‌رسد (Marschner, 1995). خشکی به چند طریق ممکن است بر وضعیت تغذیه‌ی معدنی گیاهان اثر داشته باشد؛ کاهش انتقال یون‌ها از خاک به ریشه‌ها، تغییر جذب یون‌ها به وسیله‌ی ریشه‌ها، تغییر تقاضای ریشه و اندام‌های هوایی برای یون‌ها، کاهش انتقال از طریق گیاه و کمبود یا تجمع یون‌هایی که ممکن است در متابولیسم اختلال ایجاد و یا پاسخ‌های سازش را القا کنند از جمله آنهاست (کافی، ۱۳۸۶).

طبق نتایج این تحقیق با افزایش شدت تنش رطوبتی میزان منیزیم برگ‌ها افزایش یافت. به نظر می‌رسد که علاوه بر تأثیر تنش آب، عوامل دیگری چون غلظت بالای عنصر در خاک، میزان فراهمی دیگر عناصر، آنیونی یا pH، محیط کاتیونی بودن عناصر و تک‌طرفیتی و دو طرفیتی بودن در رقابت بر سر مکان‌های جذب در غشاء ریشه، مؤثر باشند. Ma و همکاران (۲۰۰۴) افزایش مقدار منیزیم موجود در برگ در گونه‌های جنس براسیکا را تحت تنش خشکی گزارش نمودند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

#### فسفر

نتایج تجزیه‌ی واریانس فسفر نشان داد که تنش خشکی و اثر متقابل بیوچار و اسید هیومیک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر میزان فسفر برگ‌ها هستند. همچنین اثر متقابل سه‌گانه‌ی بیوچار، اسید هیومیک و خشکی اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد داشتند (جدول ۱). بر اساس مقایسه‌ی میانگین‌ها با افزایش تنش خشکی، میزان فسفر گیاه کاهش پیدا کرد. مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل سه عامل نیز بیشترین میزان فسفر (سه هزار و هشتصد و هشتاد و چهار

قسمت در میلیون) در رژیم آبیاری صد درصد ظرفیت زراعی با بیوچار چهل گرم در کیلوگرم خاک و اسید هیومیک پانصد میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان فسفر (دو هزار و چهار صد و شصت و هفت قسمت در میلیون) را در تنش خشکی پنجاه درصد ظرفیت زراعی با بیوچار چهل گرم در کیلوگرم خاک و اسید هیومیک دویست و پنجاه میلی‌گرم در لیتر نشان داد (جدول ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش مقدار بیوچار (شرایط غیر تنش) و اسید هیومیک میزان فسفر گیاه نیز افزایش پیدا می‌کند.

در شرایط تنش خشکی، کاهش سرعت انتشار فسفر از خاک به سطح ریشه نسبت به سایر عناصر غذایی بیشتر است، چرا که یون فسفات به ذرات رس چسبیده و کمتر در دسترس ریشه‌های گیاه قرار می‌گیرد. بررسی‌ها در مورد گیاه سویا در شرایط تنش خشکی نشان داده است که توانایی جذب فسفر توسط ریشه‌های این گیاه ضعیف می‌باشد، دلیل این موضوع کاهش قابلیت تحرک فسفر در خاک‌هایی با محتوای پایین آب است، چرا که محتوای آب خاک بر واکنش‌های تجزیه‌ای و فعالیت‌های بیولوژیکی آن تأثیرگذار است (Marschner, 1995). حدیدی (۱۹۹۹) دریافت که با کاهش پتانسیل آب ناشی از حل شدن پلی‌اتیلن‌گلیکول در آب، جذب فسفر توسط ریشه گیاه لوبیا کاهش می‌یابد، وی دلیل این امر را ممانعت پلی‌اتیلن‌گلیکول از جذب و انتقال فسفر در آوندها و ساقه بیان کرد. در پژوهشی که باقری و حیدری شریف‌آباد (۱۳۸۶) به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی بر جو بدون پوشینه انجام دادند، مشاهده نمودند که با افزایش تنش خشکی غلظت فسفر در جو کاهش یافت. آنان بیان کردند که در شرایط تنش خشکی، به دلیل غیر متحرک بودن فسفر در خاک، کاهش رشد و فعالیت ریشه در نواحی خشک خاک و کاهش دسترسی به فسفر، جذب فسفر توسط گیاه کاهش می‌یابد. Lehmann و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که با کاربرد بیوچار افزایش رشد گیاه به دلیل جذب بیشتر فسفر، پتاسیم، کلسیم، روی و مس است. همچنین Inal و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که افزودن بیوچار سبب افزایش غلظت پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر و نیتروژن در گیاه لوبیا شد. Nigussie و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی بیان کردند که کاربرد بیوچار ساقه‌ی ذرت تولید شده در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد، فسفر قابل‌دسترس خاک را به‌میزان قابل‌توجهی افزایش داده است. این پژوهشگران بیان کردند که این افزایش ممکن است به دلیل غلظت بالای فسفر در بیوچار ساقه ذرت باشد. نتایج این تحقیق با یافته‌های این محققین همخوانی دارد.

David و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند استفاده از اسید هیومیک سبب افزایش رشد و جذب مواد غذایی می‌شود. این اثرات سودمند اسید هیومیک از طریق قدرت کلات کنندگی عناصر غذایی و اثر بر خصوصیات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه صورت می‌گیرد زیرا اسید هیومیک دسترسی به فسفر و سایر عناصر غذایی را افزایش می‌دهد. ترکیب‌های اسید هیومیک رشد و جمعیت بسیاری از ریزجانداران (میکروارگانیسیم‌های) سودمند خاک را با تحریک کردن فعالیت آنزیم‌ها افزایش می‌دهند (Burkowska & Donderski, 2007) که با تحریک فعالیت میکروبی جذب عناصر کانی افزایش می‌یابد. ممکن است با تحریک



فعالیت‌های میکروبیولوژی در خاک جذب عناصر غذایی بهبود یابد (Pettit, 2004). همچنین ترکیب‌های هیومیک روی فسفر محلول و فسفر قابل جذب مؤثر است (Guppy et al., 2005). فتوسنتز فرایند پیچیده‌ای است که انرژی لازم برای رشد و تولیدمثل گیاه را فراهم می‌کند. کلروفیل رنگ‌دانه اصلی جذب نور و فتوسنتز است. موادی نظیر فسفر، نیتروژن، پتاسیم و آهن در تشکیل کلروفیل نقش دارند که مصرف اسید هیومیک موجب فراهمی بیشتر این عناصر برای گیاه می‌گردد (Fernandez- Escobar et al., 1996). گزارش شده است که اسید هیومیک دسترسی به فسفر و سایر عناصر غذایی را افزایش می‌دهد که این امر سبب افزایش معنی‌داری در عملکرد گندم بهاره شده است (Jones et al., 2007). نتایج این تحقیق با یافته‌های این محققین مبنی بر افزایش میزان فسفر گیاه در صورت استفاده از اسید هیومیک همخوانی دارد.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد تنش خشکی باعث کاهش میزان انواع کلروفیل، فسفر و پتاسیم ولی افزایش میزان کارتنوئید، نشت یونی، پرولین، نیتروژن و منیزیم شد. بیوجار تأثیر معنی‌داری بر نشت یونی و میزان پتاسیم داشت. استفاده از بیوجار باعث افزایش میزان پتاسیم و نشت یونی شد. اثر متقابل بیوجار و اسید هیومیک بر میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، نیتروژن و فسفر معنی‌دار بود. نتایج نشان داد استفاده هم‌زمان از بیوجار و اسید هیومیک در برخی از ویژگی‌ها مانند مقدار نیتروژن و فسفر اثر افزایشی و مثبتی دارد. استفاده از اسید هیومیک باعث بهبود مقابله با تنش و استفاده از آن تحت شرایط تنش توصیه می‌شود.

## سپاسگزاری

این تحقیق به‌عنوان بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۹۶/۱۰۱۷۰ مورخ ۱۳۹۶/۹/۴ معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک می‌باشد که بدین‌وسیله از همکاری ایشان تقدیر و تشکر می‌گردد.

## منابع

ابراهیم‌زاده ا و سیفی ی (۱۳۷۵). انبارداری و جابجایی گل‌های بریده، گیاهان سبز زینتی و گیاهان گلدانی (ترجمه). انتشارات اختر، تبریز، ص ۲۳۳.

امینی ز و حداد ر (۱۳۹۲). نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۶(۳): ۲۶۵-۲۵۱.

آرزمجو، حیدری م و قنبری ا (۱۳۸۹). بررسی تنش خشکی و سه نوع کود بر عملکرد گل، پارامترهای فیزیولوژیک و جذب عناصر غذایی در گیاه داروئی بابونه (*Matricaria chamomilla L.*). تحقیقات گیاهان داروئی و معطر ایران، ۴: ۴۹۴-۴۸۲.

باقری ع ر و حیدری شریف اباد ح (۱۳۸۶). بررسی اثر تنش خشکی بر عملکرد و اجزای عملکرد و محتوی یون‌ها در گیاه جو بدون پوشینه (*Hordeum sativum L.*). مجله دانش نوین کشاورزی، ۳(۷): ۱۵-۱.

بیات ح، نعمتی ح،، تهرانی فر ع، وحدتی ن و سلاحورزی ی (۱۳۹۱). تأثیر سالیسیلیک اسید بر رشد و ویژگی‌های زینتی اطلسی ایرانی (*Petunia hybrida*) تحت شرایط تنش شوری. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. سال سوم، ۱۱: ۵۰-۴۳.

بیرقدار س، سلگی م، تقی‌زاده م و خدیوی ع (۱۳۹۵). بررسی تاثیر اسید فولیک در جوانه زنی، مراحل رشد و مقاومت به تنش در گل آهار. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک.

جباری ح (۱۳۸۹). اثرات تنش کم آبی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و زراعی آفتابگردان هیبرید. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان.

جباری ف، احمدی ع، پوستینی ک. و علی‌زاده ه (۱۳۸۵). بررسی ارتباط فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با پایداری غشای سلولی و کلروفیل در ارقام مقاوم و حساس به تنش خشکی. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، مجله علوم کشاورزی ایران، ۱۲(۱): ۳۱۶-۳۰۷.

حکمتی ج (۱۳۸۲). گل‌های فصلی (گل‌های فضای آزاد). نشر علوم کشاورزی. ص ۲۸۵.

حیدری م و میری‌آزادمینایی ح ر (۱۳۹۲). فعالیت آنتی‌اکسیدان و ترکیبات بیوشیمیایی گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis L.*) در واکنش به تیمارهای تنش خشکی و اسیدهیومیک. مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی، ۶(۲): ۱۷۰-۱۵۹.

خدابنده ن و جلیلیان ع (۱۳۷۶). بررسی اثر تنش خشکی در مراحل رشد زایشی بر جوانه‌زنی و قدرت بذر سویا. مجله علوم کشاورزی، جلد ۲۸(۱): ۱۹-۱۱.

دالوند م (۱۳۹۵). تاثیر اسید هیومیک بر جوانه زنی بذرها، شاخص‌های رشدی و تنش خشکی در گل جعفری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک.

دانشیان ج، مجیدی هروان ا و جنوبی پ (۱۳۸۱). تأثیر تنش خشکی و مقادیر مختلف پتاسیم بر خصوصیات کمی و کیفی سویا. علوم کشاورزی، ۸(۱): ۱۰۸-۹۵.

سیروس مهر ع، باردل ج، و محمدی س (۱۳۹۳). تغییرات خصوصیات جوانه‌زنی، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلرنگ تحت تاثیر تنش‌های خشکی و شوری. نشریه علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، ۸(۴): ۵۱۷-۵۳۴.

فرشادفر ف و محمدی ر (۱۳۸۲). ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیکی مقاومت به خشکی در آگروپیرون با استفاده از شاخص انتخاب چندگانه. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۴(۳): ۶۴۶-۶۳۵.

قاسمی قهساره م و محمدی ر (۱۳۷۸). اصول به‌زادی و تولید بذر در گیاهان زینتی. انتشارات علم آفرین، اصفهان، ص ۲۶۸.

قاسمی قهساره م. و کافی م (۱۳۹۰). گلکاری علمی و عملی. جلد اول، انتشارات خو، ص ۲۰۲.

قاسمی قهساره، م. و م. کافی (۱۳۹۱). گلکاری علمی و عملی. جلد اول. صفحه ۲۱-۱۹.

کافی م، ابرزویی ا، صالحی م، کمندی ع، معصومی ع، نباتی ج. فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان (۱۳۹۱). دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۵۰۲.

کافی م، برزویی ا، صالحی م، کمندی ع. معصومی ع. نباتی ج (۱۳۸۸). فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ص ۵۰۲.

کافی م، زند ا. کامکار ب، شریفی ح، گلدانی م (۱۳۸۰). فیزیولوژی گیاهی (ترجمه)، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۰: ۳۷۸.

کافی م، و مهدوی دامغانی ع (۱۳۸۱). مکانیسم مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. تألیف آمارجیت بسرا و رانجیت بسرا. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۴۷۲.

کافی م، و مهدوی دامغانی ع (۱۳۸۶). مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۴۶۷.

مرادویسی ا (۱۳۹۵). اثر بقایا، بیوچار و کمپوست شاخساره درختچه برگ نو (*Ligustrum*) بر رشد گیاه ذرت تحت تنش خشکی در دو خاک با بافت متفاوت. دانشگاه صنعتی اصفهان، پایان نامه کارشناسی ارشد، ص ۷۰.

موحدی‌دهنوی م. مدرس‌ثانوی س ع م. سروش‌زاده ع. و جلالی م (۱۳۸۳). تغییرات میزان پرولین، فندهای محلول کل، کلروفیل (SPAD) و فلورسانس کلروفیل در ارقام گلرنگ پائیزه تحت تنش خشکی و محلول‌پاشی روی و منگنز. بیابان، ۳(۱): ۱۰۹-۹۳.

میرجلیلی ع (۱۳۸۴). گیاهان در محیط‌های تنش‌زا. انتشارات نوربخش. تهران، ص ۲۴۰.

نجفی قیری م (۱۳۹۴). تأثیر کاربرد بیوچارهای مختلف بر برخی ویژگی‌های خاک و قابلیت جذب بعضی از عناصر غذایی در یک خاک آهکی.

نشریه پژوهش‌های خاک، ۲۹(۳): ۳۵۸-۳۵۱.

نواب پور س، رمضانپور س و مازندرانی ا (۱۳۹۴). ارزیابی تغییرات سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی ارقام سویا در واکنش به تنش خشکی طی مراحل رشد زایشی. دوفصلنامه فناوری تولیدات گیاهی، ۷(۲): ۳۹-۵۴.

وفابخش ج، نصیری محلاتی م. و کوچکی ع ر (۱۳۸۷). اثر تنش خشکی بر عملکرد و کارایی مصرف نور در ارقام کلزا (*Brassica napus*). پژوهش‌های زراعی ایران، ۶(۱): ۱۹۳-۲۰۴.

Abdalla, M.M. and El- Khoshiban, N.H. (2007). The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticum aestivum* cultivars. *J. Appl. Sci. Res.*, 3 (12): 2062- 2074.

Abedi T. and Pakniyat H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46: 27-34.

Abou-Aly H.E. and Mady, M.A. (2009). Complemented effect of humic acid and biofertilizers on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Productivity. Annals of Agric. Sci., Moshtohor*, 47 (1):1-12.

Aiken, G.R, McKnight, D.M., Wershaw, R.L. and Mccarthy, P. (1985). Humic substances in soil, sediment and water. Wiley-Interscience, New York. U.S.A.

Ajithkumar, I.P., and Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. Under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(3): 587-595.

Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plant. *Agronomy Journal*, 23:112-121.

Ayas, H. and Gulser, F. (2005). The effect of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach. *Journal of Biological Sciences*, 5(6): 801- 804.

Barker, D.J., Sullivan, C.Y. and Moser, L.E. (1993). Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and proline in five forage grasses. *Agronomy journal*, 85(2): 270-275.

Basso, A.S., Miguez, F.E. Laird, D.A. Horton, R. and Westgate, M. (2013). Assessing potential of biochar for increasing water holding capacity of sandy soils. *Global Change Biology Bioenergy*, 5:132-143.

Bates, L.S., Waldren, RP, Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.

Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, 53: 185-194.

Bremner, J.M., and Mulvaney, C.S. (1965). Nitrogen-Total. In: *Methods of soil analysis: part 2, Chemical and Microbiological Properties*. Page, A. L. (Ed). 1982. Second Edition. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA. *Agronomy Series*, 9 (2): 596-622.

Burkowska, A. and Donderski, W. (2007). Impact of humic substances on bacterioplankton in eutrophic lake. *Polish journal of Ecology*, 55(1), 155-160.

Chen, H.X., Du, Z.L., Guo, W. and Zhang, Q.Z. (2011). Effects of biochar amendment on cropland soil bulk density, cation exchange capacity, and particulate organic matter content in the North China Plain. *The Journal of Applied Ecology*, 22: 2930-2934.

- David, P.P., Nelson, P.V. and Sanders, D.C. (1994). A humic acid improves growth of tomato seedling in solution culture. *J. Plant. Nutr.*, 17: 173-184.
- Deenik, J.L., McClellan, T., Uehara, G., Antal, M.J. and Campbell, S. (2010). Charcoal volatile matter content influences plant growth and soil nitrogen transformations. *Soil Science Society of America Journal*, 74: 1259-1270.
- Deenik, J.L., Diarra, A., Uehara, G., Campbell, S., Sumiyoshi, Y. and Antal, M.J. (2011). Charcoal ash and volatile matter effects on soil properties and plant growth in an acid Ultisol. *Soil Science*, 176: 336-345.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4: 215-223.
- Dole, J.M. and Wilkins, H.F. (2005). *Floriculture: Principles and Species*. Prentice Hall, USA, pp: 432-448.
- Edreva, A. (2005). The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(2): 135-146.
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S. M. A. Basra. 2009. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 185-212.
- Fernandez-Escobar, R., Benloch, M., Barranco, D., Duenas, A., and Guterrez Ganan, J.A. (1996). Response of olive trees to foliar application of humic substance extracted from leonardite. *Scientia Horticulturae*, 66: 191-200.
- Gomes, F.P., Oliva, M.A., Mielke, M.S., Almeida, A.A.F. and Aquino, L.A. (2010). Osmotic adjustment, proline accumulation and membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae*. 126: 379- 384.
- Good, A. and Zaplachinski, S. (1994). The effects of drought on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 90: 9-14.
- Guppy C.N, Menzies N.W, Moody P.W. and Blamey F.P.C (2005). Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: A review. *Soil Research*, 43, 189-202.
- Inal, A., Gunes, A., Sahin, O., Taskin, M.B. and Kaya, E.C. (2015). Impacts of biochar and processed poultry manure, applied to a calcareous soil, on the growth of bean and maize. *Soil Use and Management*, 31: 106-113.
- Jones, C.A., Jacobsen, J.S. and Mugaas, A. (2007). Effect of low-rate commercial humic acid on phosphorus availability, micronutrient uptake, and spring wheat yield. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(7-8): 921-933.
- Karakurt, Y., Unlu, H., Padem, H. (2008). The influence of foliar and soil fertilization humic acid on yield and quality of pepper. *Plant Soil Sci.*, 233-237.
- Kholova, J., Hasan, C.T.M., Khocova, M. and Vadie, V. (2011) Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pear millet exposed to drought. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, 71: 99-106.
- Kiani, S.P., Maur, P., Sarrafi, A. and Grieu, P. (2008). QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Science*. 175, 565-573.

- Laird, D.A., Fleming, P., Davis, D.D., Horton, R., Wang, B. and Karlen D.L (2010). Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. *Geoderma*, 158: 443-449.
- Lehmann, J., Czimnik, C., Laird, B. and Sohi, S. (2009). *Biochar for environmental management: science and technology*. London: Earthscan, pp: 183-264.
- Lehmann, J., Da Silva, J.P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W. and Glaser, B. (2003). Nutrient availability and leaching in an archaeological anthrosol and a ferralsol of the central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and Soil*, 249: 343–357.
- Lehmann, J. and Joseph, S. (2009). Biochar for environmental management- an introduction. In: Lehmann J. and Joseph S. (Eds). *Biochar for environmental management: Science and Technology*. Earthscan, London, pp. 1–11.
- Lotfi, R., GharaviKouchebagh, P. and Khoshvaghti, H. (2015). Biochemical and Physiological Responses of *Brassica napus* Plants to Humic Acid under Water Stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(4): 480–486.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G.A. and Panneerselvam., R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2): 141-149.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic press San Diego, USA.
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. London, 549-561. Hadidi A. 1999. Germination and early growth of tea common bean cultivars as affected by water stress and seedsize. *Direct Agricultural Science*, 26: 23-25.
- Martinsen, V., Mulder, J., Shitumbanuma, V., Sparrevik. M., Børresen, T. and Cornelissen, G. (2014). Farmer led maize biochar trials: Effect on crop yield and soil nutrients under conservation farming. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177: 681-695.
- Matysik, J., Alia, B., and Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5): 525-532.
- Muscolo, A., Sidari, M. and Nardi, S. (2013). Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical. Exploration*, 129: 57-63.
- Nardi S, D, Pizzeghello A. Muscolo and A. Vianello (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, 34: 1527-1536.
- Nayyar, H., Kaur, S., Kumar, S.S., Singh, K.J. and Dhir, K.K. (2005). Involvement of polyamines in the contrasting sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and soybean (*Glycine max*) to water deficit stress. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 46: 333-338.
- Nigussie, A., Endalkachew Kissi, E., Misganaw, M. and Ambaw, G. (2012). Effect of biochar application on soil properties and nutrient uptake of lettuces (*Lactuca sativa*) grown in chromium polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science*, 12(3): 369-376.
- Olarieta, J.R., Padrò, R., Masip, G., Rodríguez-Ochoa, R. and Tello, E. (2011). ‘Formiguers’, a historical system of soil fertilization (and biochar production?). *Agriculture, Ec osystemsand Environment*. 140: 1. 27-33.
- Pazuki, A., Asghari, J., Sohani, M., Pessarakli, M. and Aflaki, F. (2015). Effects of Some Organic Nitrogen Sources and Antibiotics on Callus Growth of *Indica* Rice Cultivars (PDF). *Journal of Plant Nutrition* 38 (8): 1231–1240. doi:10.1080/01904167.2014.983118. Retrieved June 4, 2016.

- Pettit, R.E. (2004). Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health [Online]. Available at [www.humate.info/mainpage.htm](http://www.humate.info/mainpage.htm).
- Rahdari, P. and Hoseini, S.M. (2012) Drought Stress: A Review. *Inter. J. Agron. Plant Prod.* 3: 10. 443-446..
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004). Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189- 1202.
- Rodriguez, M., Canales, E. and Borrás-Hidalgo, O. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biocnologia Aplicada*, 22: 1-10.
- Saki Nejad, T., Hossaini, S.M. and Hyvari, M. (2011). Calculate changes of bean germination process in the presence of various compounds of biological fertilizer Humic acid mixed with micro and macro elements. *Journal of American Science*, 7(6): 1014-1021.
- Salehi, S.P. (2003). Isozyme diversity of peroxidase, leucine aminopeptidase and glutamate oxaloacetate transaminase of *Fagus orientalis* Lipsky in beech forests of Iran: 1-15.
- Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premachandra, G.S. and Fujita, K. (2004). Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 131–138.
- Serrano, R., Cullianz-Macia, F. and Moreno, V. (1999). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 78:261-269.
- Sharif, M., Khattak, R.A. and Sarir, M.S. (2002). Effect of different levels of lignitic coal drive humic acid on growth of maize plants. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 33: 3567-3580.
- Standard methods for the examination of water & wastewater , 3030 -21st Edition, (2005)
- Sun, Z., Bruun, E.W., Arthur, E., De Jonge, L.W., Moldrup, P., Hauggaard-Nielsen, H. and Elsgaard, L. (2014). Effect of biochar on aerobic processes, enzyme activity, and crop yields in two sandy loam soils. *Biology and Fertility of Soils*, 50:1087-1097.
- Tan, K.H. (2003). *Humic Matter in Soil and the Environment*. Marcel Dekker, New York
- Vieira, R.D., Teerony, D.M. and Egli, D.B. (1991). Effect of drought stress on soybean seed germination and vigor . *J. Seed Technol.*, 16: 12-21.
- Warnock, D.D., Lehmann, J., Kuyper, T.W. and Rillig, M.C. (2007). Mycorrhizal responses to biochar in soil– concepts and mechanisms. *Plant and soil*, 300: 1. 9-20.
- Zhu, X. and Gong, H.G. (2005). Different soluble levels in two spring wheat cultivars induced by progressive field water stress at different development stages. *Journal of Arid Environments*, 62: 1-14.

## The application of Biochar with Humic acid for increasing of resistance to drought stress in *Zinnia*

S. Keshavarz Fard<sup>1</sup>, M. Solgi<sup>2\*</sup>, H. Bagheri<sup>3</sup>, I. Shahrjerdi<sup>4</sup>

Received:2019.2.8

Accepted:2019.12.7

### Abstract

Application of Humic acid and Biochar added to the soil, could be used as an effective way to reduce the harmful effects of drought stress in *Zinnia elegans*. The effects of three factors: Biochar (three levels 0, 20 and 40 g / kg of potting soil), Humic acid (three levels 0, 250 and 500 mg / L, soluble) and two irrigation levels (50 and 100% crop capacity) were studied in this experiment. According to the results, drought stress reduced the amount of Chlorophyll, Phosphorus and Potassium contents of leaves, but increased amount of Carotenoids, ion leakage, Proline, Nitrogen and Magnesium elements. The use of Biochar increases Potassium and ion leakage. Humic acid reduced the content of proline in the studied plants, and reducing the drought stress in the studied plants. The effect of application of Biochar and Humic acid on the amount Chlorophyll and total Chlorophyll, nitrogen and Phosphorus showed significant difference. The use of Humic acid causes drought stress control and its use under drought stress conditions is recommended. The use of Biochar is advisable in the Phosphorus and Nitrogen deficiencies.

**Keywords:** Biochar, Drought stress, Humic acid, *Zinnia elegans*.

---

1-MSc of Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University

2-Assistant Professor, Department of Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University

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

3-Master of Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University

4-Master of Horticultural Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University



## Content

<b>Evaluation of the efficiency of Landscape Function Analyze (LFA) to Estimate Plant diversity in Kiasar rangeland of Mazandaran province of Iran</b> S. M.Ehsani , R. Tamartash, G. Heshmati , E. Sheidai Karkaj.....	23
<b>Study of inhibition potential of synthetic Bis-Indole compounds on amyloid fibrillation by molecular simulation methods</b> K.Khodayari, P.Abdolmaleki .....	45
<b>Investigation of increase of citric acid produced by <i>Aspergillus niger</i> native mutant strains</b> S. M. R. Khoshroo.....	60
<b>Study on the plant species diversity along an altitudinal gradient in Nova Mountain, Kermanshah</b> M. M. Dehshiri.....	74
<b>Application of response surface methodology in optimization of selenate bioreduction to selenium nanoparticles by <i>Bacillus</i> sp. Strain TR-6</b> A. S. Razavi , P. Tajer-Mohammad-Ghazvini, J. Hamed.....	88
<b>The effect of <i>Beauveria bassiana</i>-treated <i>Trialeurodes vaporariorum</i> on the development, longevity and oviposition rate of the predatory mite, <i>Amblyseius swirskii</i></b> M. Seiedy .....	99
<b>Improving salt resistance of safflower (<i>Carthamus tinctorius</i> L.) through growth regulators: salicylic acid and penconazole</b> F.Shaki ,H. Ebrahimzadeh. Maboud, V. Niknam .....	119
<b>Study of environmental factors affecting the characteristics of <i>Pyrus syriaca</i> Boiss. in Zarddalan forest, Ilam province of Iran</b> H. Fathi, J. Hosseinzadeh.....	128
<b>In vitro mutation breeding of <i>Tamarix aphylla</i> to increas Cd tolerance and accumulation</b> P. Karimi , M. Taghizadeh, M. Solgi .....	148
<b>The application of biochar with humic acid for increasing of resistance to drought stress in <i>Zinnia</i></b> S.Keshavarz Fard, M.Solgi,H. Bagheri,I. Shahrjerdi, .....	175

Journal of Applied Biology  
Spring2020

**Alzahra University - Vice Chancellery for Research**

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

**Chief Editor: A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University**

**Editorial Boards**

**F. Eftekhar, Associate Professor of Shahid Beheshti University**

**M. Pakravan, Associate Professor of Alzahra University**

**Z. Minochehr, Associate Professor of Tehran University**

**N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences.**

**P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University**

**M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University**

**T. Falsafi Momughani, Professor of Alzahra University**

**A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University**

**Executive Manager: Sh. Borjian**

**Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research**

**English& Persian Editor: Banafsheh Mohamadi**

**Printing and Binding: Graduate Publishing**

**Circulation: 10 copies**

**Publication Frequency: Quarterly**

**Price: 10000 Rls**

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

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

**Tel/Fax:021- 85692205**

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

**ISSN: 1607- 9884**

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