



مجله زیست‌شناسی کاربردی

تابستان ۱۳۹۹

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

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

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

اعضای هیأت تحریریه

دکتر فرشته افتخار، دانشیار دانشگاه شهید بهشتی

دکتر منیژه پاکروان، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران

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

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر طاهره فلسفی ممقانی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عذرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار فارسی و انگلیسی: 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

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

۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

Email: Oolomepaieh@gmail.com

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

هدف

مجله تخصصی زیست شناسی 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 زیست شناسی 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 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 جدول‌ها 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)، اسال 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

سیستماتیکی 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 نازک درج شود. اعداد زیرنویس در هر صفحه از عدد ۱ آغاز شوند.

- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). در صورتی که منبع مورد استفاده دو نگارنده داشته باشد، نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001). در منابع با بیش از دو نگارنده، تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه et al. و سپس سال انتشار ذکر شود (Fernandes et al., 2001). در متن مقاله می‌توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953) معتقد است..... و یا به اعتقاد شیمی و همکاران (Shimi et al., 2005).

- et al. واژه‌ای لاتینی است و حتما باید ایتالیک و به نقطه ختم شود.

- متن مقاله با نرم افزار Microsoft Word 2007 و با پسوند doc.* تهیه شود.

- مقاله به صورت الکترونیک روی کاغذ سفید به ابعاد $21 \times 29/7$ سانتی‌متر (A^4) با حاشیه $2/5$ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن $1/5$ (به جز جداول، شکل‌ها و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم شماره گذاری شود و در هر صفحه شماره خط نوشته شود.

- تعداد صفحات قابل قبول مقاله، حداکثر ۱۵ صفحه می‌باشد. شماره هر صفحه در وسط و پایین صفحه و با قلم نازنین معمولی و فونت ۱۲ باشد.

- قلم فارسی مورد استفاده، نازنین و قلم انگلیسی Times New Roman باشد. منظور از قلم توپر، Bold و قلم نازک، غیر Bold است.

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

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

تدوین مقاله با شرح جزییات

- عناوین (اختیاری)، منابع و Abstract انگلیسی.

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

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

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

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

اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، 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 پاوری

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

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

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

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

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

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

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

- نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها

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

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

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

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

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

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

- جدول با ۳ خط افقی رسم شود. (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول) و 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 حتماً به علائم جداکننده و ویرایشی توجه شود.

نشریات

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

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

ب) با دو نویسنده:

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

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

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

کتاب

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

ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار)، نام کتاب، ذکر تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک استو سپس شهر محل انتشار.

Ahrens, W.H. (1994) Herbicide Handbook. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America Pp 224 . los Angeles.

ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، 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://vegghome.ucdavis.edu/faculty/michelmores/projects/summary.htm>. Accessed August 23, 2001.

-استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه htm ختم شود.

تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

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

- وقتی مقاله‌ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات ، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.
- در پایان نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که براساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به عنوان الگو استفاده نمایند.

اثر آنتی‌بیوتیک، ساکارز و زغال فعال بر کنترل آلودگی باکتریایی، اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن در کشت مریستم انتهایی
نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)

معصومه اسکندری، پیام پورمحمدی، خلیل عالمی سعید..... ۹

تکثیر سلول های U937 میکروکپسوله شده در بیوراکتور همزده خارجی

یونس بیگی خسروشاهی، مریم حسینی..... ۲۰

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌های *Punctelia borrieri* و *Ramalina peruviana*، *Leptogium saturninum*

فائزه حمزه خانی، پریسا محمدی، عذرا صبور..... ۳۳

ویژگی‌های بوم‌شناختی، تشریحی، ریخت‌شناختی و ریزریخت‌شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia* (Caryophyllaceae) بومی خاک‌های گچی سمنان، ایران

فاطمه ربیع زاده..... ۴۶

بررسی اثر نانوذرات سیلیکون بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی بنه های زعفران

بهاره زارع، خدیجه کیارستمی، منیر حسین زاده نمین، منا صراحی نوبر..... ۶۲

بررسی اثر بتائین بر اختلال حافظه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در مدل آلزایمری ناشی از تزریق درون
هیپوکمپی پروتئین آمیلوئید بتا

فاطمه علی پور فرد، هومن شجعی، فرزانه نظری سرنجه، ویدا حجتی، مسعود علیرضایی..... ۷۸

بررسی خصوصیات آنزیم پراکسیداز و تهیه نانوذره پروتئینی از آن با روش محاسباتی و آزمایشگاهی

شیما فولادبند، پریناز قدم، محبوبه ضرابی..... ۹۰

بررسی دوریختی جنسی در شکل پاهای انبرکی اول و دوم و پای دمی سوم گونه *Parhyale darvishi* (Momtazi and Maghsoudlou, 2016) بر اساس تکنیک‌های ریخت‌سنجی هندسی

یگانه لایقی، علی اکبر باقریان یزدی، فرزانه ممتازی..... ۱۱۱

ترسیب کربن با کربنیک آنهیدراز نوترکیب در باکتری *Ralstonia eutropha*

محدثه محسن پور، نور امیرمظفری، زهرا نورمحمدی، شیوا ایرانی..... ۱۲۳

بررسی مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و خواص بیولوژیکی قارچ طاقچه‌ای *Cerrena unicolor* جمع‌آوری شده از

جنگل‌های ارسباران

سعید ملائی، مصطفی عبادی..... ۱۳۹

اثر آنتی بیوتیک، ساکارز و زغال فعال بر کنترل آلودگی باکتریایی، اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن در

کشت مریستم انتهایی نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)

معصومه اسکندری^۱، پیام پورمحمدی^{۲*}، خلیل عالمی سعید^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶

چکیده

در این تحقیق تأثیر آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل بر آلودگی باکتریایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما مورد بررسی قرار گرفت همچنین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های این گیاه ارزیابی شد. در بخش اول این آزمایش مریستم انتهایی ساقه نخل خرما رقم استعمران، در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف آنتی بیوتیک‌های کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم قرار گرفتند. در آزمایش دوم تأثیر سطوح مختلف ساکارز ($g L^{-1}$ ۵۰، ۴۰ و ۳۰) و سطوح زغال فعال ($g L^{-1}$ ۲ و ۵/۰) بر روی اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های مریستم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در تیمار $100 mg L^{-1}$ کلرآمفنیکل کمترین میزان آلودگی وجود دارد و با افزایش غلظت آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل در محیط کشت، قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها افزایش می‌یابد و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در محیط کشت حاوی $100 mg L^{-1}$ سفوتاکسیم و $100 mg L^{-1}$ کلرآمفنیکل رخ می‌دهد.، نتایج همچنین نشان داد غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز تفاوت معناداری از نظر القای اندام‌زایی کالوس‌ها با یکدیگر ندارند، ولی در غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز میزان اندام‌زایی به‌طور مشخصی کاهش یافت. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود. غلظت $100 mg L^{-1}$ آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل علاوه بر کاهش میزان آلودگی باکتریایی، منجر به افزایش معنی دار قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها نیز نمی‌شود. همچنین غلظت‌های بالای ساکارز منجر به کاهش اندام‌زایی در کشت بافت خرما می‌شود.

واژه‌های کلیدی: استعمران، کشت بافت، ریزازدیدی.

مقدمه

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
*(نویسنده مسئول: Mohammadi@asnruk.ac.ir)
۳- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک‌لپه از تیره Arecaceae، چندساله، دیپلوپید ($2n=36$)، دوطایه، دگرگشن و همیشه سبز است (Al-Khayri & Naik, 2017). در حال حاضر ۲۱ درصد خرماي جهان از ایران تأمین می‌شود. در سال ۱۳۹۷ ایران با سطح زیر کشت بیش از ۲۵۰ هزار هکتار و با تولید بالغ بر ۱۲۵ هزار تن یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان خرما در جهان بود. که از این سطح ۸۴ درصد را درختان بارور و ۱۶ درصد را گیاهان غیر بارور تشکیل می‌دهند. خرما در بین محصولات باغی کشور از نظر سطح زیر کشت رتبه پنجم را دارد و از نظر تولید ۷/۲ درصد کل محصولات باغی را شامل می‌شود (Ahmadi et al, 2019).

تکثیر خرما از طریق جنسی و رویشی صورت می‌گیرد. دانه‌های نخل به آسانی رشد می‌کنند، اما نیمی از نهال‌ها ممکن است نر باشند و به دلیل هتروزیگوت بودن خرما، نتاج به شدت هتروژن می‌باشند و نسبت بالایی از آنها کیفیت انتخابی خوبی ندارند. علاوه بر این، نر یا ماده بودن نهال‌های بذری ۶ تا ۱۰ سال بعد از کاشت مشخص می‌شود (Othmani et al., 2009). تکثیر رویشی خرما با استفاده از پاجوش، باعث انتقال پاتوژن‌های بیماری‌زا و حشرات می‌شود، که باعث کم شدن باروری آن می‌شود. به علاوه، تولید پاجوش در یک دوره خاص از عمر درخت (۱۰ تا ۱۵ سال پس از کاشت) صورت می‌گیرد و در هر درخت تعداد محدودی پاجوش (۲۰ تا ۳۰ عدد) تولید می‌شوند. برای غلبه بر مشکل تکثیر، میزان کم زنده‌مانی پاجوش‌ها و نگهداری خزانه‌ی ژنی، ریزازدیادی تکنیک موفقیت آمیزی است؛ همچنین تنها تکنیکی است که گیاه عاری از بیماری، یکنواخت و با کیفیت جهت کشت در مقیاس وسیع و در یک دوره زمانی کوتاه را فراهم می‌کند (Khan & Bibi, 1971).

آلودگی باکتریایی یکی از مشکلات مهم در کشت بافت خرما است و باعث آلودگی و از بین رفتن درصد بالایی از ریزنمونه‌ها می‌گردد. حذف و کاهش آلودگی باکتریایی به وسیله ضد عفونی سطحی آسان نیست و تشخیص منبع آلودگی مشکل است (Al-Dosary et al., 2011; Al-Mussawi, 2010). استفاده از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت یکی از راهکارهای پیشگیری از آلودگی باکتریایی در محیط کشت بافت خرما می‌باشد (Al-Mayahi et al., 2010). آنتی‌بیوتیک‌های نیستاتین، گریزوفولون و استرپتومایسین، آموکسی‌سیلین، جنتامایسین و کلرآمفنیکل در کشت بافت خرما استفاده شده اند.

(Al-Kaby, 2006 ; Al-Dosary et al., 2011).

منبع کربن به عنوان تامین‌کننده انرژی و عامل اسمزی برای رشد گیاهان در شرایط درون شیشه به کار می‌رود (Lipavska & Konradova, 2004). ساکارز، گلوکز، مالتوز، گالاکتوز و سوربیتول منابع کربوهیدرات مورد استفاده در کشت بافت می‌باشند. اغلب از ۲-۵ درصد ساکارز در کشت بافت استفاده می‌شود و به طور متوسط برای کشت بافت نخل خرما از ۳ درصد ساکارز استفاده می‌شود (Al-Khalifah & Shanavaskhan, 2012).

قهوه‌ای شدن به دلیل تغییرات فیزیولوژیکی درون بافت‌های کشت شده رخ می‌دهد که منجر به قهوه‌ای شدن تدریجی و سرانجام مرگ بافت می‌شود. قهوه‌ای شدن بافت در اثر ترشح مواد پلی‌فنلی به محیط از محل برش و سپس اکسیدشدن آن‌ها

به وسیله‌ی آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز صورت می‌گیرد که در مرحله اول موادی به نام کوئینین‌ها تشکیل می‌شوند که برای بافت سمی می‌باشد. در نهایت این مواد به ملانین‌ها که رنگ قهوه‌ای تیره یا سیاه دارند، تبدیل می‌شوند (Al-Khayri & Naik., 2017). عوامل متعددی منجر به افزایش قهوه‌ای شدن بافت در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. از جمله این عوامل نور و سطح بالای تنظیم‌کننده‌های رشد سنتتیک مانند 2,4-D و BAP است (Baharan *et al.*, 2015). این تحقیق با اهداف تعیین بهترین غلظت از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرامفنیکل به منظور کنترل آلودگی باکتریایی و بررسی اثر آن‌ها بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های مریستم انتهایی خرما صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

پاجوش‌های استعمران، به وزن ۳-۵ کیلوگرم، از پایه‌ی مادری از خزانه ارقام نخل خرما در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در ابتدای اسفند ماه جدا شدند. پس از جداسازی بافت‌های چوبی، نمونه به مدت یک ساعت با آب شهری به همراه چند قطره شوینده شسته شد. بعد از برش رأس ساقه و جدا سازی منطقه مریستم رأسی (طول ۶-۵ سانتی‌متر)، ریزنمونه‌ها با آب مقطر شسته و در محلول آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک و اسید سیتریک با نسبت $75:75 \text{ mg L}^{-1}$ (Khan & Bi Bi, 2012) به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند، سپس سترون‌سازی نمونه‌ها به صورت زیر انجام شد. ابتدا قطعات جداگشت به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و پس از یک بار شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم $5/25$ درصد قرار گرفتند و سپس شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر استریل شده ۳ بار و هر دفعه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تمامی مراحل سترون‌سازی و کشت در زیر هود لامینار انجام شد. نمونه‌ها پس از مراحل استریل به مدت ۵ دقیقه در محلول 2 g L^{-1} بنومیل اتوکلاو شده قرار گرفتند. pH محیط‌های کشت با استفاده از 1 M NaOH و 0.1 N HCl روی $5/8$ تنظیم شد و در دمای 121°C در فشار 15 psi و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. کشت‌ها در شرایط تاریکی و در دمای $25 \pm 1^\circ \text{C}$ نگهداری شدند و واگشت و انتقال نمونه‌ها به محیط جدید با تیمارهای مشابه قبل با فاصله ۳ هفته‌ای انجام شد. ریزنمونه‌ها به مدت ۸ هفته در شرایط تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به دوره‌ی روشنایی $8/16$ ساعت (روشنایی/تاریکی) منتقل گردیدند. مشاهده و یادداشت برداری با فاصله ۷ روز یکبار تکرار شد.

تیمار آنتی‌بیوتیک

پس از انجام مراحل سترون‌سازی و قبل از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت، هر نمونه در محلول آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در سه سطح (0 ، 50 ، 100 mg L^{-1}) و سفوتاکسیم در سه سطح (0 ، 50 ، 100 mg L^{-1})، به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و پس از جدا کردن لایه‌های خارجی باقیمانده، مریستم‌های راسی جدا شدند و در محیط کشت پایه MS به همراه g L^{-1}

40 g L^{-1} ساکارز، 8 g L^{-1} آگار-آگار، 0.5 g L^{-1} زغال فعال، آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید با نسبت mg L^{-1} $75:75$ ، تنظیم‌کننده‌های رشد شامل 1 mg L^{-1} NAA و 3 mg L^{-1} BAP و 3 mg L^{-1} 2IP (Khan & Bi Bi, 2012) و اعمال تیمارهای آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل در 3 سطح (0 ، 50 ، 100 mg L^{-1}) و سفوتاکسیم در 3 سطح (0 ، 50 ، 100 mg L^{-1})، کشت گردیدند.

تیمار ساکارز و زغال فعال

پس از انجام مراحل سترون‌سازی و جدا کردن لایه‌های خارجی باقیمانده، مریستم راسی حاصل از ریزنمونه به چهار قسمت تقسیم شد و پس از آن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید با نسبت $75:75 \text{ mg L}^{-1}$ IBA، 2 mg L^{-1} 2IP، 5 mg L^{-1} آگار-آگار، ساکارز در سه سطح (0 ، 40 و 30 g L^{-1}) و زغال فعال در دو سطح (2 g L^{-1} و 0.5) کشت شدند.

آنالیز آماری

مشاهده و بررسی نمونه‌ها به منظور اطلاع از آلودگی باکتریایی، قهوه‌ای شدن و اندام‌زایی یک هفته بعد از کشت شروع شد و با فاصله ۷ روز یک‌بار تکرار شد و درصد آلودگی باکتریایی کشت‌ها در هفته هشتم محاسبه و ثبت شد. برای صفت آلودگی، تعداد ریزنمونه آلوده شده در هر تکرار مورد شمارش قرار گرفت. در مورد صفت قهوه‌ای شدن، یادداشت برداری به‌صورت کیفی انجام گرفت، به این صورت که به بالاترین میزان قهوه‌ای شدن عدد ۱۰ و به کمترین میزان قهوه‌ای شدن عدد صفر داده شد. برای صفت اندام‌زایی، تعداد نوساقه و تعداد ریشه‌چه تولید شده در هر ریزنمونه مورد شمارش قرار گرفت. بررسی‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی، در ۳ تکرار انجام شد که هر تکرار شامل ۲ ریزنمونه بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS انجام شد و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (LSR) استفاده شد.

نتایج

آزمایش آنتی‌بیوتیک

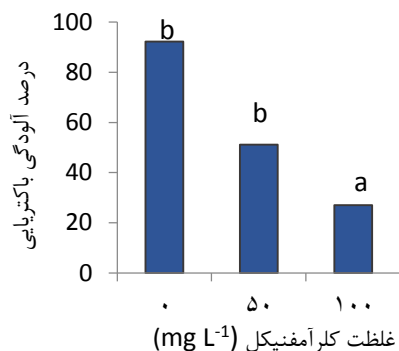
تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد؛ بین سطوح مختلف کلرآمفنیکل از نظر کنترل آلودگی باکتریایی تفاوت معنی‌داری وجود دارد اما بین سطوح مختلف سفوتاکسیم و اثر متقابل بین کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم تفاوت معنی‌دار نیست. اثر غلظت‌های مختلف کلرآمفنیکل بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، در سطح احتمال ۵ درصد و همچنین اثر غلظت‌های مختلف سفوتاکسیم و اثر متقابل این دو آنتی‌بیوتیک بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در سطح ۱ درصد معنادار است.

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل بر کنترل آلودگی باکتریایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در کشت بافت نخل خرما.

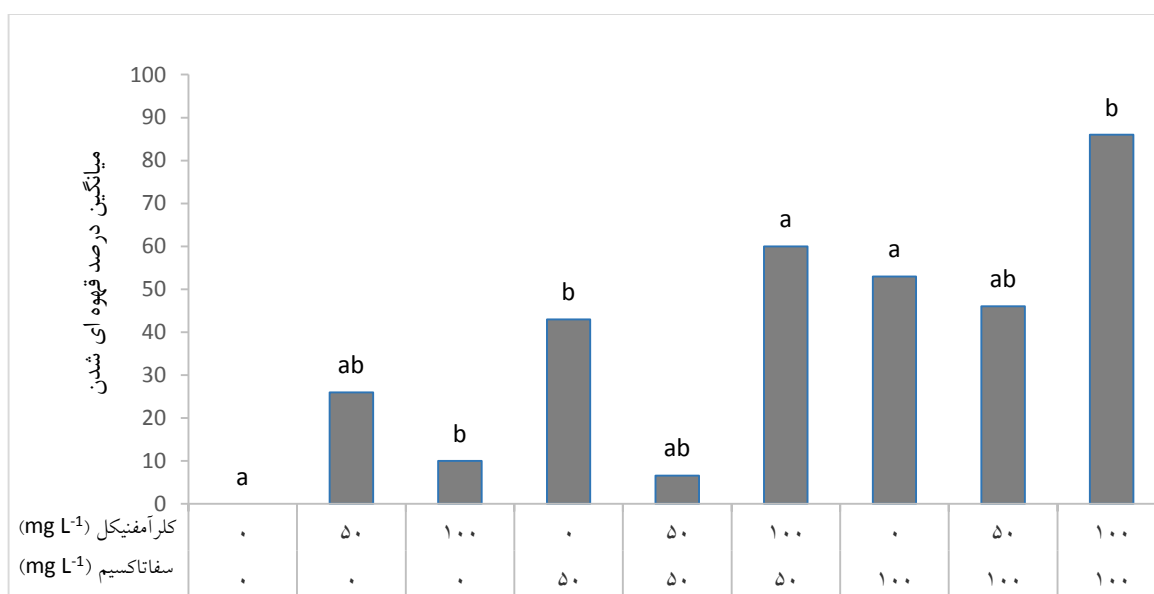
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان آلودگی	قهوه‌ای شدن
کلرآمفنیکل	۲	۹۵/۸۱**	۱۶/۲۵*
سفوتاکسیم	۲	۱/۱۵ ^{ns}	۵۶/۲۵**
کلرآمفنیکل × سفوتاکسیم	۴	۳/۵۹ ^{ns}	۱۲/۶۴**
خطا	۱۸	۱۱/۷۴	۲/۷۷

** - معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، * - معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ns - غیر معنی‌دار

مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف کلرآمفنیکل بر روی آلودگی باکتریایی (نمودار ۱) نشان داد در تیمار 100 mg L^{-1} کلرآمفنیکل کمترین میزان آلودگی وجود دارد. مقایسه میانگین اثر متقابل تأثیر تیمارهای کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم بر روی قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها (نمودار ۲) نیز نشان داد؛ با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل در محیط کشت، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها افزایش می‌یابد و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در محیط کشت حاوی 100 mg L^{-1} سفوتاکسیم و 100 mg L^{-1} کلرآمفنیکل رخ می‌دهد. همچنین در سطح صفر mg L^{-1} سفوتاکسیم تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل در میزان قهوه‌ای شده مشاهده نشد. بر این اساس به نظر می‌رسد؛ اضافه کردن آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به محیط کشت همراه با آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل یا بدون آن، منجر به افزایش قهوه‌ای شدن بافت می‌شود. از طرفی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم تا سطح 100 mg L^{-1} تأثیر معنی‌داری بر کنترل آلودگی نیز نداشت. با توجه به این نتایج، استفاده از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود. غلظت 100 mg L^{-1} از آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل علاوه بر کالوس‌زایی و کاهش میزان آلودگی باکتریایی به میزان قابل قبول، منجر به افزایش معنی‌دار قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها نیز نمی‌شود (شکل ۱).



نمودار ۱: مقایسه تأثیر سه سطح آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل بر روی میزان آلودگی باکتریایی ریزنمونه مریستم نخل خرما با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل و سفوناکسیم بر روی درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه مریستم نخل خرما. میانگین‌های دارای حروف مشابه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

این نتایج با نتایج Al-Dosary و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند؛ استفاده از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین، جنتامایسین و کلرآمفنیکل کارایی زیادی برای پیشگیری از آلودگی باکتریایی در کالوس‌زایی خرما دارد مطابقت دارد آنها همچنین نشان دادند بهترین نتیجه در تیمار ۵۰ mg L⁻¹ کلرآمفنیکل به دست آمد که از رشد باکتری‌های باسیلوس، استفیلوکوکوس و پروتئوس پیشگیری کرد. در پژوهش دیگری نشان داده شد غوطه‌ور کردن بافت‌های آلوده در محلول آنتی‌بیوتیک قبل از استریل آن‌ها و استفاده از بافت‌های جوان خرما در کشت بافت می‌تواند آلودگی باکتریایی را کاهش دهد (Benjama et al., 2001).



شکل ۱: کالوس‌زایی مریستم انتهایی در خرما در محیط کشت حاوی 100 mg L^{-1} کلرآمفنیکل

آزمایش ساکارز و زغال فعال

آزمایش نشان داد اثر ساکارز به تنهایی بر اندام‌زایی ریزنمونه‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ولی اثر آن بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها معنی‌دار نیست. علاوه بر این اثر زغال فعال و همچنین اثرات متقابل دوجانبه ساکارز در زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها معنی‌دار نیست (جدول ۲).

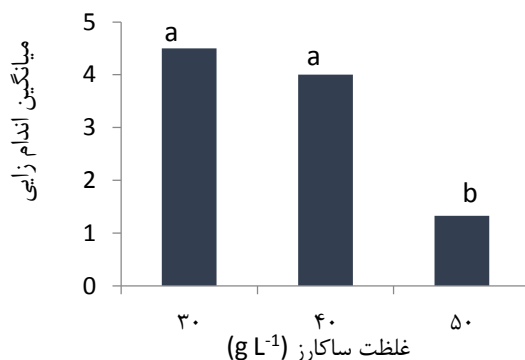
مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر اندام‌زایی ریزنمونه‌ها نشان داد؛ غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز تفاوت معناداری با یک‌دیگر ندارند اما غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به دو غلظت دیگر تفاوت معناداری مشاهده شد و میزان اندام‌زایی به‌طور مشخصی کاهش یافت (نمودار ۳ و شکل ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در کشت بافت نخل خرما.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		اندام‌زایی	قهوه‌ای شدن
ساکارز	۲	۱۹/۰۵۰**	۷/۱۰۸ ^{ns}
زغال فعال	۱	۲۳/۱۷ ^{ns}	۰/۰۹۲ ^{ns}
ساکارز×زغال فعال	۲	۷/۰۹۰ ^{ns}	۲/۲۶۱ ^{ns}
خطا	۱۱	۲/۸۳۹	۳/۵۸۸

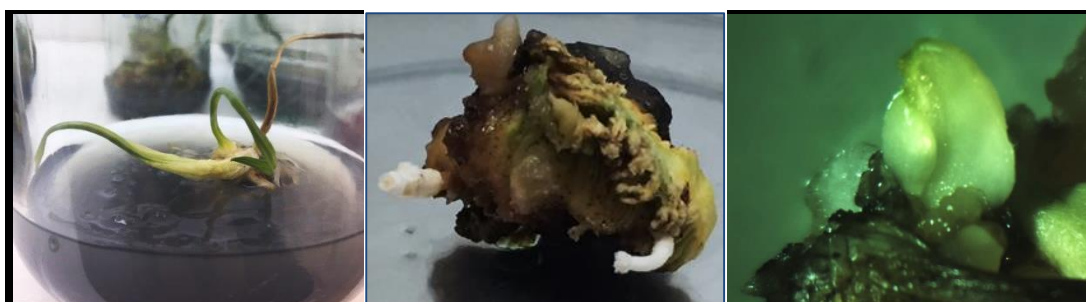
^{ns} غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

Al-Khateeb (۲۰۰۸) نشان داده بود؛ ۳۰ تا ۵۰ گرم قند به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت برای رشد کمی و کیفی نوساقه‌ها کافی است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. گرچه تفاوت معنی‌داری بین مصرف ۰/۵ گرم در لیتر و ۲ گرم در لیتر زغال فعال دیده نشد؛ اما می‌توان گفت این نتیجه تا حدی با نتایج Othmani و همکاران (۲۰۰۹) که مصرف ۰/۳ گرم زغال فعال را کافی دانسته بودند، مطابقت دارد ولی ظاهراً با نتایج Tisserat (۱۹۸۴) که مصرف ۳ گرم زغال فعال را برای کاهش قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه‌ها لازم دانسته بود، مطابقت ندارد. ممکن است دلیل این اختلاف، تفاوت رقم مورد آزمایش باشد.



نمودار ۳: مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر اندام‌زایی ریزنمونه مریستم نخل خرما با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

در گزارش دیگری تأثیر منابع مختلف کربن (ساکارز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز) و غلظت‌های مختلف آن‌ها در تکثیر خرما رقم خنیزی به روش اندام‌زایی مستقیم در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد افزایش غلظت قند سبب افزایش در وزن خشک گیاهان تولید شده گردید و اثر گلوکز، فروکتوز و مالتوز با اثر ساکارز به عنوان منبع کربن در کشت بافت خرما برابر بود (Al-Kaby, 2004).



شکل ۲: اندام‌زایی ریزنمونه مریستم انتهایی خرما در غلظت ۳۰ g L⁻¹ ساکارز و ۵۰۰ mg L⁻¹ زغال فعال

مشخص شده که سیتریک اسید، آسکوربیک اسید و زغال فعال در تعامل مثبت با هم بوده و اثر مثبت بر زنده ماندن ریزنمونه‌های خرما دارند. آسکوربیک اسید به عنوان ممانعت کننده از اکسیداسیون فنول‌ها عمل کرده و کوئینین تشکیل شده را خارج می‌کند. احتمالاً سیتریک اسید به عنوان عامل کلاته کننده عمل کرده و تخریب آسکوربیک اسید را با تاخیر می‌اندازد (Khan & Bibi, 1971). اثرات مثبت زغال فعال در از بین بردن ترکیبات مهارکننده است، همچنین باعث کاهش شدید اکسیداسیون فنول‌ها می‌شود. استفاده از ۰/۳ g L⁻¹ زغال فعال باعث افزایش قدرت زیست ریزنمونه‌ها در برگ نابالغ خرما شده است (Othmani *et al.*, 2009) و منجر به افزایش اثر اکسین در محیط کشت، تغییر خواص محیط کشت در جهت کاهش جذب تنظیم‌کننده‌های رشد و دیگر ترکیبات می‌شود (Khan & Kauser, 2011). در مطالعه دیگری کاربرد ۳ g L⁻¹ زغال فعال در محیط کشت، صرفاً منجر به کاهش اکسیداسیون فنول‌ها شد (Tisserat, 1984).

کشت بخش‌های گیاهی در فصل زمستان و بهار و افزودن زغال فعال به محیط کشت می‌تواند این پدیده را کاهش دهد (Al-Khateeb, 2008). همچنین اسکورییک اسید پیش از تیمارهای ضدعفونی سطحی و کشت روی محیط MS دارای ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، بهترین روش برای جلوگیری از این پدیده گزارش شده است (Taha et al., 2007). Othmani و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی کشت بافت یک رقم خرما، برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن، از ریز نمونه‌های جوان استفاده کردند. آن‌ها گزارش دادند که بیشترین ترکیبات قهوه‌ای کشنده، در مرحله‌ی ابتدای کشت تولید می‌شود که به دلیل اکسید شدن ترکیبات فنولیک و تجمع کوئینین‌ها که برای بافت سمی محسوب می‌شود.

فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازها (مؤثر در اکسیداسیون ترکیبات فنلی و تانن‌ها) در شرایط نور بیشتر از تاریکی است. با افزودن زغال فعال (غلظت بین ۰/۲ تا ۳ درصد وزن به حجم) و آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط کشت از تولید این ترکیبات ممانعت می‌شود. معمول‌ترین مواد آنتی‌اکسیدانت سیتریک اسید و آسکوربیک اسید هستند که معمولاً با غلظت $50-150 \text{ mg L}^{-1}$ استفاده می‌شوند. این ترکیبات پتانسیل ردوکس (اکسایش-احیا) ریزنمونه را کاهش داده و از اکسیداسیون فنل‌ها جلوگیری می‌کنند (Al-Khayri & Naik, 2017).

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه نتایج بدست آمده استفاده از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود و mg 100 L^{-1} از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل علاوه بر کاهش میزان آلودگی باکتریایی به میزان قابل قبول، منجر به افزایش معنی دار قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها نیز نمی‌شود. همچنین غلظت‌های بالای ساکارز منجر به کاهش اندام‌زایی در خرما می‌شود.

منابع

- Ahmadi, k., Ebadzade, H.R., Hatami, F., Hoseinpour, R., Abdeslah, H. (2019) Iran agriculture statistics, pages 51-52. Iran Ministry of Agriculture-Jahad (Farsi Edition).
- Al-Dosary, N.H., Al-Mussawi, M.A. and Al- Taha, H.A. (2011). Isolation and identification of bacterial types that cause contamination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus and studying the inhibition activities of some plant extracts and antibiotics. Basra Journal of Date Palm Research, 10(1):68-81.
- Al-Kaby, A.M.S. (2004). The effect of some antibiotics and fungicides on the growth of embryogenic callus of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Basra Journal of Date Palm Research, 3(1/2): 97-110.
- Al-Khalifah, N.S. and Shanavaskhan, A.E. (2012). Micropropagation of Date Palms. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA). P: 54.
- Al-Khateeb, A. (2008). Regulation of in vitro bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. Bioresource Technology 99: 6550-6555.
- Al-Khayri, J.M. and Naik, P.M. (2017). Date palm micropropagation: advances and applications. Ciênc Agrotechnology, 41(4):347-358.

- Al-Mayahi, A.M., Ahmed, A.N. and Al-Khalifa, A.A. (2010). Isolation and identification of associated fungi with the micropropagation of five different date palm cultivars and the effect of Benlate fungicides in their control. *Basra Journal of Date Palm Research*, 9(2):79-97.
- Al-Mussawi, M.A. (2010). The source of bacterial contamination of date palm *Phoenix dactylifera* L. tissue cultures. *Basra Journal of Date Palm Research*, 9(2):132-146.
- Baharan, E., Mohammadi, P.P., Shahbaziand, E. and Hosseini, S.Z. (2015). Effects of some plant growth regulators and light on callus induction and explants browning in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* leaves culture. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5 (4): 1473-1481.
- Benjama, A., Cherkaoui, B. and Al-Maii, S. (2001). Origin and detection of *Bacillus* contaminating date palm *in vitro*-culture and importance of manipulations conditions. *Al Awamia*, 104: 73-74.
- Khan, S. and Bi Bi, T. 2012. Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) CV. Dhakki as a Means of Micropropagation. *Biotechnology Division, Pakistan Journal of Botany* 44: 1965-1971.
- Khan, S. B., Saeed and Kauser, N. (2011). Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 233-242.
- Khan, S.B. and Kauser, N. (2011). Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 233-242.
- Lipavska, H. and Konradova, H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 40: 23-30.
- Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N. and Trifi, M. (2009). *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). *Journal of Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23: 1181-1185.
- Taha, H. S., Hasan, M. M., and El-Bahr, M. K. (2007). Micropropagation of same egyptian date palm dry cultivars: 1-Maturation of somatic embryos. *Arab Journal of Biotechnology*, 10: 333-340.
- Tisserat, B. (1984). Propagation of date palms by shoot tip cultures. *Horticulture Science*, 19:230–231.

The effect of the antibiotic, sucrose and activated charcoal on bacterial contamination, browning and organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) meristem culture

M. Eskandari¹, P. Pour Mohammadi^{2*}, Kh. Alami Saeid³

Received: 2019.6.16

Accepted: 2020.1.6

Abstract

In the current study, the effect of antibiotic on bacterial contamination and browning in *in vitro* condition and effect of different concentration of sucrose and activated charcoal in organogenesis and browning date palm explants were investigated. In first experiment, apex meristems of date palm (*Phoenix dactylifera*) cv. Estamaran were cultured in media containing two types of antibiotics (cefotaxime and chloramphenicol) at 3 different concentrations (0, 50, or 100 mg L⁻¹). In the second experiment effect of different concentration of sucrose (30, 40 and 50 g L⁻¹) and 2 concentration of activated charcoal (0.5 and 2 g L⁻¹) on organogenesis and explant browning were studied. Result showed that minimum bacterial contamination accrued in 100 mg L⁻¹ chloramphenicol in the medium. The maximum browning occurred in medium contain 100 mg L⁻¹ cefotaxime and 100 mg L⁻¹ chloramphenicol. In second experiment shoot regeneration was enhanced when sucrose concentration was used at 30 or 40 g L⁻¹, but 50 g L⁻¹ of sucrose reduce that. Also the use of 0.5 g L⁻¹ and 2 g L⁻¹ activated charcoal was not significantly different to reduce the browning of explants. This result developed an initial protocol for micropropagation of date palm. The type and concentration of antibiotic and sucrose concentration were found to have significant effect on organogenesis and browning of explants. Treatment with higher levels of antibiotic (especially cefotaxime) increased browning. This successful protocol would facilitate the vegetative propagation, conservation, and genetic engineering of this species.

Keywords: Estamaran, Tissue culture, Micropropagation.

1-M.Sc. of plant breeding, Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

2-Assistant Prof. of Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
*(Corresponding Author : Mohammadi@asnrukh.ac.ir)

3-Associate Prof. of Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

تکثیر سلول های U937 میکروکپسوله شده در بیوراکتور همزده خارجی

یونس بیگی خسروشاهی^{۱*}، مریم حسینی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

استفاده وسیع سلول های بنیادی برای کاربردهای درمانی، نیاز به تولید مکرر تعداد زیادی از سلول ها با خصوصیات مناسب تحت شرایط کنترل شده در بیوراکتورها دارد. در این تحقیق سلول های U937 به عنوان مدلی از سلول های بنیادی شناور در داخل میکروکپسول های آلژینات-ژلاتین با دانسیته سلولی 1×10^6 Cells/ml قرار گرفتند. میکروکپسول ها در دو بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و ستونی حبابدار کشت داده شدند. نتایج بدست آمده افزایش $9/2 \pm 0/9$ سلول ها در راکتور پرفیوژن با همزن خارجی را نشان داد در حالی که به دلیل تنش بالا قادر به رشد مناسب در راکتور ستونی حبابدار نبودند. نتایج بدست آمده، تایید کننده مناسب بودن میکروکپسول های آلژینات-ژلاتینی جهت تکثیر سلولهای بنیادی در سیستمهای دینامیک می باشد. برای این منظور بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با کاهش تنش برشی و پخش بهتر اکسیژن، محیط همگن و مناسبتری را برای رشد و تکثیر سلول ها ایجاد می نماید.

واژه های کلیدی: بیوراکتور پرفیوژن، بیوراکتور ستونی حبابدار، تکثیر هدفمند سلول های بنیادی خونساز، لوپ

همزن خارجی، میکروکپسول.

مقدمه

سلول های بنیادی نقش بسیار مهمی در کاربردهای پزشکی ایفا می کنند. بنابراین کشت این سلول ها و افزایش آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. در میان روش های مختلف برای کشت، سیستم های کشت ساکن مثل تی فلاسک برای گسترش سلول های خونساز بیشتر استفاده می شود (Collins et al., 1998b; Meissner et al., 1999). ولی این سیستم ها محدودیت هایی از نظر شیب های غلظتی از قبیل pH، مصرف اکسیژن و تجمع متابولیت ها در محیط کشت دارند. به علاوه، شرایط محیطی در آن نمی تواند به صورت آنلاین کنترل شود. در نتیجه استفاده از بیوراکتورها زمانی که تعداد زیاد سلول ها و یا دانسیته ی بالای سلول مطلوب باشد، مورد نیاز است (Papoutsakis, 1991).

۱- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

* (نویسنده مسئول: y.beygi@azaruniv.ac.ir)

۲- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

بیوراکتورهای همزن دار برای کشت سلول های حیوانی و میکروبی بسیار مناسب هستند و می توانند بسیاری از مشکلات سیستم کشت ساکن مثل گرادیان غلظت، تکرارپذیری کمتر، بررسی های مکرر که منجر به آلودگی می شود، نمونه گیری و کنترل شرایط کشت را بر طرف نمایند (Zandstra et al., 1994 Apperley, 1994;). زانسترا و همکارانش کشت های سوسپانسیونی همزن دار را بررسی کرده و شروع به کشت سلول های خونی گرفته شده از مغز استخوان کردند. مقدار غلظت ماده ی تلقیحی $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ بود که بعد از ۴ هفته حدود ۲۲-۷ برابر افزایش پیدا کردند (Eaves & Zandstra, 1997). اما از سوی دیگر همزن در محیط کشت تنش برشی ایجاد می کند (King & Miller, 2007). به طوریکه می تواند برای سلول های حساس به تنش آسیبزا باشد (Nielson, 1999 Apperley, 1994;).

از سوی دیگر، تثبیت سلولی می تواند جهت حفاظت سلول ها در مقابل شرایط محیطی از قبیل تنش های احتمالی و نیل به دانسیته ی سلولی بالاتر نسبت به حالت آزاد و افزایش سطح قابل اتصال، به کار برده شود. این روش برای اولین بار توسط کارل در سال ۱۹۲۳ معرفی شد (Carrel, 1923). بعد از آن روش های مختلفی از قبیل به دام انداختن سلول در داخل ذره و کپسوله کردن سلول داخل ژل برای تثبیت سلولی به کار گرفته شد (Alizadeh et al., 2017).

میکروکپسولاسیون روشی برای قرار دادن مواد فعال بیولوژیکی در داخل میکروکره های نیمه تراوا با قطر بین ۰/۲ تا ۳ میلیمتر است (Carrel, 1923; Chang, 1995). میکروکپسول ها باید بتوانند انتقال اکسیژن خالص و مواد مغذی به داخل کپسول را انجام دهند. در نتیجه تعداد مواد شیمیایی مورد استفاده برای کپسوله کردن سلول ها دارای محدودیت می باشند. بهترین ماده برای تهیه ی ماتریکس، پلی ساکاریدهای طبیعی می باشد. در میان آن ها سدیم آلژینات به دلیل توانایی تشکیل هیدروژل های انعطاف پذیر در حضور کاتیون های دوظرفیتی در دمای محیط بیشترین استفاده را دارد (Lewińska et al., 2008). اساس همه ی روش های آماده سازی میکروکپسول ها ریختن محلول آلژیناتی در داخل حمامی حاوی کاتیون های دو ظرفیتی است (Lewińska et al., 2008). ترکیب درصد بهینه از ژلاتین ۱/۲ درصد و آلژینات ۰/۹۶ درصد برای تهیه میکرو کپسولها جهت تکثیر سلولهای بنیادی ارائه شده است (Alizadeh et al., 2017).

از سوی دیگر برای افزایش سلول ها نیاز به استفاده از بیوراکتورها می باشد. ولی به دلیل پیچیده تر بودن سیستم، هنوز تأثیر پارامترهای مختلف بر روی کشت سلول های بنیادی خونساز به خوبی مشخص نشده است. در این میان نحوه تأمین اکسیژن یکی از پارامترهای مهم در طراحی بیوراکتورها می باشد و میزان هوادهی برای بیوراکتورهای مختلف جهت حفظ سلول ها در حالت زنده متفاوت می باشد (Tondreau et al., 2015). آزمایش های زیادی در زمینه ی مسمومیت سیستم در غلظت های بالای اکسیژن، کمبود اکسیژن در غلظت های پایین و تأثیر غلظت اکسیژن در مهار رشد سلول ها انجام شده است. غلظت های پایین اکسیژن تمایز و تکثیر بیشتری از جمعیت سلولی را نتیجه می دهد (Danquah, 2011). در حالی که در غلظت های متوسط نرخ های تولید افزایش می یابد (Apperley, 1994). همچنین محیط با محدودیت اکسیژن به طور قابل توجهی غلظت اکسید

نیتريک، پراکسيد هيدروژن و راديکال اکسيژن را کاهش می دهد که اين مواد به عنوان مهارکننده ی تکثير سلولی شناخته شده اند (Eibl et al., 2008). بيشترين آسیب در ابتدای بيوراکتور در محل هوادهی و در انتهای بيوراکتور، یعنی هنگام تشکیل کف می باشد. بنابراین استفاده از آنتی فوم و همچنين اشباع ساز می تواند در کاهش آسیب سلولی موثر باشد (Eibl et al., 2008). ترکيدن حباب ها در سطح آزاد مهمترين عامل مرگ و مير سلول ها مخصوصا در بيوراکتورهای ایرلیفت می باشد (Xueliang et al., 2020). حباب هایی که منفجر نشده اند به سادگی از میان سیال عبور می کنند و شرایط تنش بالا که منجر به مرگ سلول ها می شود، به وجود نمی آورند (King & Miller, 2007). برای غلبه بر اين مشکل، در صورت بروز تلاطم سايز حباب ها بايد کوچک باشد و در نتیجه برای حداقل کردن تنش برشی منفجر نشوند. بنابراین، میزان هوادهی و نیز جدا کردن محیط کشت حاوی سلول ها از سیستم های اکسيژن رسانی می تواند راه حل بسیار مفیدی باشد.

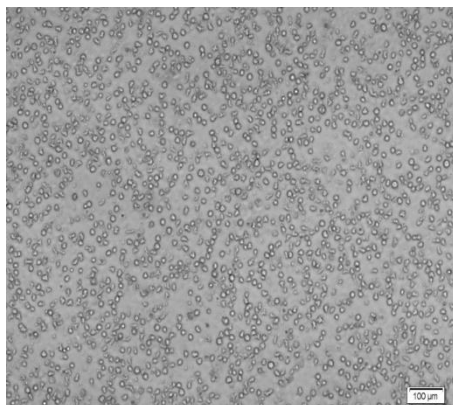
با توجه به اين امر طراحی بيوراکتور نسبتا ساده ای که بر روی سلول ها تاثیر زیادی نداشته باشد، می تواند به عنوان یک هدف مناسب مورد توجه قرار گیرد. یکی از اين سیستم ها، بيوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی (PCESCT) با عملکرد و نحوه کنترل بسیار ساده می باشد. اين بيوراکتور با کاهش تنش برشی و پخش بهتر اکسيژن، محیط همگن و مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول ها ایجاد می نماید.

بنابراین در اين تحقيق، در ابتدا سلول های U937 در درون میکروکپسول ها با ترکیب درصد بهينه گزارش شده در مراجع قرار گرفتند. در ادامه میکروکپسول ها در درون راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و همچنين راکتور ستونی حبابدار (B.C) قرار گرفته و تکثیر شدند. در نهایت میزان رشد سلول ها در دو نوع بيوراکتور در درصدهای مختلف اکسيژن بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش ها

سلول های بنیادی و محیط های مربوط

از سلول های U937 (خط سلول ميلوبلاستی سرطان خون) در سیستم تی فلاسک و بيوراکتور توسعه یافته به عنوان سلول های مشابه با سلول های بنیادی خونساز، استفاده شد. کار با آن ها به دليل داشتن مراحل شناخته شده ی تمایز و نیاز داشتن به سایتوکین برای رشد و تمایز، بسیار آسان است و هیچ مسائل اخلاقی مرتبط با استفاده از آن ها وجود ندارد. شکل (۱) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول های U937 مورد استفاده را نشان می دهد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های U937

جهت نگهداری سلول‌های U937 از محیط کشت RPMI 1640 (Invitrogen) با ۱۰٪ FBS (Invitrogen) استفاده شد. این محیط کشت از مواد ذکر شده در جدول (۱) با مقادیر مشخص تهیه شد.

جدول ۱: مقادیر مواد تشکیل دهنده محیط کشت مربوط به سلول‌های U937

نوع ماده	حجم اضافه شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر
RPMI 1640	۸۹ میلی‌لیتر
FBS	۱۰ میلی‌لیتر
پنسیلین G	۱ میلی‌لیتر

آماده سازی میکروکپسول

آلژینات سدیم (مرک) (۲٪) در محیط عاری از بافر بدون کلسیم (مرک) (CF-KRH) و با pH برابر با ۷/۴ به مدت یک شب، با استفاده از یک همزن در هود لامینار، حل گردید. ژلاتین (۵٪) در CF-KRH حل شده و سپس با اتوکلاو استریل شد و به محلول آلژینات برای تهیه مخلوط مورد نظر از آلژینات و ژلاتین اضافه شد. سپس میکروکپسول‌ها با استفاده از یک روش انعقاد الکترواستاتیک با کمک ولتاژ بالا فراهم شده از منبع تغذیه (VitaTeb، ایران) آماده شد. ولتاژ کاربردی، سرعت جریان اکسترودر و فاصله سوزن از حمام ۸ kV، ۰/۱۲۵ cc/min و ۶ سانتیمتر به ترتیب در نظر گرفته شد. قطر میکروکپسول‌ها با استفاده از نرم افزار BELView 6.2 مشاهده گردید که دارای قطر متوسط 200 ± 600 میکرومتر بودند.

بیوراکتورهای پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و راکتور ستونی حبابدار

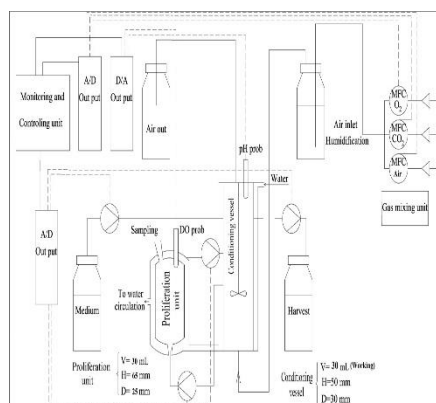
بیوراکتور ستونی حبابدار و راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی به عنوان سیستم دینامیک برای تکثیر هدفمند سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از میکروکپسول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. این سیستم شامل سیستم کنترلی pH و همچنین اکسیژن می‌باشد. دمای سیستم نیز توسط سیرکولاتور آزمایشگاهی (سهند آذر) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کنترل شد.

تصویر راکتور آزمایشگاهی و شمایی از راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی آن، در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. قسمت تکثیر سلولی (پرفیوژن) از تانک همزده جدا شد تا تنش وارده از طریق همزن به سلول ها وارد نشود. قسمت پرفیوژن، یک سیستم جداره با ظرفیت ۳۰ میلی لیتر با قطر داخلی ۲۵ میلی متر و ارتفاع ۶۵ میلی متر می باشد. قسمت همزن خارجی یک تانک دو جداره با حجم کاری ۳۰ میلی لیتر با قطر داخلی ۳۰ میلی متر و ارتفاع ۵۰ میلی متر و مجهز به یک سنسور pH می باشد. حجم کلی کاری سیستم راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی برابر با ۶۰ میلی متر می باشد. بیوراکتور همزده بر روی سیستم همزن شامل مگنت یک سانتی متر قرار گرفته و اختلاط با دور همزن ۳۰ دور بر دقیقه صورت گرفت. محیط کشت بین دو قسمت سیستم راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی بوسیله پمپ پرستالتیک در حال چرخش می باشد و این دو قسمت بوسیله غشای با سایز ۸ میکرومتر از همدیگر جدا شده اند.



شکل ۲: بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی راه اندازی شده در آزمایشگاه

بیوراکتور ستونی حبابدار با حجم کاری ۲۰ میلی لیتر، قطر محفظه ی داخلی بیوراکتور ۱/۵ سانتی متر، ارتفاع ۱۵ سانتی متر و سوراخ های پخش کننده ۳۰۰ میکرومتر طراحی و ساخته شده است. جهت استریل کردن سیستم تمامی قسمت های بیوراکتور در داخل اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. قبل از شروع آزمایشات تمامی قسمت های هر دو بیوراکتور بوسیله آب دیونیزه دو بار و بوسیله محیط کشت یکبار شستشو داده می شود.



شکل ۳: شمای بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی

هوای ورودی شامل مخلوطی از گازهای CO_2 , N_2 , O_2 با شدت هوادهی ثابت ۱ vvm / ۰ بوسیله کنترل های هوا (MFC) تنظیم می شد. مخلوط کردن گازهای ورودی به نحوی انجام می شد که در شدت هوادهی ثابت، گاز ورودی حاوی مقدار ثابت ۵٪ CO_2 و غلظت های اکسیژن ۵، ۱۰ و ۲۱٪، بسته به غلظت اکسیژن مورد نظر باشد. مخلوط گاز ورودی پس از عبور از اشباع ساز وارد بیوراکتور می گردید. تعویض محیط کشت داخل سیستم بوسیله پمپ پرستالتیک بعد از استراحت دو ساعته سیستم در هر ۲۴ ساعت صورت می گرفت و در هر سری تعویض محیط میزان ۵۰٪ محیط خارج شده و محیط جدید جایگزین می شود. در گام اول با توجه به اطلاعات مقالات pH داخل سیستم بوسیله اسید و باز رقیق تنظیم شد. ولی با توجه به حساس بودن سلول ها به pH و احتمال تغییرات ناگهانی آن هنگام تزریق اسید یا باز، تزریق گاز CO_2 به سیستم برای کنترل pH بر روی ۷/۲ استفاده شد.

شمارش سلولی و تعیین درصد زیستایی سلول

برای تعیین تعداد سلول ها از لام نئوبار استفاده گردید. برای تعیین میزان زیستایی سلول به ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی درون یک میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر تریپان بلو اضافه شده و خوب مخلوط می شد. رنگ جذب سلول های زنده نمی شود و شفاف می ماند، در حالی که رنگ جذب سلول های مرده می شود. بعد از اضافه شدن تریپان بلو در عرض ۳ تا ۵ دقیقه باید شمارش انجام شود، در غیر این صورت مرگ سلولی آغاز می شود و شمارش زیستایی کاهش می یابد. تعداد کل سلول ها و تعداد سلول های زنده شمرده شد. درصد سلول های زیستا از تقسیم تعداد سلول های شفاف بر تعداد کل سلول ها بدست می آید. در پایان لام نئوبار با الکل تمیز شده و در الکل ۷۰٪ تا استفاده ی بعدی قرار داده می شد. جهت شمارش تعداد سلول ها در داخل هر کدام از میکروکپسول ها، میکروکپسول ها با استفاده از محلول ۱۰۰ میلی مولار سدیم تری سیترات حل شده و سلول ها آزاد شدند. سپس تعداد سلول های زنده به ازای هر میکروکپسول محاسبه شد.

نتایج و بحث

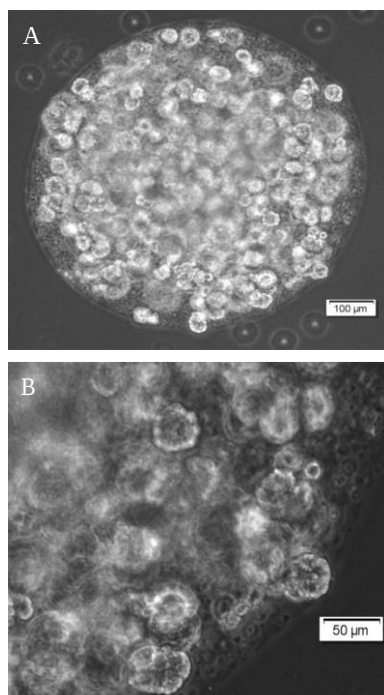
در این قسمت از تحقیق، سلول های U937 که رفتار مشابهی با سلول های بنیادی خونساز دارند، انتخاب و قبل از تلقیح به داخل راکتورها در داخل میکرو کپسول ها قرار گرفتند. بدیهی است که رشد سلول ها متأثر از تنش برشی، هوادهی و همچنین میزان اکسیژن می باشد. بنابراین برای کنترل تنش برشی، سلول ها در داخل میکروکپسول های پلیمری قرار داده شدند و بیوراکتورها در شدت هوادهی ثابت و درصدهای مختلفی از اکسیژن هوادهی شدند. در ابتدا رشد این سلول ها در بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی مورد بررسی قرار گرفته و سپس با نتایج مربوط به بیوراکتور ستونی حبابدار به صورت خوراک دهی ناپیوسته متوالی مورد مقایسه قرار گرفت.

استفاده از میکروکپسول ها جهت تکثیر سلولهای بنیادی

با توجه به مطالعات صورت گرفته میکرو کپسول های آلژینات- ژلاتین به عنوان بهترین ترکیب برای تهیه میکرو کپسول ها انتخاب شدند. در تهیه میکروکپسول های آلژینات-ژلاتینی؛ درصد آلژینات، ژلاتین و نوع محلول ژلاسیون از پارامترهای موثر بر رشد سلولی می باشد. وجود آلژینات برای ایجاد محیط سه بعدی ضروری است، و همچنین به یک مقدار بهینه از آلژینات نیاز است تا بتوان ژلاتین موجود در میکروکپسول را در داخل محیط سه بعدی حفظ کرد. در مورد ژلاتین نیز، از آنجایی که این ماده هیچ پیوندی با یون های کلسیم و باریم نمی دهد، تاثیری در میزان سفتی میکروکپسول ها ندارد. برعکس وجود ژلاتین برای کاهش میزان سفتی میکروکپسول ها مورد نیاز است و وجود آن باعث بهبود رشد سلولی می شود.

رشد سلولی در مقادیر بدست آمده از نتایج مقالات برای مقادیر ژلاتین و آلژینات مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تکثیر سلول های U937 به عنوان مدل برای سلول های بنیادی خونساز در نظر گرفته شد. از آنجایی که سلول های U937، سلول های شناور هستند، هرچه محیط سه بعدی میکروکپسولی به یک محیط مایع نزدیک تر باشد رشد این سلول ها آسانتر خواهد بود. غلظت بهینه آلژینات و ژلاتین به ترتیب ۰/۹۶ و ۱/۲ با توجه به نتایج مراجع انتخاب شد (Alizadeh et al., 2017). از سوی دیگر میکروکپسول ها باید به اندازه ای کوچک باشند که بتوانند انتقال جرم مناسبی از مواد مغذی و اکسیژن را تامین کنند. با توجه به نتایج ارائه شده در مراجع بهترین قطر میکروکپسول ها برای سلول های بنیادی خونساز سایز ۶۰۰ میکرومتر می باشد که با اعمال ولتاژ ۸ کیلوولت و فاصله ۶ سانتی متر سر سوزن با محلول حاوی باریم و غلظت بهینه آلژینات و ژلاتین به ترتیب ۰/۹۶ و ۱/۲ بدست می آید (Alizadeh et al., 2017).

سلول ها در داخل میکروکپسول ها رشد خوبی را نشان دادند. تعداد سلول های کپسوله شده پس از ۷ روز به میزان $9/8 \pm 1/5$ برابر در داخل فلاسک افزایش یافت. میکروکپسول ها با دانسیته سلولی برابر در فلاسک و هر دو نوع بیوراکتور کشت داده شد. فلاسک نیز در داخل انکوباتور حاوی CO₂ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. میزان سلول ها در ابتدای فرایند برابر $2/5 \times 10^6$ سلول به ازای هر میلی لیتر محلول در هنگام تزریق توسط دستگاه می باشد. رشد سلول ها در داخل میکروکپسول ها در بزرگنمایی های مختلف در مقیاس های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومتر در شکل (۴) نشان داده شده است. با توجه به تصاویر مشخص است که کلونی هایی از سلول ها در داخل میکروکپسول ها بوجود آمده است. بنابراین از نظر کیفی این امر نشانگر محیط مناسب میکروکپسول ها برای تبادل مواد، اکسیژن و دی اکسید کربن و تکثیر سلول ها می باشد.



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپی رشد سلول‌ها در میکروکپسول‌های کشت داده شده در تی فلاسک در روز هفتم در مقیاس های (A) ۱۰۰ و (B) ۵۰ میکرومتر

بررسی رشد و تکثیر سلول‌های کپسوله شده در بیوراکتورها

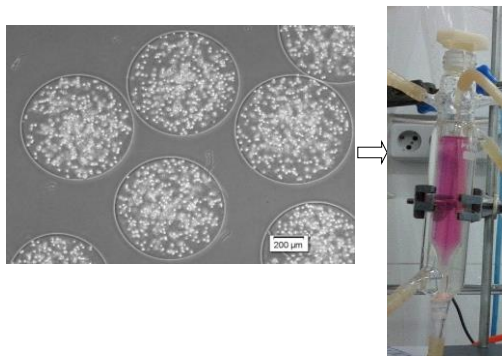
در این تحقیق از سیستم کشت بیوراکتور ستونی حبابدار به صورت خوراک‌دهی ناپیوسته متوالی و شامل جریان چرخشی در اثر هوادهی (شکل ۵) و بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی استفاده گردید.

در ادامه میکروکپسول‌های حاوی سلول‌های U937 در این بیوراکتورها کشت داده شدند. این آزمایش با دو مرتبه تکرار انجام شد. میزان افزایش سلولی در هر میکروکپسول در بازه‌های زمانی ۳، ۵ و ۷ روز، مورد بررسی قرار گرفت.

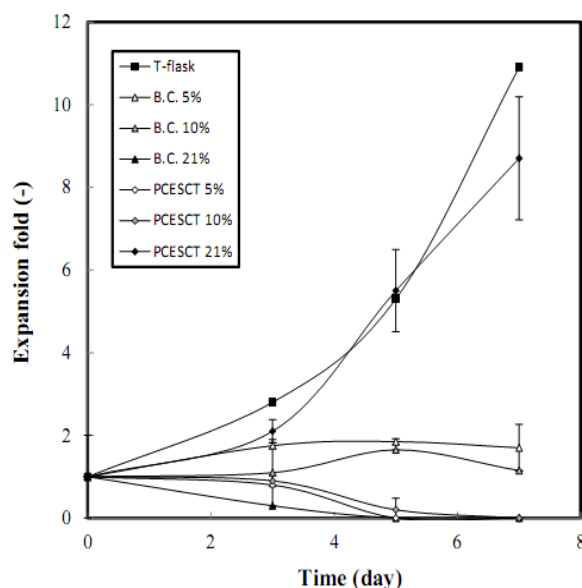
بیوراکتورها در هوادهی ثابت ۱ vvm و درصدهای مختلف اکسیژن (۵٪، ۱۰٪، ۲۱٪) هوادهی شده و تاثیر میزان

اکسیژن و تنش وارده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده شده در شکل (۶) اهمیت تاثیر تنش و اکسیژن با درصدهای

ذکر شده را در تکثیر و عدم تکثیر سلول‌ها نشان می‌دهد.



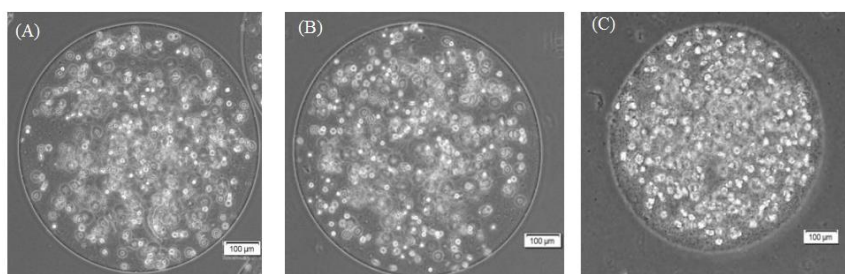
شکل ۵: تصویر بیوراکتور ستونی حبابدار و میکروکپسول ها



شکل ۶: میزان رشد سلول ها در سیستم های مختلف با درصدهای مختلف اکسیژن (B.C. بیوراکتور ستونی حبابدار، PCEST بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی در درصدهای مختلف هوادهی اکسیژن و T-flask مربوط به سیستم فلاسک استاتیک)

همانطور که در شکل (۶) نشان داده شده است، در داخل بیوراکتور ستونی حبابدار وقتی هوادهی با ۲۱٪ اکسیژن انجام گرفت پس از یک روز هیچ سلول زنده ای یافت نشد در حالیکه وقتی این میزان به ۱۰٪ کاهش پیدا کرد تعداد سلول ها تقریباً برابر با مقدار اولیه بود. در نهایت هوادهی با ۵٪ اکسیژن انجام شده و تعداد سلول ها پس از ۵ روز به ۱/۷ برابر مقدار اولیه رسید.

در داخل بیوراکتور پرفیوژن، هوادهی در قسمت بالای قسمت همزن خارجی انجام گرفت. هنگام هوادهی با ۲۱٪ اکسیژن تکثیر سلول ها قابل مقایسه با سیستم استاتیک بود. ولی در ترکیب درصد هوای ۱۰٪ و ۵٪ هیچ گونه افزایشی برای سلول ها مشاهده نشد. از نظر آماری نیز موارد ذکر شده با استفاده از روش تی تست چک شده تفاوت بین میزان هوادهی با ۲۱٪ با هر کدام از ۱۰٪ و ۵٪ تفاوت معنی داری با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ داشت. در شکل (۷) نیز رشد سلول ها در داخل میکروکپسول ها در بیوراکتورهای مختلف با درصدهای مختلف اکسیژن نشان داده شده است. تصاویر تایید کننده نتایج شمارش سلولی می باشند.



شکل ۷: تصاویر میکروسکوپی روند رشد سلول ها در بیوراکتورهای (A) ستونی حبابدار با ۵٪ اکسیژن (B) ستونی حبابدار با ۱۰٪ اکسیژن و (C) بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با ۲۱٪ اکسیژن بعد از ۷ روز کشت

یکی از عوامل مهمی که کاربرد بیوراکتورهای همزن دار مکانیکی را محدود می کند تنش بالای وارده به سلول از طریق پروانه همزن می باشد. در بیوراکتورهای ستونی- حبابدار و ایرلیفت که عمل اختلاط در اثر حرکت حباب های هوا درون مایع صورت می گیرد نیز تنش موجود مانع رشد سلول ها می شود.

از سوی دیگر فراهم کردن مقدار مطلوب اکسیژن در داخل بیوراکتور حائز اهمیت می باشد. علت اصلی کاهش تعداد سلول ها و کم بودن میزان افزایش سلولی در غلظت های بالای اکسیژن، مسمومیت سیستم می باشد. در بیوراکتور حبابدار با وارد کردن مستقیم جریان هوا میزان اکسیژن در راکتور افزایش می یابد. از سوی دیگر با معرفی مستقیم جریان هوا به داخل راکتور تنش زیادی نیز به سلول ها وارد می شود. این در حالی است که در بیوراکتور پرفیوژن غلظت اکسیژن در قسمت بالای لوپ خارجی در ۲۱، ۱۰ و ۵٪ تنظیم می گردید. بنابراین غلظت اکسیژن در راکتور پرفیوژن به مراتب کمتر از مقادیر متناظر آن در قسمت همزده می باشد. از سوی دیگر تنش کمتری به دلیل جدا بودن محفظه همزده به سلول ها وارد می شود. میزان افزایش سلولی در ورودی اکسیژن ۲۱٪ برابر $9/9 \pm 9/2$ بود. رشد بالا در این غلظت اکسیژن به دلیل فراهم آمدن غلظت مناسب اکسیژن در داخل بیوراکتور پرفیوژن در هوادهی قسمت همزده با اکسیژن ۲۱٪ بود. عدم رشد در غلظت های پایینتر ۱۰٪ و ۵٪ به دلیل کم بودن غلظت اکسیژن در این غلظت ها می باشد. این در حالی است که در بیوراکتور ستونی حبابدار در هوادهی با ۲۱٪ اکسیژن، از یک سو بر اثر غلظت اکسیژن بسیار بالا و از سوی دیگر به دلیل تنش زیاد سلول ها زنده نمی ماندند. ولی با کاهش این میزان به ۱۰٪ تعداد سلول ها تقریباً برابر با مقدار اولیه و با هوادهی حاوی ۵٪ اکسیژن تعداد سلولها پس از ۵ روز به ۱/۷ برابر مقدار اولیه رسید. در حالی که در راکتور پرفیوژن در غلظت های ۱۰٪ و ۵٪ اکسیژن در قسمت بالای لوپ خارجی اکسیژن کافی در دسترس سلول ها را فراهم نخواهد نمود. نتایج بدست آمده برای بیوراکتور پرفیوژن با ۲۱٪ اکسیژن از نظر آماری با بیوراکتور ستونی حبابدار در هوادهی با ۲۱٪، ۱۰٪ و ۵٪ اکسیژن تفاوت معنی داری با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ را داشته و تفاوت دو بیوراکتور نیز از نظر آماری مورد تایید قرار گرفت.

بنابراین با مقایسه رشد سلول ها در دو راکتور می توان نتیجه گرفت که اکسیژن و تنش از عوامل بسیار مهم تاثیر گذار بر میزان رشد سلولی می باشند. میزان رشد کمتر در راکتور ستونی حبابدار در مقایسه با راکتور پرفیوژن با همزن خارجی نشان می دهد که تاثیر تنش، حتی با وجود رشد سلول ها در میکروکپسول ها، پارامتر بسیار مهمی در انتخاب نوع راکتور می باشد.

نتیجه گیری

هدف این تحقیق کاهش تنش برشی وارد شده به سلول ها با استفاده از میکرو کپسول ها می باشد. سلول های U937 به عنوان نمونه سلول های بنیادی خونساز در دو بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و بیوراکتور ستونی حبابدار به صورت

خوراکدهی ناپیوسته متوالی در درصدهای مختلف اکسیژن کشت داده شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان اکسیژن و تنش وارده از پارامترهای موثر بر رشد سلولی می باشند. علاوه بر آن، بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با تنش کمتر محیط مناسبتری را برای رشد سلول ها از خود نشان داد. همچنین نتایج نشان دادند که کشت سلول ها در داخل این بیوراکتور در مجاورت اکسیژن ۲۱٪ دارای تفاوت قابل توجهی با سیستم استاتیک می باشد.

منابع

- Alizadeh Sardroud H, Nemati S, Baradar Khoshfetrat A, Nabavinia M, Beygi Khosrowshahi Y. (2017) Barium-crosslinked alginate-gelatin microcapsule as a potential platform for stem cell production and modular tissue formation. *J Microencapsul.* 34 (5):488-497.
- Apperley J.M., (1994) Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 14: 187-96.
- Carrel, A. (1923) A method for the physiological study of tissues in vitro. *J. Ex. Med.* 38 :407-418.
- Chang, T. M. (1995) Artificial cells with emphasis on bioencapsulation in biotechnology. *Biotechn. ann. rev.* 1 : 267-295.
- Lewińska, D., Bukowski, J., Kożuchowski, M., Kinasiewicz, A. and Weryński, A. (2008) Electrostatic microencapsulation of living cells. *Biocybern. Biomed. Eng.* 28 :69-84.
- Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T. and Miller, W.M. (1998b) Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* 14 (3): 466–472.
- Danquah, M.K. (2011) Process challenges relating to hematopoietic stem cell cultivation in bioreactors. *Bio. Eng. lab.* 38: 761-767.
- Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G. and Czermak, P. (2008) *Cell and Tissue Reaction Engineering.* Springer.
- King, J.A. and Miler, W.M. (2007) Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 394-398.
- Meissner, P., Schroder, B., Herfurth, C. and Biselli, M. (1999) Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Cytotechnology.* 30: 227–234.
- Nielson. L.K. (1999) Bioreactors for hematopoietic cell culture. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 129-159.
- Papoutsakis, E.T. (1991) Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends Biotechnol.* 9 (12): 427-437.
- Tondreau MY., Laterreur V., Gauvin R., Vallières K., Bourget J.M., Lacroix D., Tremblay C., Germain L., Ruel J. and Auger F.A., (2015) Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater.* 18:176-85.

- Xueliang L.,Guoqiang Z., Xinrui Z., Jingwen Z., Guocheng D., Jian C., (2020) A conceptual air-lift reactor design for large scale animal cell cultivation in the context of in vitro meat production. Chemical Engineering Science., 211(16): 115269.
- Zandstra, P.W., Eaves, C.J. and Piret, J.M., (1994) Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. Biotechnology (NY). 12: 909–914.
- Zandstra, P.W., Eaves, C.J. and Piret, J.M., (1997) Cellular determinants affecting the rate of cytokine depletion in cultures of human hematopoietic cells. Biotechnol. Bioeng. 54: 58-6.

Ex vivo expansion of micro capsulated U937 cells in an external stirred bioreactorY. Beygi Khosrowshahi^{1*}, M. Hosseini²

Received: 2019.8.1

Accepted: 2020.4.22

Abstract

The wide use of stem cells for therapeutic applications requires frequent production of a large number of cells with proper characteristics under controlled conditions in bioreactors. In this study, U937 cells were introduced as a model of floating stem cells inside alginate-gelatin microcapsules with a cell density of 2.5×10^6 cells/ml. The results showed very good growth of microcapsules inside the flask. Microcapsules were cultured in two different bioreactors with different concentrations of oxygen in two perfusion bioreactors with external stirrer loop (PC-ESCT) and bubble column (B.C). The results showed an increase of 9.2 ± 0.9 in the perfusion reactor with the external stirrer, while due to the high stress they were unable to grow properly in the bubble column reactor. The results confirm the suitability of alginate-gelatin microcapsules for the propagation of stem cells in dynamic systems. The perfusion bioreactor with external loop loops, by reducing the shear stress and better oxygen distribution, creates a homogenous and more suitable environment for growth and proliferation of cells.

Keywords: Bubble Column Bioreactor, External Agitator Loop, Hematopoietic Stem Cell, Microcapsule, Perfusion Bioreactor, Targeted Propagation.

1-Assistant professor, Chemical Engineering Group, Department of Engineering, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
* (Corresponding author: y.beygi@azaruniv.ac.ir)

2-Assistant professor Chemical Engineering Group, Department of Engineering, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌های *Leptogium saturninum* و *Ramalina peruviana* و *Punctelia borreri*

فائزه حمزه خانی^۱، پریسا محمدی^{۱*}، عذرا صبور^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

مطالعات نشان داده است که گل‌سنگ‌ها در اکوسیستم‌های مختلف حضور فعالی داشته و متابولیت‌های متنوعی تولید می‌کنند که تأثیرات زیستی مختلفی از جمله اثرات ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدتب، ضد درد و سمیت سلولی دارند. در این مطالعه، اثر ترکیبات ضد میکروبی گل‌سنگ‌ها بررسی شد. برای این منظور، ابتدا چند نمونه از گل‌سنگ‌های مناطق جنگلی اطراف شهر بابل جمع آوری و به کمک مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، شناسایی شدند. سپس عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها تهیه شد و اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی آن‌ها به طریق انتشار در آگار و تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) علیه پنج باکتری، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Xanthomonas campestris*، *Bacillus cereus*، *Pseudomonas aeruginosa*، و سه مخمر *Candida albicans*، *Candida glabrata tropicalis* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره گل‌سنگ‌های *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana*، *Punctelia borreri* علیه *X. campestris* و *S. aureus* موثر بودند. این در حالی است که در مورد *E. coli* و *B. cereus* تنها عصاره گل‌سنگ *R. peruviana* موثر بود و باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نیز نسبت به همه عصاره‌ها مقاومت نشان داد. همچنین اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد و نتایج بدست آمده از MIC نشان داد که عصاره *Leptogium saturninum* و *Ramalina peruviana* روی هر سه مخمر موثر بودند. این در حالی است که عصاره گل‌سنگ *P. borreri* تنها بر *C. albicans* موثر بود. با توجه به تولید ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در گل‌سنگ‌ها، استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی توصیه می‌شود. تحقیقات بیشتری لازم است تا اثر ضد میکروبی این متابولیت‌ها بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و محیطی بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: MIC، ترکیبات ضدقارچی، ترکیبات ضدباکتری، گل‌سنگ

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

* (نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)

مقدمه

گل‌سنگ‌ها همزیست‌هایی متشکل از حداقل دو موجود زنده، یعنی یک قارچ و یک شریک فتوسنتزی می‌باشند (Bates *et al.* 2011). شریک فتوسنتزی ممکن است جلبک یا سیانوباکتری باشد. گل‌سنگ‌ها قادرند متابولیت‌های مختلفی تولید کنند. تا کنون بیش از ۷۰۰ نوع متابولیت در گل‌سنگ‌ها شناسایی شده است که به ندرت در ارگانیزم‌های دیگر یافت می‌شوند. رشد آرام و زندگی در شرایط سخت، گل‌سنگ‌ها را مجبور به تولید متابولیت‌هایی می‌کند که برای حفظ حیات‌شان در زیستگاه‌های خاص حائز اهمیت است (Mitrovic *et al.* 2011). این متابولیت‌ها ترکیبات خارج سلولی بوده که گاه به صورت کریستال روی سطح هیف‌های قارچی تولید می‌شوند و شامل ترکیبات مختلفی مانند اسیدهای آلیفاتیک، لاکتون‌های ماکروسیکلیک، دپسیدها، دپسیدون‌ها و غیره هستند (Molnar & Farkas, 2010). این ترکیبات اثرات زیستی مختلفی از جمله اثرات آنتی‌بیوتیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد ویروسی، سیتوتوکسیکی و ضد باکتریایی دارند. فعالیت‌های دارویی متابولیت‌های گل‌سنگی اولین بار توسط Zopf در سال ۱۹۰۷ ارائه شد. سپس Hanssen و همکارانش در سال ۱۹۸۸ مجموعه‌ای از اطلاعات کلی در مورد جنبه‌های مختلف دارویی گل‌سنگ‌ها ارائه دادند (Huneck & Yoshimura, 1996). از زمان‌های بسیار قدیم در چین و مصر، گل‌سنگ‌ها مصرف دارویی داشته و از دم کرده‌ی آن‌ها استفاده‌های زیادی می‌شده است (Bown, 2001). گزارش شده است برخی از گل‌سنگ‌ها مانند *Cladonia* و *Lobaria* در درمان سل موثر بوده و استفاده می‌شده است (Vartia, 1973). برخی از اسیدهای گل‌سنگی به ویژه اسید اوسنیک خاصیت آنتی‌بیوتیکی داشته و از گذشته‌های دور از پودر این گل‌سنگ در درمان التهابات سوختگی‌های پوستی نوزادان نیوزیلندی و عشایر ایرانی استفاده می‌شده است. علاوه بر این، گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از برخی از متابولیت‌های دیگر گل‌سنگ‌ها در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آگزما، بیماری تنفسی، بیماری‌های ریوی و ورم مفاصل وجود دارد. از ترکیبات موجود در گل‌سنگ‌ها در تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی و تهیه پماد ضد سوختگی استفاده می‌شود (Zeybek & John, 1992). همچنین از متابولیت‌های *Cetraria islandica* به عنوان قرص‌های ضدسرفه و از اسید اوسنیک موجود در گل‌سنگ *Sarmentosa alectorica* در درمان زخم‌های پوستی و نیز انعقاد خون استفاده می‌شده است (Haluwyn & Lerond, 1993).

ترکیبات متعددی در گونه‌های مختلف گل‌سنگ‌ها علیه میکروارگانیزم‌هایی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها شناسایی شده که اثربازدارندگی رشد دارند (Kosanić *et al.* 2012; Manojlović *et al.* 2010). مطالعه روی مواد استخراج شده از گل‌سنگ‌ها با خاصیت آنتی‌بیوتیکی توسط Burkholder و همکارانش در سال ۱۹۴۴ آغاز شد. از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بسیاری از گل‌سنگ‌ها کشف شده است که روی طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و برخی قارچ‌ها مؤثر بوده است. Adriana و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای عنوان کردند رنگدانه‌های نارنجی

، قرمز رنگی که در گل‌سنگ‌های *Caloplaca* و *Physcia*، *Parmelia*، *Xanthoria parietina* وجود دارند، دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. Vartia سال ۱۹۷۳ در گزارش خود، فعالیت ضد میکروبی گل‌سنگ‌های فنلاند علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز برخی قارچ‌ها را گزارش کرد.

دانشمندان اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های اتیل الکل، کلروفرم و ان-هگزان گل‌سنگ *Ramalina farinacea* را علیه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhi*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* گزارش کرده‌اند. همچنین عصاره متانولی گل‌سنگ *Usnea ghattensis* دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی قوی علیه *Bacillus megaterium*، *Staphylococcus sp.* و *B. subtilis* بوده و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد را بین ۵ تا ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اعلام نمودند. علاوه بر این، گل‌سنگ *Cladonia rangiformis* دارای متابولیت‌های متعددی می‌باشد که تأثیر زیادی در کنترل جمعیت باکتری‌های خاک دارد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

سه گل‌سنگ *Punctelia borreri*، *Ramalina peruviana* و *Leptogium saturninum* از روی درختان جنگل‌های اطراف استان مازندران، شهرستان بابل جمع‌آوری شد و بعد از مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، آزمون‌های نقطه‌ای و آزمایش‌های مولکولی شناسایی گردید و عصاره‌های آن‌ها جهت بررسی اثرات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که شناسایی مورفولوژیکی گل‌سنگ‌ها با کمک کارشناسان هرباریوم گل‌سنگ موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور انجام شد و مقاله آن برای چاپ ارائه شده است.

استخراج عصاره

گل‌سنگ‌ها پس از جمع‌آوری در دمای اتاق خشک و پودر شده و سپس به نسبت (W/V) ۱:۵ با اتانول خالص مخلوط گردید. عصاره‌ها به روش سونیکاسیون و با خیساندن به مدت ۲۴ ساعت، تهیه شد. سپس عصاره‌های به دست آمده تغلیظ و در ۵ میلی لیتر DMSO حل شدند و پس از عبور از فیلتر میلی پور با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری استریل شده و در نهایت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

تهیه نمونه‌های میکروبی

۵ سویه مختلف باکتری از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهراء^(س) و همچنین ۳ جدایه بالینی مخمر از نمونه های واژینال که در مطالعات قبلی استفاده شده بود و در بانک میکروبی دانشگاه الزهراء^(س) نگهداری می شد، تهیه شد. باکتری‌ها و مخمرهای استفاده شده عبارت بودند از:

Escherichia coli (ATCC 23922), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1413), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*

تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار در آگار

حساسیت میکروبی به عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها به روش انتشار در آگار (روش Kirby- Bauer) براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۸) انجام شد. حجم‌های ۵۰ و ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های گل‌سنگی تحت شرایط استریل به دیسک‌های خالی استریل با قطر ۶mm تلقیح شد. این عمل در چند مرحله انجام شد تا عصاره ها کاملاً روی دیسک ها بارگذاری شود. پس از قراردادن در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی گراد، حلال آن تبخیر شد و اثر ضد میکروبی عصاره ها با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی گردید. در این روش از غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند باکتری و مخمرها، کشت یکنواختی روی محیط مولر هینتون آگار تهیه و دیسک های آغشته به عصاره با فواصل مناسب روی آن قرار گرفت. پلیت باکتری ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پلیت مخمرها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و قطر هاله عدم رشد، بر حسب میلی متر اندازه گیری گردید. آزمایش ها با سه تکرار انجام شدند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)

به منظور تعیین MIC عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه باکتری ها، از روش رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۲) انجام شد. ابتدا از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری‌ها، چند تک کلنی به سرم فیزیولوژی منتقل و پس از مخلوط کردن، کدورتی مطابق با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سوسپانسیون باکتریایی با این کدورت حاوی CFU/ml $10^8 \times (1-2)$ سلول است. سپس رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر با استفاده از محیط کشت Trypticase Soy Broth (TSB) انجام شد و در نهایت سوسپانسیون باکتری به همه چاهک ها افزوده گردید، بطوری که در هر چاهک سوسپانسیونی با غلظت $10^6 \times (5-10)$ CFU/ml به دست آمد. میکروپلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند و آخرین چاهکی که فاقد رشد قابل مشاهده بود به عنوان حداقل غلظت تعیین شد.

در ادامه به منظور تعیین MIC عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه مخمرها، از روش رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۷) استفاده شد. ابتدا از کشت خالص ۴۸-۲۴ ساعته مخمرها، پنج کلنی برداشته و به ۵ میلی

لیتر سرم فیزیولوژی منتقل شده و کدورتی مطابق با ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر در حد ۰/۸۵ تنظیم شد.

سوسپانسیون قارچی با این مشخصات حاوی 10^6 CFU/ml ($1-5$) سلول است. سپس سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و سوسپانسیونی با 10^4 CFU/ml ($5/5-2/0$) مخمر بدست آمد.

در مرحله ی بعد رقت سازی در پلیت های میکروتیتر با استفاده از محیط کشت RPMI انجام شد و در نهایت سوسپانسیون مخمری به همه چاهک ها افزوده گردید. میکروپلیت ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند و آخرین چاهک فاقد رشد قابل مشاهده تعیین گردید.

به منظور کنترل آزمایش و مقایسه کارآمدی اثر عصاره های گلشنی با آنتی بیوتیک های متداول باکتریایی و قارچی، به ترتیب از آنتی بیوتیک سفنازیدیم و فلوکونازول استفاده شد. تمام آزمایش ها با ۳ بار تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (version 20) در سطح احتمال $P < 0.01$ و تست ANOVA و Excel (version 2010) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

اندازه گیری قطر هاله ی عدم رشد و نتایج بدست آمده از MIC نشان داد که عصاره *Leptogium saturninum* و *Ramalina peruviana* روی مخمرها موثر بودند. نتایج قطر هاله عدم رشد هر سه گلشنی در حجم های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر در جدول ۱ آمده است. *C. tropicalis* با ایجاد هاله ۱۵/۹ میلی متری حساس ترین سویه و *C. glabrata* مقاوم ترین سویه نسبت به عصاره اتانولی سه گلشنی گزارش شد. حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره *Ramalina peruviana* برای هر دو مخمر *C. tropicalis* و *C. albicans* برابر ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر و علیه *C. glabrata* برابر ۱۸/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود. همچنین MIC عصاره *Leptogium saturninum* بر *C. albicans*، *C. tropicalis* و *C. glabrata* به ترتیب ۵، ۲/۵ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود. این در حالی است که عصاره گلشنی *Punctelia borreri* تنها بر *C. albicans* موثر بود و حداقل غلظت ممانعت از رشد آن برابر ۷/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (نمودار ۱).

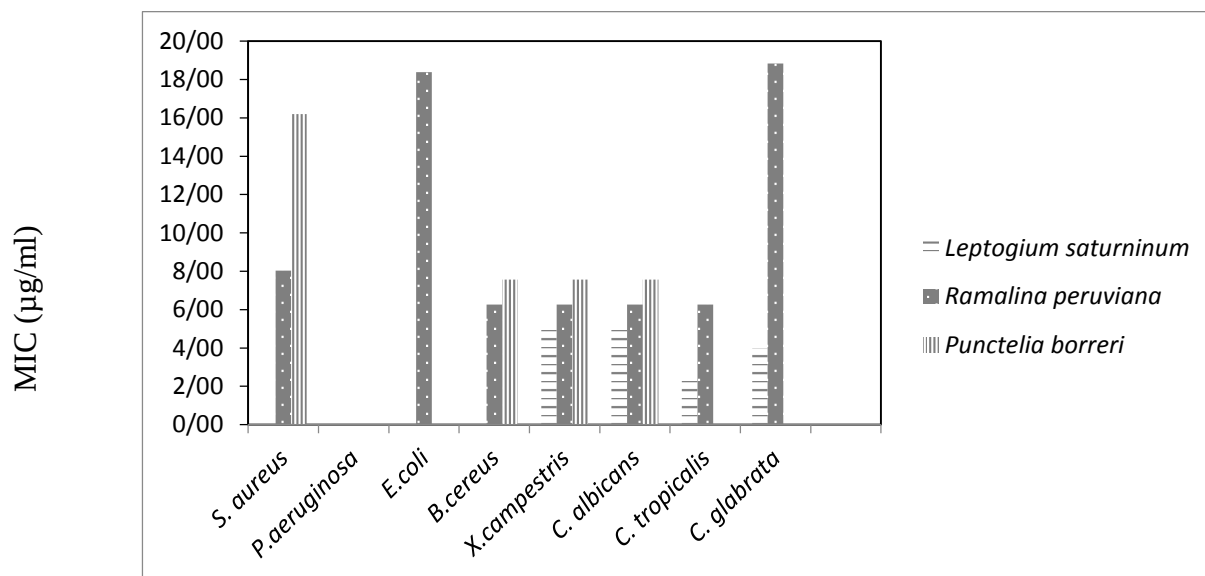
در جدول ۱ همچنین میزان قطر هاله عدم رشد باکتری ها نشان داده شده است. باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *X. campestris* نسبت به هر سه عصاره حساس بودند. این در حالی است که باکتری گرم مثبت *B. cereus* و باکتری گرم منفی *E. coli* تنها نسبت به عصاره گلشنی *R. peruviana* حساسیت نشان دادند و باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نیز نسبت به هیچ یک از عصاره ها حساسیت نشان نداد.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها بر حسب میلی متر علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

مقدار عصاره گل‌سنگ میکروارگانیسم	<i>Punctelia borreri</i>			<i>Ramalina peruviana</i>			<i>Leptogium saturninum</i>		
	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl
<i>S. aureus</i>	۱۱	۹	۷	۲۰	۱۷/۹	۱۵	۱۲	۱۰/۳	۸
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	۲۲	۱۹	۱۷	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	۲۳	۲۰/۸	۱۹	-	-	-
<i>X. campestris</i>	۱۴	۱۲	۱۰	۲۵	۱۷/۷	۱۱	۱۲	۱۰	۸
<i>C. albicans</i>	۱۱/۸	۱۰	۸	۱۴	۱۲	۱۰	۱۱/۸	۹	۷
<i>C. tropicalis</i>	۱۵	۸	-	۱۵/۹	۱۴	۱۱	۱۳	۱۱	۹
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	۱۰/۷	۹	۷

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که تقریباً همه باکتری‌ها نسبت به عصاره اتانولی گل‌سنگ *Leptogium saturninum* مقاوم هستند. مطابق نتایج به دست آمده تنها باکتری *X. campestris* نسبت به عصاره *Leptogium saturninum* حساسیت نشان داد و MIC آن برابر با ۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. عصاره گل‌سنگ *Ramalina peruviana* بیشترین تأثیر را در مهار رشد همه باکتری‌ها داشت و تنها در مورد *P. aeruginosa* حساسیتی مشاهده نشد و MIC آن برای باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* و *B. cereus* و *X. campestris* به ترتیب برابر با ۸/۳۰، ۱۸/۸۳، ۶/۲۷ و ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

عصاره اتانولی گل‌سنگ *P. borreri* مانع رشد باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* نشد و تنها علیه *S. aureus*، *B. cereus* و *X. campestris* موثر بود و MIC آن به ترتیب برابر با ۲۰/۱۶، ۷/۵۶ و ۷/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (نمودار ۱). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی سفتازیدیم علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است. از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و فلوکونازول جهت کنترل کیفی کار استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه نیز در جدول ۳ آمده است.



نمودار ۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک سفنازیدیم علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

سفتازیدیم	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

علامت (+) و (-) به ترتیب نشان دهنده رشد و عدم رشد باکتری است.

جدول ۳: حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه

فلوکونازول	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-

علامت (+) و (-) به ترتیب نشان دهنده رشد و عدم رشد مخمر است.

با وجود پیشرفت‌های فوق العاده در درمان بیماری‌های انسان، هنوز بسیاری از بیماری‌های عفونی، تهدید بزرگی برای

سلامت انسان می‌باشند. مشکلات ناشی از بیماری‌های عفونی در کشورهای در حال توسعه به دلیل عدم وجود کافی دارو و ظهور

مقاومت دارویی گسترده، بیشتر قابل توجه می‌باشد.

علاقه روزافزون در استفاده از متابولیت‌های گل‌سنگی برای درمان بیماری‌های مختلف، به دلیل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ناکارآمدی برخی از داروهای موجود می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش، به بررسی اثرات ضد میکروبی سه گل‌سنگ جدا شده از جنگل‌های استان مازندران به نام‌های *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana*, *Punctelia borreri* پرداخته شد.

با توجه به فعالیت ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌ها، به نظر می‌رسد که هاله عدم رشد و MIC به دست آمده برای هر یک از عصاره‌های گل‌سنگی بستگی به حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری، روش عصاره‌گیری و میکروارگانیسم مورد بررسی دارد. در این پژوهش با توجه به مطالعات قبلی صورت گرفته، به منظور استخراج بهتر عصاره‌ها از اتانول و روش خیساندن و سونیکاسیون استفاده شد (Ritika & Jayanthi, 2013). خیساندن همراه با تکان دادن و استفاده از امواج فراصوت موجب آزادسازی بهتر متابولیت‌ها و بالابردن بازده عصاره‌گیری از گل‌سنگ‌ها می‌شود. علاوه بر این، قطبیت بالای اتانول موجب حل شدن بهتر متابولیت‌های گل‌سنگی شده و امکان بهتری در استخراج ترکیبات شیمیایی و ضد میکروبی موجود در عصاره‌های گل‌سنگی فراهم می‌آورد.

نتایج روش انتشار در آگار این پژوهش نشان داد که باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها نسبت به ترکیبات ضد میکروبی حساسیت دارند. همچنین باکتری‌های گرم منفی *X. campestris*, *E. coli*, *P. aeruginosa* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *B. cereus* حساسیت کمتری نسبت به عصاره‌های گل‌سنگی از خود نشان دادند. دلیل تفاوت در میزان حساسیت قارچ‌ها، باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌تواند به تفاوت در نفوذ پذیری دیواره سلولی برگردد. دیواره سلولی قارچ‌ها از پلی ساکاریدهای مختلف چون کیتین و گلوکان تشکیل شده است. در حالی که دیواره ی باکتری‌های گرم مثبت به طور عمده از پپتیدوگلیکان و اسید تیکوئیک و دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی از پپتیدوگلیکان، لیپوپلی ساکارید و لیپوپروتئین تشکیل شده است (Valadbeigi & Shaddel, 2015).

فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های موجود در عصاره‌های گل‌سنگی به اشکال مختلفی دیده می‌شود. تخریب غشای پلاسمایی، ممانعت از پروتئین‌سازی و رونویسی DNA و سایر عوامل منجر به مرگ سلول و یا مهار رشد آن‌ها می‌شود. علاوه بر این، مشخص شد که افزایش غلظت عصاره‌های بارگذاری شده روی دیسک‌ها با قطر هاله عدم رشد نسبت مستقیم داشته و موجب بالابردن اثر ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌ها می‌شود.

Karagoz و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که عصاره اتانولی *Xanthoria parietina* هیچ اثری روی *P. aeruginosa* و *Klebsiella pneumonia* ندارد، در صورتی که عصاره مذکور در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد *S. aureus* و *S. epidermidis* شد. در این پژوهش نیز نتایج مشابهی مشاهده گردید و مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها، بهتر مشاهده شد (Aboaba & Efuwape, 2001; Ncube et al., 2008).

نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار MIC برای باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین وجود پمپ‌های ترشحی در باکتری‌های گرم منفی مانند *P. aeruginosa* و *E. coli* باشد که موجب انتقال عوامل ضد میکروبی به خارج از سلول می‌شوند (Rankovic & Misic, 2008; Kosanic & Rankovic, 2010; Poole et al., 1993).

همچنین دانشمندان دلیل فعالیت آنتی‌بیوتیکی گل‌سنگ‌ها را به خاطر وجود ترکیبات فنلی در متابولیت‌های گل‌سنگی می‌دانند (Ankith et al., 2017). نتایج به دست آمده از شناسایی مورفولوژیکی و همچنین استفاده از کلیدهای شناسایی گل‌سنگ‌ها (Bordo & Sharnoff, 2010) در این مطالعه نشان داد که متابولیت‌های اصلی موجود در گل‌سنگ‌های مورد مطالعه، ترکیبات فنلی می‌باشند. مکانیسم عمل ضد میکروبی مشتقات فنلی بدین شکل است که موجب تغییرات غیر قابل برگشت پروتئین‌ها و حتی القای آپوپتوز در سلول‌های میکروبی می‌شوند (Boustie & Grube, 2005). علاوه بر این، ترکیبات فنلی جزء ترکیبات میکروب‌کش قوی بوده و موجب تخریب غشاهای لیپیدی می‌شوند که می‌تواند علیه مایکوباکتریوم‌ها که دارای دیواره غنی از لیپید دارند موثر باشند (Amozegar, 2008; Cansaran et al., 2007).

Paudel و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی اثر ضد میکروبی پنج ترکیب جدا شده از عصاره اتانولی *Ramalina terebrata* که شامل اسید اوسنیک و مشتقات آن می‌باشد علیه دو باکتری *S. aureus* و *B. subtilis* با روش انتشار در آگار مطالعه کردند. همه ترکیبات بررسی شده علیه *B. subtilis* با غلظت MIC ۱-۲۶ میکروگرم بر میلی لیتر موثر بود در حالی که اسید اوسنیک تنها علیه مانع رشد باکتری *S. aureus* شد. مطالعات نشان داده است که عصاره گل‌سنگ *R. peruviana* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *S. aureus*, *Streptococcus mutans* می‌باشد (Moreira et al., 2015). علاوه بر این، Kambar و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی چهار گل‌سنگ *Rocella montagnei*, *Ramalina hossei*, *Leptogium burnetiae* و *Heterodermia diademata* را علیه چهار باکتری *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* و *S. aureus* مطالعه کردند و مشاهده نمودند که از میان چهار گل‌سنگ بررسی شده گل‌سنگ *R. hossei* بیشترین و *L. burnetiae* کمترین اثر ضد میکروبی را علیه باکتری‌های مورد بررسی نشان دادند.

نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز منطبق بر مطالعات فوق بود و نشان داد که عصاره اتانولی گل‌سنگ *R. peruviana* نسبت به دو گل‌سنگ دیگر دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری می‌باشد. همچنین مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت بررسی شده در این تحقیق حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این مطالعات نشان داده است که عصاره استنی *Evernia prunastri* و *Hypogymnia physodes* اثرات مهارکنندگی بر رشد قارچ‌های پاتوژن گیاهی دارند. همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که عصاره متانولی *Usnea subfloridans* می‌تواند رشد *Aspergillus niger* را مهار کند.

در تحقیق حاضر نیز هر سه گل‌سنگ مورد آزمایش روی مخمرهای بیماریزا موثر بودند که برای شناسایی اجزای موثر متابولیت‌های هریک از این گل‌سنگ‌ها، نیاز به پژوهش‌های بیشتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که شناخت، جداسازی و تخلیص متابولیت‌های موجود در عصاره گل‌سنگ‌هایی چون *L. saturninum*, *R. peruviana*, *P. borrieri* می‌تواند در کنترل رشد عوامل میکروبی مورد توجه قرار گیرد. مطالعات گسترده‌تری باید انجام شود تا امکان استفاده از این متابولیت‌های گل‌سنگی در درمان عفونت‌ها بررسی شود. اگرچه داروهای شیمیایی دارای اثر مهارکنندگی بیشتری می‌باشند، اما با افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و اثرات جانبی داروهای شیمیایی، شناسایی گل‌سنگ‌های محلی و بررسی خواص ضد میکروبی متابولیت‌های آن‌ها نه تنها در درمان عفونت‌ها می‌تواند مورد توجه قرار گیرد بلکه استفاده از این ترکیبات در کنترل جمعیت‌های میکروبی در اکوسیستم‌های مختلف همچون خاک پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

تمامی آزمون‌های مربوط به این پژوهش در آزمایشگاه‌های شایسته سپهر و آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه الزهراء (س) انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از پروفیسور معصومی و همکاران ایشان به دلیل همکاری در بخش شناسایی کلاسیک گل‌سنگ‌ها تشکر نمایند. از کارشناسان محترم آزمایشگاه خصوصاً خانم مریم یوسفی به دلیل کمک‌های تکنیکی‌شان تقدیر می‌گردد. این پژوهش با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء (س) انجام گردید.

منابع

- Aboaba, O. O. and Efuwape, B. M., (2001). "Antibacterial properties of some Nigerian spices". *Biolo.Res Commun*, 13,183 – 188.
- Adriana, B., Daniela, R., Stefano L., Annalisa, D. S., Angela, N., Sergio, S., Barbara, C., Luca, P., Francesca, D. R., Anna, M. M., Lucia, A. and Paola B., (2015). "Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite *Parietin*". *Molecular Sciences*, 16, 7861-7875.
- Amoozegar, D. M. A. (2008). *Microbiology*.
- Ankith, G., Rajesh, M., Karthik, K., Avinash, H., Prashith, K. T., Vinayaka, K., (2017). "Antibacterial and Antifungal Activity of three *Ramalina* Species". *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 7(5):27-32.
- Bates, S. T., Cropsey, G. W., Caporaso, J. G., Knight, R., Fierer, N. (2011). "Bacterial communities associated with the lichen symbiosis". *Applied and Environment Microbiology* 77, 1309–1314.
- Bauer, R. W., Kirby, M. D. K., Sherris, J. C., Truk, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method". *American Journal of Clinical Pathology*, 45,493–496.

- Bordo, I. M., Sharnoff, S. D. and Sharnof, S. (2001). *Lichens of North America*, Yale University Press. New Haven and London.
- Boustie, J., Grube, M. (2005). "Lichens-A promising source of bioactive secondary metabolites". *Plant Genet. Resour*, 3, 273–287.
- Bown, D. (2001). "Encyclopedia of Herbs and Their Uses". Dorling Kindersley, London.
- Cansaran, D., Atakol, O., Halici, M. G., Aksoy, A. (2007). "HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina* species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities". *Pharm. Biol.* 45, 77–81.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2012). *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2002). *Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M27-A2.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2003). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts*; Proposed Guideline. CLSI document M44-P.
- Huneck, D. S., Yoshimura, D. I. (1996). *Identification of Lichen Substances*.
- Kambar, Y., Vivek, M. N., Manasa, M., Vinayaka, K. S., Mallikarjun, N., Prashith Kekuda, T. R. (2014). "Antimicrobial Activity of *Leptogium burnetiae*, *Ramalina hossei*, *Rocella montagnei* and *Heterodermia diademata*". Prashith Kekuda T.R. et al / *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* 4 (3): 164-168.
- Karagoz, A., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Aslan, A. (2009). "Antibacterial activity of some lichen extracts". *J.Med.plant.Res.* 3 (12), 1034-1039.
- Kosanic, B., Rankovic, B. (2010). "Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro". *Kragujevac J. Sci*, 32, 65-72.
- Lerond, M., Van Haluwynne, C., Cuny, D. (1996). "Lichen et bioindication". *Ecology* 27(4), 277-283.
- Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M. and Bogdanovic, G. (2012). "Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica*". *Evidence-Based Complementary*.
- Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Tosic, S., Stankovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Comic, L., Dacic, D., Curcic, M. and Markovic, S. (2011). "Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species". *Molecular Sciences*, 12, 5428-5448.
- Molnar, K., Farkas, E. (2010). *Biological activities of secondary lichen metabolites*.
- Moreira, A. S. N., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V. and Vieira, I. J. C. (2015). "Chemistry and Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi". *Molecules*. 20, 8952-8987
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., Okoh, A. I. (2008). "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends". *Afr J Biotech.* 7, 1797-1806.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., Han, J., Yim, J. H. (2010). "Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its tree derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*". *Z. Naturforschung*, 65, 34–38.
- Poole, K., et al (1993). "Multiple antibiotic resistances in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon". *J. Bacteriol.* 175, 7363 – 7372.

- Rankovic, B., Mistic, M. (2008). "The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*". *Pharm.biotech.* 1013-1016.
- Ritika, C., Jayanthi, A. (2013). "In Vitro Antimicrobial Potential of the Lichen *Parmotrema* sp Extracts against Various Pathogens". *Iran J Basic Med Sci.* 16, 7, 880-885.
- Valadbeigi, T., and Minoo Shaddel, M. (2015). "Antibacterial and Antifungal Activities of Gelatinose and non-Gelatinose Lichen Species". *J Arch Mil Med.* 3(4):e31610.
- Vartia, K. O. (1949). "Antibiotics in lichens". *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 27 (1), 46-54.
- Zeybek, U., John, V., Lumbsch, H. T. (1992) "Türkiye likenlerinden *Hypogymnia* cinsi üzerinde taksonomik araştırma". *Doğa Tr. J. of Bot.* 17, 09-116

Antimicrobial effects of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana* and *Punctelia borreri*

F.Hamzekhani, P. Mohammadi, A. Saboori

Received: 2019.5.28

Accepted: 2020.12.7

Abstract

Lichens produce high diversity of metabolites and they have different biological activities including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory and the cytotoxic effects. In this study, the impact of antimicrobial substances of lichens were studied. For this purpose, the lichens of northern forests around Babol city was collected and via the morphological and microscopic characteristics, biochemical and molecular methods were identified. Then, ethanol extracts of lichens were prepared. Antimicrobial effects of extracts was assayed using the diffusion agar method and the determination of minimum inhibitory concentration against five bacteria, *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The studies showed that the extract of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana*, *Punctelia borreri* were effective against *X. campestris*, *S. aureus*. However, in the case of *Bacillus cereus* and *E.coli* only the extract of *R. peruviana* was effective. Furthermore, measuring the diameter of zone inhibition and MIC against three clinical *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida glabrata* showed that the extracts of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana* were effective on all the strains. However the extract of *Punktelia subroducta* was effective only on *C.albicans*. The substance of lichens, which assayed by biochemical tests showed that due to the presence of phenolic compounds, lichens show high antimicrobial properties. It should be carried out the antimicrobial experiments on a wide range of environmental and pathogenic microorganisms.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Lichen, MIC

1-MSc. Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University

*(Corresponding author: mohamadi_p@yahoo.com)

3- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University

ویژگیهای بوم‌شناختی، تشریحی، ریخت‌شناختی، و ریزریخت‌شناختی گونه *Gypsophila*

mucronifolia (Caryophyllaceae) بومی خاکهای گچی سمنان، ایران

فاطمه ربیع زاده^{۱*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸

چکیده

گونه ی *Gypsophila mucronifolia* Rech.f. از تیره Caryophyllaceae یک گونه اندمیک بیابان های گچی سمنان است. گزارش های معدودی از پراکنش گونه *Gypsophila mucronifolia*، در ارتباط با ویژگی های سازش پذیری تشریحی آن با عوامل خاک و ارتفاع انجام شده است. مطالعات بوم شناختی گونه *G. mucronifolia* برای اولین بار انجام شد. این گونه در ارتفاعات ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ متری از سطح دریا رویش دارد و اغلب در شیبهای شمالی می روید. با استفاده از نرم افزار Canoco for windows 4.5 و آنالیزهای آماری RDA تاثیر فاکتورهای محیطی بر روی پراکنش گونه *G. mucronifolia* مشخص گردید. فاکتور ارتفاع و محتویات گچ همبستگی مثبت و محتوای کربنات کلسیم و سدیم خاک همبستگی منفی بر رخداد و رشد گونه *G. mucronifolia* دارد. سطح برگ با میکروسکوپ الکترونی (SEM) بررسی گردید که نشان می دهد کرکهای غده ای در ساقه و برگ این گونه وجود دارد اما کرک بر روی کاسه گل مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی: ایدئوبلاست، برگ، کرک، گچزی

مقدمه

در زیستگاه های گچی گیاهان متنوعی می رویند (Rabinowitz & Kruckeberg, 1985)، اما برخی از آنها منحصر به اقلیم یا ترکیبات خاکی خاص هستند. Meyer در سال ۱۹۸۶ وقوع گونه های گیاهی انحصاری را در رابطه با نوع خاک بررسی می کند و گیاهان گچزی (gypsophytes) را به عنوان گیاهانی که در خاکهای گچی رشد می کنند شناسایی می نماید. *Gypsophila* L. اغلب روی خاکهای غنی از کلسیم، شامل گچ (gypsum) یافت می شوند. نام *Gypsophila* یا گچ دوست توسط لینه از Gypsos یا گچ و از philos یا دوست داشتن گرفته شده است، زیرا این گونه ها اغلب در خاکهای گچی یا آهکی رشد می کنند (Barkoudah, 1962). جنس *Gypsophila* L. با ۱۵۰ گونه چهارمین جنس بزرگ خانواده Caryophyllaceae شناخته شده است. خانواده Caryophyllaceae عموماً در مناطق گرم نیمکره شمالی پراکنش یافته اند. این خانواده در منطقه مدیترانه

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه خواران سمنان (فرزانگان)، سمنان، ایران

* (نویسنده مسئول: Rabizadeh@fgusem.ac.ir)

تنوع زیادی با حدود ۸۶ جنس و ۲۲۰۰ گونه نشان می دهد که شامل سه زیر خانواده های *Alsiniodeae*, *Paronychoideae* و *Caryophylloideae* و ۱۰ بخشه است (Falatoury, 2015, Bittrich, 1993) و اغلب در مناطق ایرانی- تورانی و مدیترانه ای پراکنش دارند (Williams, 1989; Korkmaz & Ozcelik, 2011; Sumaira et al., 2008; Mabberley, 2008). اکثر گونه های *Gypsophila* در شیپهای خشک و ارتفاعات متوسط یا بلند رویش دارند (EIG, 1931). این جنس اغلب در ترکیه با ۵۷ گونه و در ایران با ۳۵ گونه گزارش شده است (Bittrich, 1993). مرکز تنوع جنس *Gypsophila* که اغلب گونه های این جنس در آن پراکنده اند از منطقه دریای سیاه به ترکیه، قفقاز، شمال عراق با همسایگان نزدیک در ایران گسترش یافته است و از ۱۲۶ گونه ۴۹ گونه از این جنس انحصاری این مناطق است (Amini et al., 2011). ۳۷ گونه جنس *Gypsophila* در کشور ایران می روید که ۱۷ گونه آن انحصاری ایران است (Nejad Falatoury & al. 2015). برخی از گونه های *Gypsophila* بر روی صخره های آهکی، برخی از آنها در خاکهای سرپانتینی و بسیاری از گونه ها روی تپه های سنگی و تخریبی که ممکن است به عنوان یک گیاه فرصت طلب باشند، رشد کنند (Barkoudah, 1962). گیاهان *Gypsophila* گیاهان علفی یک ساله یا چندساله، یا گیاهان بالشتکی نیمه درختچه ای هستند. رده بندی زیر جنس های این جنس چالش برانگیز بوده است (Boissier, 1867). ۵۶ گونه از *Gypsophila* در منطقه فلور شرق شناخته شده که به هشت بخش و چند سری تقسیم شده است (Williams, 1889). گونه *Gypsophila mucronifolia* Rech.f.، یک گونه گچ دوست اندمیک سمنان است و در بیابان های گچی ۲-۷ کیلومتری شمال سرخه از سمنان در ارتفاعات ۱۳۰۰-۱۴۰۰ گزارش شده است (Rabizadeh et al., 2018; Rechinger, 1988). این گیاه چند ساله با ساقه چوبی با برگ های خطی گوشتی، به طول ۱۵-۲۰ میلی متر و به عرض ۲ میلی متر با کرکهای غده ای در قسمت های رویشی و کاسه های کوچک گل است. گل آذین خوشه گرز با شاخه بندی زیاد، دارای تعداد زیادی از گل های گرز است. کاسه ۳ میلی متر طول دارد، فنجانی شکل دندانه دار، گلبرگ ها سفید، مستطیلی. میوه کپسول صاف، با قطر ۲ میلی متر است. در واقع گزارش های معدودی از پراکنش گونه *Gypsophila mucronifolia*، در ارتباط با ویژگی های سازش- پذیری تشریحی آن با عوامل خاک و ارتفاع تا کنون انجام شده است (Barkoudah, 1962; Amini et al., 2011). هدف این مقاله بررسی شرایط بوم شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia* با شرایط رویشگاهی گچی و بررسی ارتباط فاکتورهای محیطی با ویژگی های ریخت شناختی، تشریحی و ریز ریخت شناسی است.

مواد و روش ها

موقعیت رویشگاههای گچی مورد مطالعه غرب شهرستان سمنان حوالی شهر های لاسجرد و افتر و سرخه، بخش های وسیعی از معادن گچ و کوه های گچی را به خود اختصاص داده است. در این نواحی پوشش ها و جوامع گیاهان گچزی به شکل ویژه ای شکل گرفته اند، البته کارخانه ها و معادن زیادی در این منطقه ایجاد شده اند که به پوشش گیاهان گچزی صدمات

جبران ناپذیری وارد کرده است. این ناحیه در سمت جنوب به کوه‌های البرز مرکزی محدود می‌شود، متوسط بارش سالانه در طی مطالعات ۱۱ ساله در محدوده ۱۶۰/۴ الی ۲۲۰/۷ (به طور متوسط ۱۹۲/۱ میلی متر) گزارش شده است. محدوده ماهانه بارش ۲۰-۰ میلی متر (حتی بدون بارش در فصل تابستان) دمای متوسط سالانه با دمای ۱۱/۳ درجه سانتیگراد (دامنه تغییرات از ۵- تا ۳۷ °C) با ظرفیت تبخیر بالا است (سازمان هواشناسی جمهوری اسلامی ایران، IRIMO). دوره خشکی حدود ۷ ماهه با بالاترین میزان خشکسالی در ماه‌های تیر تا شهریور در منطقه مورد مطالعه گسترش می‌یابد. پوشش گیاهی مناطقی در زمین‌های کم ارتفاع عمدتاً از گیاهان بیابانی و یکساله و هالوفیت‌ها تشکیل می‌شود. خاکهای گچی به طور گسترده در مناطق خاصی در بخش‌های غربی و شمال غرب سمنان پخش شده‌اند، که شامل بسیاری از گیاهان گچ دوست و متحمل گچ هستند. منطقه مورد مطالعه در رویشگاه‌های گچی غرب شهر سمنان با مختصات جغرافیایی “27.33° 26’ 35° شمالی و “2.8° 05’ 53 شرقی واقع شده است. این منطقه دارای آب و هوای گرم و خشک است.

نمونه برداری از خاک و گیاه و همچنین جمع‌آوری داده‌های بوم‌شناختی از ۴۰ ایستگاه انجام گرفت. اطلاعات بوم‌شناختی از گونه‌های گیاهی در فرم‌های اطلاعات مخصوص طراحی شده که شامل مجموعه‌ای از فراوانی همه گونه‌ها در ۱۲۰ پلات در منطقه مورد مطالعه است، ثبت شد (شکل ۱). نمونه‌های خاک از ۵۰-۳۰ سانتی متری بالای ریزوسفر در هر پلات جمع‌آوری شد و برای آنالیز خاک خصوصیات pH و هدایت الکتریکی یا EC با استفاده از روش‌های عملیاتی استاندارد توسط آزمایشگاه خاک‌شناسی معتبر اداره منابع طبیعی سمنان صورت گرفت. همچنین محتویات گچ با استفاده از روش رسوب استون و با استفاده از سانتی‌فوژ تعیین شد و همچنین کلسیم (Ca)، پتاسیم (K)، سدیم (Na)، منیزیم (Mg) و کربنات کلسیم (CaCO_3) با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده با استفاده از کلیدهای مناسب از جمله فلورا ایرانیکا (Recinger, 1988) و توسط متخصصان هرباریوم منابع طبیعی استان سمنان و دانشگاه فرزندگان سمنان تأیید شد. همچنین فنولوژی گونه *Gypsophila mucronifolia* در منطقه نیز مورد بررسی و توجه قرار گرفت. ضریب همبستگی اسپیرمن بین متغیرهای توصیفی و برای بررسی روابط بوم‌شناختی و عوامل خاک و توپوگرافی آنالیزهای رسته‌بندی (ordination) با استفاده از نرم‌افزار Canoco 4.5 for Windows و تجزیه و تحلیل RDA (Redundancy analysis) (Moradi et al., 2016) مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVAs) برای بررسی تفاوت‌های میان عوامل محیطی در گروه‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برش‌های تشریحی از ساقه و برگ گیاه *Gypsophila mucronifolia* به صورت دستی از نمونه‌هایی که به نسبت ۱:۱ در الکل و گلیسرین تثبیت شده بودند در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه فرزندگان سمنان صورت گرفت و نمونه‌ها با سبز متیل و قهوه‌ای بیسمارک رنگ آمیزی شدند و در حداقل ۵ فرد تکرار صورت گرفت. و عکس‌هایی با میکروسکوپ نوری Leitz (Wetzlar, Nikon camera model Coolpix) گرفته شد. بافتهای گیاه توسط نرم

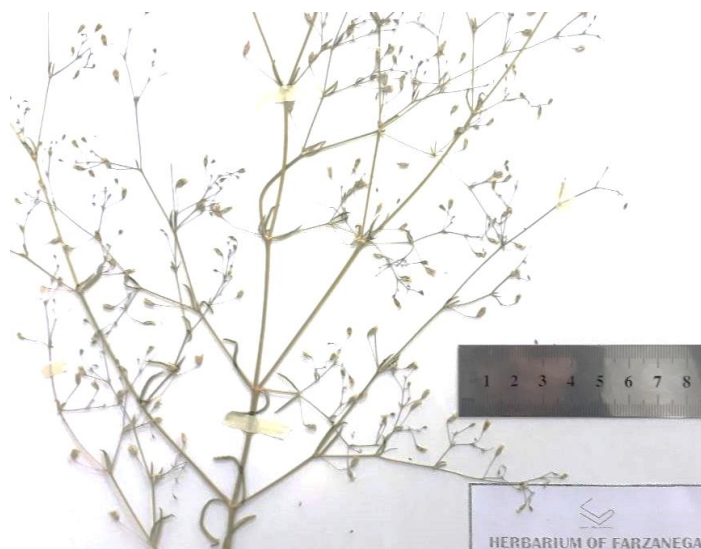
افزار Digimazer.4.1.1.0 مقیاس بندی و اندازه گیری شد. علاوه بر این، عکس هایی با میکروسکوپ الکترونی (SEM) از کرکهای سطح برگ گونه *Gypsophila mucronifolia* گرفته شد.

نتایج و بحث

ویژگی های بوم شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia*

رویش گونه *Gypsophila mucronifolia* از ماه اسفند با ایجاد برگهای جوان آغاز می شود و در فروردین ماه به گل می نشیند و اغلب در خرداد ماه به میوه و بذر می نشیند (شکل های ۱ و ۲). این گونه به فرم رویشی همی کریپتوفیت در ۳۴٪ پلاتهای نمونه برداری شده و به طور خاص در ارتفاعات بالاتر نسبت به سایر گونه های گچزی و در ارتفاعات ۱۴۲۰ تا ۱۹۷۰ متری از سطح دریا و اغلب در شیبهای شمالی می روید. ایستگاه هایی که گونه *G. mucronifolia* در آنها مشاهده شد در شکل ۳ و جدول ۱ نمایش داده می شود. گونه هایی که اغلب همراه با گونه *G. mucronifolia* در منطقه مورد مطالعه مشاهده شد شامل گونه های زیر است:

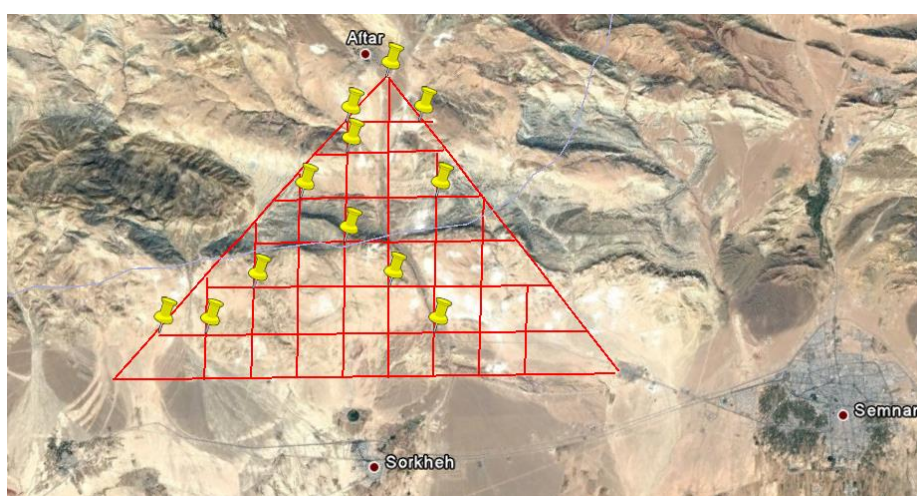
Astragalus fridae Rech. F., *Moltkia gypsaceae* Rech. F., *Dendrostellera lessertii* (Wikstr.) VanTigh., *Dorema ammoniacum* D. DON, *Euphorbia gypsicola* Rech. & Aell., *Euphorbia aryop* Boiss., *Cousinia deserti* Bunge, *Allium bunge* Boiss., *Matthiola ovatifolia* (Boiss.) Boiss.



شکل ۱: نمونه هر بار یومی *Gypsophila mucronifolia* (FGU1730!)



شکل ۲: *Gypsophila mucronifolia* از مناطق گچی غرب سمنان، عکاس: فاطمه ربیع زاده



شکل ۳: علامتها موقعیت گونه *Gypsophila mucronifolia* را در منطقه مورد مطالعه نشان می‌دهد.

جدول ۱: نمایش مختصات جغرافیایی، ارتفاع و شیب مناطق دارای گونه *Gypsophila mucronifolia*

شمالی	شرقی	شیب	ارتفاع	نقاط جمع آوری
53 5.209	35 28.758	جنوبی	۱۶۰۸	۱
53 6.876	35 29.131	دشت	۱۴۶۲	۲
53 12.625	35 31.6	شمالی	۱۴۲۳	۳
53 6.107	35 30.313	جنوب غربی	۱۶۵۰	۴
53 9.466	35 30.809	دشت	۱۴۷۹	۵
53 9.445	35 31.637	غربی	۱۶۷۴	۶
53 7.8	35 32.575	شمالی	۱۶۶۳	۷
53 10.565	35 34.707	شمال شرقی	۱۷۳۸	۸
53 7.865	35 33.778	شرقی	۱۷۷۶	۹
53 7.595	35 34.763	جنوب غربی	۱۷۲۷	۱۰
53 8.504	35 35.869	جنوبی	۱۷۹۶	۱۱
53 6.218	35 35.693	شمالی	۱۹۶۹	۱۲

نوع خاک

نتایج نشان داد که بافت خاک در هر ارتفاعی ویژگی‌های متفاوتی از نظر EC (شوری) و pH دارد (جدول ۲). نوع خاک در پایین‌ترین ارتفاع و دشتها sandy-clay-loam با محتوای بالایی از ماسه (۶۰٪) و با گچ و کربنات (اغلب به نسبت مساوی) و با pH خنثی تا نزدیک به قلیایی و شوری کم است، براساس طبقه‌بندی FAO (www.fao.org/docrep/x5871e041.htm). مخلوطی از گچ و کربنات در همه نمونه‌های خاک وجود داشتند. همانا افزایش ارتفاع با میزان گچ و کربنات خاک مرتبط است (کربنات با شاخص CaCO_3 نشان داده شده است). به عنوان مثال نمونه‌های خاک در ایستگاه‌هایی با دامنه ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۱۷۰۰ متری به طور میانگین حدود ۱۱٪ کربنات و ۲۴٪ گچ اما در ایستگاه‌هایی با دامنه ارتفاعی ۱۲۰۰ تا ۱۵۰۰ متری از سطح دریا اغلب تقریباً به نسبت مساوی کربنات و گچ دارد (جدول ۲). در ارتفاعات با خاکهای گچی بالا دارای خاکهای لومی و سیلت و رسی کمی هستند و اغلب فولکوله هستند همچنین دارای EC و pH کمتر از خاکهای ارتفاع پایین هستند. یک لایه کربنات از خاک در ارتفاعات حدود ۱۵۰۰ - ۱۶۰۰ متری از سطح دریا وجود دارد، که تا حدودی توسط گچ در محدوده‌های بالاتر پوشش داده شده است که این لایه دارای EC کم و pH نزدیک خنثی است. نمونه‌های خاک در ایستگاه‌هایی با محتوای گچ بالاتر، محتوی منیزیم کمتری را نشان می‌دهد (جدول ۲). به جز برای خاکهای دشتها (ارتفاعات پایین) که اغلب محتویات کلسیم و منیزیم مساوی دارند، محتویات کلسیم در اغلب خاکها به غیر از ارتفاعات پایین (۱۱۰۰-۱۳۰۰ متری از سطح دریا) بالا است و خیلی بین ارتفاعات مختلف متفاوت نیست اما محتویات منیزیم نوسان دارد (جدول ۲). محتویات پتاسیم در ارتفاع ۱۵۰۰ - ۱۷۰۰ متری از سطح دریا بالا است. همچنین برای سدیم، میزان بسیاری از سدیم در ارتفاعات پایین تر مشاهده شد، برای مثال، محتویات سدیم خاک در دشتها ۱۰ برابر بیشتر از مناطق گچی ارتفاعات بالاتر است. پوشش گیاهی مناطقی در زمین‌های کم ارتفاع عمدتاً از گیاهان بیابانی و یکساله و هالوفیت‌ها (به عنوان مثال گونه *Haloxylon*, *Tamarix*, *Artemisia* و سایر گونه‌های *Chenopodiaceae*) تشکیل می‌شود و در مناطق مرتفع، گونه‌های *Asteraceae*, *Caryophyllaceae*, *Fabaceae* و *Boraginaceae* و *Euphorbiaceae* فراوانی بیشتری دارند. اثرات خواص خاک و موقعیت توپوگرافی در خوسه بندی و وقوع گونه‌های گیاهی، همانطور که در بالا توضیح داده شد، قابل توجه است.

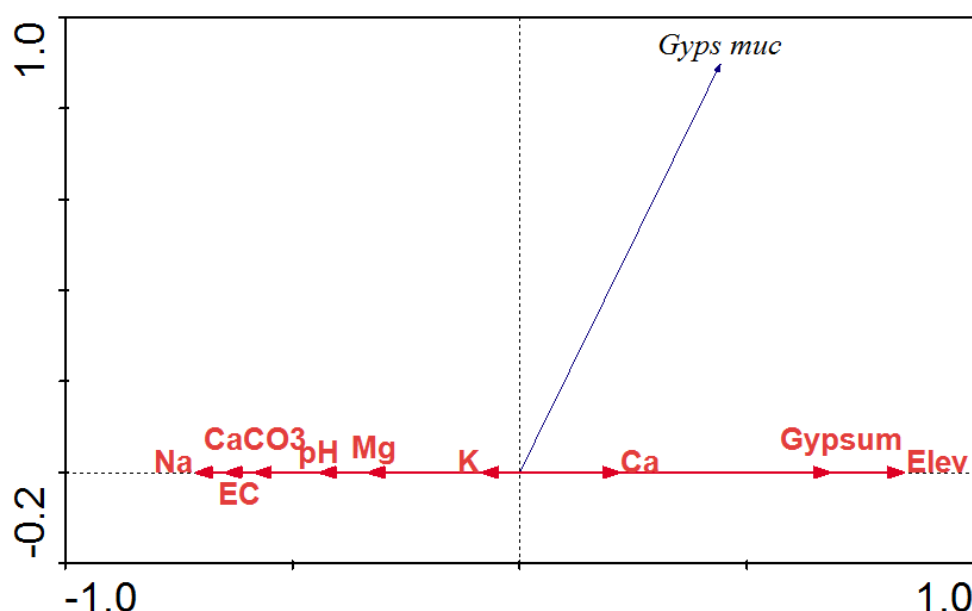
جدول ۲: فاکتورهای خاک بر اساس ارتفاع منطقه مورد مطالعه

فاکتورهای خاک	دامنه ارتفاع از سطح دریا (متر)	
	1500-1700	1100-1500
Sand (%)	73.40±6.43	63.71±3.14
Silt (%)	15.45±3.24	22.18±1.95
Clay (%)	11.35±2.15	15.45±3.65
pH	7.46±0.01	7.98±0.23
EC (d.s/m)	2.85±0.78	3.14±1.34
TNV (%)	11.71±2.5	13.14±1.20
Gypsum (%)	24.11±4.13	10.85±4.43
Ca (mEq/l)	34.09±6.12	18.16±7.34
Mg (mEq/l)	5.20±0.58	19.83±5.23
K (mg/kg)	77.85±9.24	57.79±5.06
Na (mEq/l)	3.3±2.4	23±4.3

نتایج نشان داد که میزان حضور گونه *G. mucronifolia* در مناطقی با دامنه ارتفاعی ۱۱۰۰ تا ۱۵۰۰ بر اساس جدول ۲ تقریباً صفر است. در واقع این گونه در خاکهایی با pH قلیایی و EC بالا به طور نادر یافت می‌شود. اما در خاکهایی با گچ و کلسیم بالا رویش می‌یابد. در واقع وجود گچ در خاک و یون کلسیم در حضور و یا نبود این گونه نقش دارند. در عوض یونهایی مثل منیزیم و سدیم نقش منفی در حضور این گونه در منطقه ایفا می‌کنند. که با افزایش عناصر کلسیم، گچ در خاک حضور گونه *G. mucronifolia* را مشاهده کردیم. میانگین ارتفاعی که این گونه رشد می‌کند، $229/3 \pm 1537/6$ متر از سطح دریا است. میانگین ویژگی‌های خاکی گونه *G. mucronifolia* شامل pH ۷/۶، EC ۲/۷ و همچنین گچ ۲۲/۳٪، کلسیم ۲۵/۳ (mg/kg)، پتاسیم ۸۰ (mg/kg)، سدیم ۸/۴ (mEq/l)، منیزیم ۱۱/۹ (mEq/l) و کربنات کلسیم ۸/۳٪ محاسبه شد (جدول ۳). با استفاده از آنالیز RDA تاثیر فاکتورهای محیطی بر روی پراکنش گونه *G. mucronifolia* مشخص گردید. فاکتورهای ارتفاع و گچ و کلسیم تاثیر مثبت و فاکتورهای کربنات کلسیم (CaCO₃)، pH، EC و سدیم تاثیر منفی روی پراکنش گونه *G. mucronifolia* نشان دادند، درواقع آنالیز RDA نشان داد که چه عناصری بر حضور این گونه نقش مثبت و کدامیک نقش منفی دارند (شکل ۴). جدول ۴ ماتریس همبستگی گونه *G. Mucronifoli* در محور اول از آنالیز RDA را نشان می‌دهد و بیان می‌کند که فاکتورهای ارتفاع و گچ به ترتیب با میزان ۰/۸ و ۰/۷ بالاترین تاثیر مثبت معنی دار را در رویش و حضور این گونه ایفا می‌کنند و فاکتورهای EC و کربنات کلسیم (CaCO₃) هر کدام به میزان ۰/۶ بیشترین تاثیر منفی معنی دار را در رویش و حضور این گونه دارند. ماتریس همبستگی بین فاکتورها و میزان تاثیر گذاری آنها روی گونه *G. mucronifolia* در جداول ۴ و ۵ نمایش داده شده است.

جدول ۳: میانگین فاکتورهای بوم شناختی، نوع خاک و عناصر موجود در گونه *Gypsophila mucronifolia*

Name	(weighted) mean	Stand. Dev.	Inflation factor
Elevation (m)	1537.6	223.9	2.7
EC(d.s/m)	2.7	0.6	7.3
pH	7.6	0.1	2.8
CaCO ₃ (%)	8.3	7.0	1.6
Gypsum (%)	22.3	6.4	2.4
Ca(mg/kg)	25.3	6.2	4.8
Mg(mEq/l)	11.9	5.7	4.4
K(mg/kg)	80	36.8	1.6
Na(mEq/l)	8.4	10.3	10.3



شکل ۴: نمایش آنالیز همبستگی RDA، از ۹ فاکتور محیطی موثر را در ارتباط با پراکنش گونه *Gypsophila mucronifolia*. فاکتورها شامل گچ (gypsum)، کلسیم (Ca)، پتاسیم (K)، سدیم (Na)، منیزیم (Mg)، کربنات کلسیم (CaCO₃)، pH، EC و ارتفاع (Elevation) است.

جدول ۴: ماتریس همبستگی گونه *Gypsophila mucronifolia* در محور اول از آنالیز RDA (* = همبستگی بالاتر از ۰/۵)

متغیر های محیطی	محور اول
Elevation	0.8*
EC	-0.6*
Ph	-0.4
CaCO ₃	-0.6*
Gypsum	0.7*
Ca	0.2
Mg	-0.3
K	-0.1
Na	-0.7*

جدول ۵: مقادیر ویژه (Eigenvalues) و همبستگی گونه و فاکتورهای محیطی دو محور اول آنالیز RDA گونه *Gypsophila*

<i>mucronifolia</i>		
Axes	1	2
Eigenvalues	0.2	0.8
Species-environment correlations	0.4	0
Cumulative percentage variance of species data	19.5	100
Cumulative percentage variance of species-environment relation	100	0

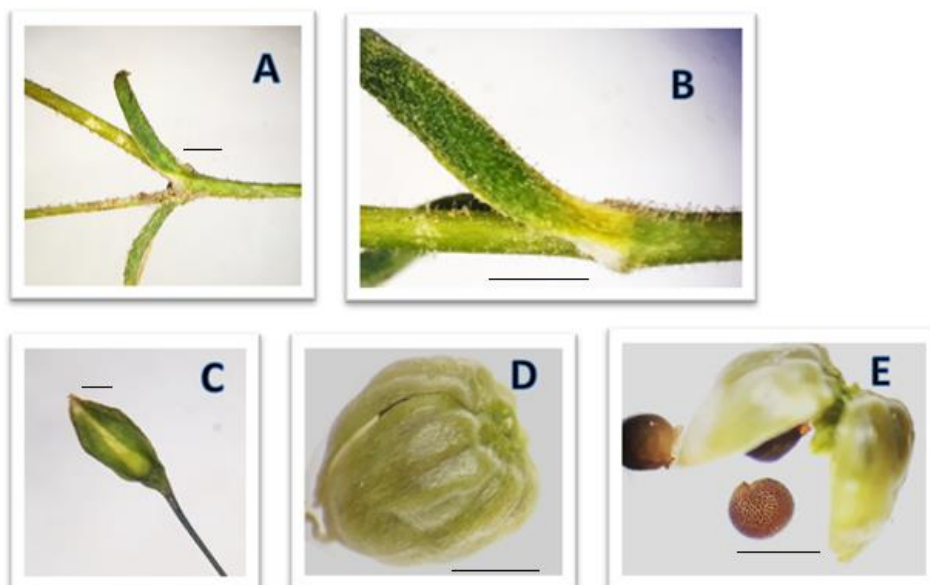
ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia*

ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه همی کریپتوفیت، علفی، ۱۵-۳۵ سانتی متر طول ساقه، چند ساله با ساقه چوبی با برگ‌های خطی گوشتی، به طول ۵-۲۵ میلی متر و به عرض ۲ میلی متر، با کرک‌های غده‌ای در روی ساقه و برگ و اما بدون کرک در کاسه گل است. گل‌آذین خوشه‌گزن با شاخه‌بندی زیاد، دارای بسیاری از گل‌های گرزنی است. کاسه گل ۳-۵ میلی متر طول دارد، فنجان‌ی شکل دندان‌دار، گلبرگ‌ها سفید، مستطیلی. میوه کپسول صاف، با قطر ۱/۵ تا ۲/۵ میلی متر است (جدول ۶).

شکل ۵ که تصاویری از گونه *G. mucronifolia* که توسط استریومیکروسکوپ مشاهده و عکس برداری شد نشان می‌دهد، کرک‌های غده‌ای در ساقه و برگ این گونه مشاهده شد اما کرک بر روی کاسه گل مشاهده نگردید، میوه کپسول صاف و بذره‌های همراه با میوه که در شکل ۵ نمایش داده شد.

جدول ۶: بررسی ریخت‌شناختی نمونه‌های گونه *Gypsophila mucronifolia* (شماره هر بار یومی (FGU1730!)

نمونه‌های <i>Gypsophila mucronifolia</i>	
در حوالی شهرهای مومن‌آباد و لاسجرد و شمال سرخه تا افتر. در زیستگاه گونه ارتفاعات ۱۵۰۰-۱۷۰۰ متری	
همی کریپتوفیت، علفی، چند ساله، با ساقه چوبی	فرم رویشی
حدود ۱۵-۳۵ سانتی متر طول ساقه	ساقه
برگ‌های خطی و گوشتی به طول ۵-۲۵ میلی متر و به عرض ۲ برگ‌ها میلی متر با کرک‌های غده‌ای در روی ساقه و برگ و اما بدون کرک در کاسه گل	
کاسه گل ۳-۵ میلی متر فنجان‌ی شکل دندان‌دار، گلبرگ‌ها کاسه گل سفید، مستطیلی	
میوه کپسول صاف، با قطر ۱/۵ تا ۲/۵ میلی متر	میوه

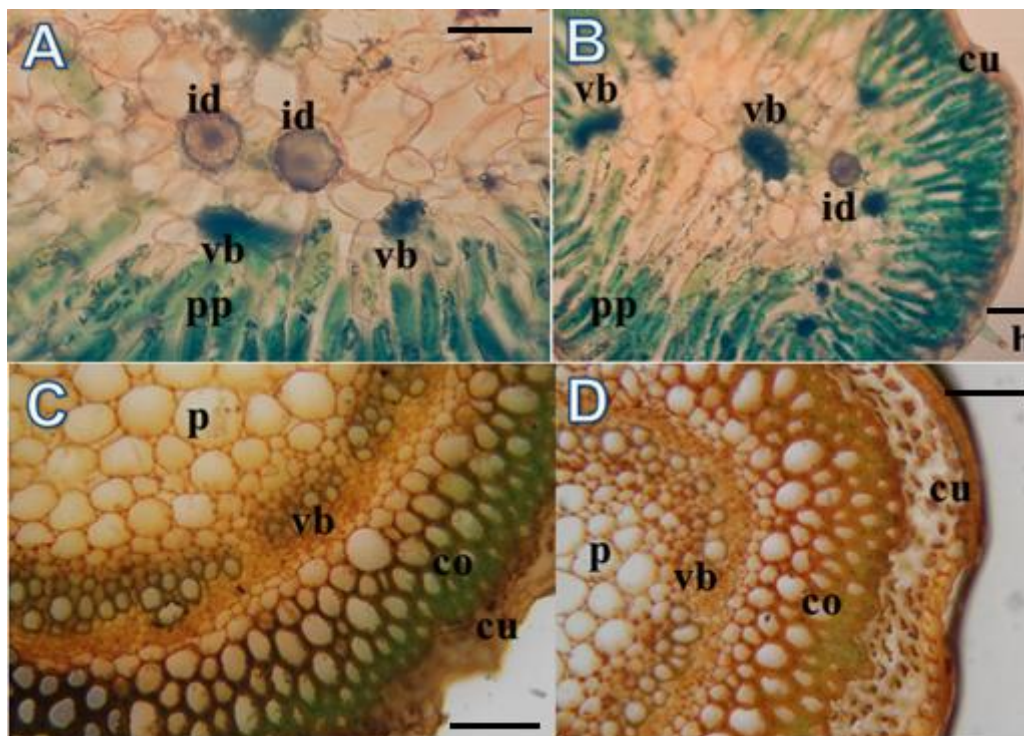


شکل ۵: نمایش ریخت شناختی گونه *G. mucronifolia*. A و B: ساقه و برگ، C: کاسه گل D: میوه، E: میوه و بذر. خط های مقیاس = ۱ میلی متر

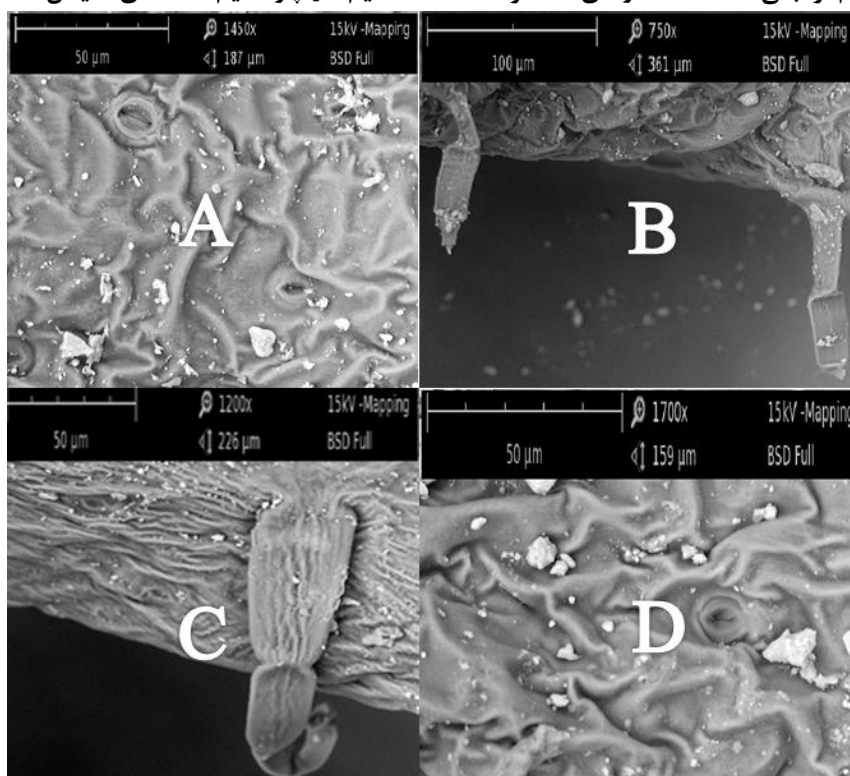
ویژگی های تشریحی و ریز ریخت شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia*

برش های عرضی از برگهای *G. mucronifolia* پارانشیم نردبانی به خوبی گسترش یافته را نشان می دهد و اغلب دو توده کریستالی از ایدیوبلاست از گچ در همه برگهای آن مشاهده شد (شکل ۶، A, B)، این یک سلول گیاهی منفک شده است که از سایر بافتهای مجاورش متفاوت است و دارای عملکردهای متفاوت مثل ذخیره رزین ها، مواد ترشحي، رنگدانه ها و مواد معدنی که می تواند روغن ها، شیرابه، صمغ، رزین، تانن یا رنگدانه ها را در بر گیرد. برخی از آنها می توانند کریستالهای معدنی مانند کربنات کلسیم یا اغزالات کلسیم را در بر بگیرند (Gray, 2009). ایدیوبلاست ها در سرده *Gypsophila* کریستالهای معدنی مانند اغزالات کلسیم را در بر می گیرد (Ozdemir, 2010). ایدیوبلاست در واقع به گیاه برای تنظیم فشار اسمزی کمک می کند و یک راه آسان برای خلاص شدن از کلسیم زیادی در گیاه است (Ozdemir, 2010). البته در هیچ یک از افراد مورد مطالعه گونه *G. mucronifolia* هیچ اثری از ایدیوبلاست روی بافت ساقه مشاهده نشد (شکل ۶، C, D).

جدول ۷ میانگین طول و عرض سلولهای موجود در بافت ساقه و ریشه را نمایش می دهد، ایدیوبلاستها بزرگتر از سایر سلولها در بافتهای برگ *G. mucronifolia* مشاهده شدند (میانگین به قطر $15/5 \pm 90/2$ میکرومتر). سطح برگها چروکیده و تراکم کرک ها روی سطح برگ خیلی کم است. بر اساس مطالعات میکروسکوپ الکترونی فاصله روزنه ها از همدیگر متغیر و غیر منظم است (فاصله روزنه ها از همدیگر به طور متوسط 70 ± 23 میکرومتر محاسبه شد). طول کرکهای روی برگها بین ۸۰ - ۱۱۰ میکرومتر اندازه گیری شد (شکل ۷).



شکل ۶: برش عرضی از برگ (A و B)؛ ساقه (C و D) از گونه *Gypsophila mucronifolia*. id: ایدیوبلاست، cu: کوتیکول، pp: پارانشیم نردبانی، vb: غلاف آوندی، h: کرک، co: کلانشیم، p: پارانشیم. خط‌های مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر



شکل ۷: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح برگ‌های *Gypsophila mucronifolia*

جدول ۷: اندازه گیری بافتهای ساقه و برگ *Gypsophila mucronifolia*

	میانگین طول $\pm$ انحراف معیار (میکرومتر)	میانگین عرض $\pm$ انحراف معیار (میکرومتر)
ساقه		
سلولهای اپیدرمی	25.2 $\pm$ 1.3	23.1 $\pm$ 5.3
سلولهای تراکتیدی	30.3 $\pm$ 15.3	50.7 $\pm$ 18.1
سلولهای پارانشیم مغزی	71.3 $\pm$ 13.2	73.5 $\pm$ 12.4
کلانشیم	41.1 $\pm$ 9.3	32 $\pm$ 2.6
برگ		
قطر ایدیوبلاست	90.2 $\pm$ 15.5	
پارانشیم نردبانی	88.3 $\pm$ 18.6	25.6 $\pm$ 12.1
قطرسلول پارانشیم اسفنجی	32.8 $\pm$ 14.5	
سلول اپیدرمی	25.1 $\pm$ 3.7	24.1 $\pm$ 4.1

نتیجه گیری کلی

مطالعات بوم شناختی گونه *G. mucronifolia* به عنوان گونه اندمیک سمنان برای اولین بار انجام شد. این گونه در ارتفاعات ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ متری از سطح دریا رویش دارد (میانگین ارتفاعی که این گونه رشد می کند $229/3 \pm 1537/6$ متر از سطح دریا است). این گونه همراه با سایر گونه های گچزی در این منطقه مانند گونه های: *Astragalus fridae*, *Moltkia gypsaceae*, *Dendrostellera lessertii*, *Dorema ammoniacum*, *Euphorbia gypsicola*, *Euphorbia aryop*, *Cousinia deserti*, *Allium bunge*, *Matthiola ovatifolia*، مشاهده شد. آنالیز خاک و آنالیز های RDA نشان داد که این گونه اغلب از عناصر شور کننده خاک مانند Na و Mg دوری می کند و در نتیجه از pH قلیایی و EC نیز دوری می کند ولی عناصری مانند گچ و به تبع عنصر کلسیم و ارتفاع که در این منطقه ارتفاع بالا (منطقه افتر) که رطوبت و بارندگی بیشتر را در پی دارد تاثیر مثبت در رویش و پراکنش این گیاه دارد. بخشی از منطقه مورد مطالعه دارای خاکهای آهکی با ترکیبات CaCO_3 است (Rabizadeh et al., 2018). در واقع عنصر کربنات کلسیم یا آهک (CaCO_3) به عنوان یک فاکتور مهم که تاثیر منفی در رویش و پراکندگی گونه *G. mucronifolia* دارد، در این مطالعه معرفی گردید. نتایج این تحقیق نشان می دهد که شکل رویشی و ویژگی های تشریحی، ریخت شناسی و ریز ریخت شناختی گونه *Gypsophila mucronifolia* برای بقا در آب و هوای خشک منطقه سمنان سازش یافته است. از لحاظ شکل رویشی، این گونه ریشه های بلند با نفوذ عمیق دارد. برگهای کوچک و گوشتی این گونه شرایط زیست در محیط گرم و خشک سمنان کمک بسزایی می کند. بخشی از گچی که وارد گیاه می شود که در پارانشیم برگ به صورت کریستال های سولفات و اگزالات کلسیم به نام ایدیوبلاست تجمع می شود که به تدریج آنها را از برگ به

بیرون می‌رانند. درواقع، وجود ایدیوبلاستها در این گونه علاوه بر توانمند کردن گیاه در برابر تبخیر شدید آب در منطقه گرم و خشک سمنان، در دفع گچ اضافی از گیاه به صورت ذخیره کریستال‌های کلسیمی در برگ‌های خود کمک بسزایی در سازش‌پذیری این گیاه می‌کند. ایدیوبلاستها در واقع سلول‌های پارانشیمی برگ هستند که تغییر کارایی داده اند و ذخیره مواد معدنی زائد را در گیاه بر عهده دارند اندازه آنها عموماً بزرگتر از سایر سلول‌های پارانشیمی است. ایدیوبلاستها یا کریستال‌های گچ در گونه‌های دیگر از *Gypsophila* مانند گونه‌های *Gypsophila davisii* (Armagan & Ozgokce, 2018) و *Gypsophila lepidioides* (Ozdemir, 2010) که هر دو از گونه‌های اندمیک ترکیه است نیز گزارش شده است. اما تعداد ایدیوبلاستها بسیار کم و محدود در گونه *G. mucronifolia* نسبت به گونه‌های اندمیک ترکیه مشاهده گردید. ایدیوبلاستها علاوه بر اینکه گیاه را از وجود کلسیم اضافی نجات می‌دهد، به تعادل اسمزی سلول نیز کمک خواهد کرد و باعث جذب آب بیشتر در سلول خواهد شد و شرایط را برای رشد بهتر این گیاه در شرایط سخت آب و هوایی سمنان از نظر کمبود آب و گرمای بالا در منطقه سمنان فراهم می‌کند که این نوع تغییرات فیزیولوژیکی روی ویژگی‌های ریخت‌شناختی برگ گیاه که داری برگ‌های گوشتی (برای جذب و نگهداری آب) و کوچک (موثر در کاهش تبخیر آب) تاثیر گذاشته است که گونه *G. mucronifolia* اندازه کوچک در برگ‌ها را با افزایش تراکم و افزایش طول پارانشیم نردبانی برای جبران میزان فتوسنتز تامین می‌کند. اما این سازش‌پذیری در اجزای اندام‌های زایشی مانند اجزای گل این گیاه به این شکل مشاهده نمی‌شود. در گونه *G. mucronifolia* روی کاسه گل این گیاه هیچ اثری از کریستال‌های گچ یا ایدیوبلاستها مشاهده نمی‌شود. Ozdemir در ۲۰۱۰، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تشریحی گونه اندمیک ترکیه به نام *Gypsophila lepidioides* Boiss. را بیان می‌کند، گونه *Gypsophila lepidioides* در مقایسه با گونه *G. mucronifolia*، قطر ایدیوبلاستها و اندازه سایر بافتهای آن تا حدود زیادی مشابه هستند، البته پارانشیم‌های نردبانی گونه *G. mucronifolia* به اندازه ۲۰-۳۰ میکرومتر بلندتر مشاهده شدند. برگ‌ها به طول ۵ تا ۲۵ میلی‌متر و به عرض ۲ میلی‌متر اندازه گیری شد. همانطوری که از اسم آن مشخص است کوچکترین برگ را در بین سایر گونه‌های *Gypsophila* به خود اختصاص داده است. برگ کرکدار ویژگی تمام اعضای زیربخش *Drypidipetala* Williams (Williams, 1889) از بخش *Dichoglottis* Boiss. (Boissier, 1867) که گونه *G. mucronifolia* Rech.f. را نیز شامل می‌شود همگی برگ‌های کرکدار دارند که در این مطالعه وجود کرک بر روی برگ گونه *G. mucronifolia* نشان داده شد. نژادفلاطوری و همکارانش (۲۰۱۵) بیان کردند که روی ساقه و کاسه‌های گل گونه *G. mucronifolia* کرک وجود دارد که در این مطالعه روی ساقه گیاه کرک‌هایی با تراکم بسیار کمتر از برگ ولی روی کاسه گل هیچ اثری از کرک مشاهده نگردید که در تائید مطالعات نژاد فلاطوری و همکارانش (۲۰۱۵) است. با مقایسه این گونه با سایر گونه‌هایی که در مناطق گچ‌زی رویش دارند نشان داد که این گونه به نوعی گچ را در ساختار خود می‌پسندد هر چند که وجود ایدیوبلاستها در بافتهای برگ نشان از این دارد که گویی گیاه قصد دارد از شر کلسیم اضافی خود را نجات دهد اما تعداد محدود این‌ها نسبت به سایر گونه‌های اندمیک ترکیه که در بالا ذکر شد و همچنین نبود کرک‌هایی با کریستال‌های گچی که در گونه

هایی گچزی این منطقه مانند گون گچی و گون سمناهی مشاهده شد (Rabizadeh et al., 2018 & 2019). نشان از این دارد که این گونه به نوعی در ساختارهای خود از ترکیبات گچ بهره برده و کمتر آن را به صورت کریستال در بافتهای برگ و کرکهای سطح برگ از خود خارج می کند. مطالعه بوم شناختی، ریخت شناختی، تشریحی و ریز ریخت شناختی این گونه با اطمینان بالا نشان می دهد که گونه *Gypsophila mucronifolia* واقعاً گچ دوست است.

منابع

- Amini, E., Zarre, SH. And Assadi, M. (2011). Seed micro-morphology and its systematic significance in *Gypsophila* (Caryophyllaceae) and allied genera. *Nordic Journal of Botany*, 29: 660- 669.
- Armagan, M. and Ozgokce, F. (2018). Anatomical, palynological morphological, karyological, and ecological investigations on *Gypsophila davisii*. *Anatolian journal of Botany*, 2(1): 39-45.
- Barkoudah, Y.I. (1962). A Revision of *Gypsophila*, *Bolanthus*, *Ankyropetalum* and *Phryna*. *Wentia*, 9: 1-203.
- Boissier, E. (1867). *Flora orientalis*. Vol. I: 534-559. Genevae.
- Bittrich, V. (1993). Caryophyllaceae. In: Kubitzki, K. et al. (eds), *The families and genera of vascular plants*. Vol. 2, Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Springer, pp. 206-236.
- EIG, A. (1926). Contribution to the Knowledge of the Flora of Palestine. *Agr. And Nat. Hist. Bull.* 4.
- Gary, G.C. (2009). Diversity and distribution of idioblasts producing calcium oxalate crystals in *Dieffenbachia seguine* (Araceae). *American Journal of Botany*, 96 (7): 1245–1254.
- Kruckeberg, A.R. and Rabinowitz, D. (1985). Biological aspects of rarity in higher plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 16:447-479.
- Korkmaz, M. and Ozcelik, H. (2011). Economic importances of *Gypsophila* L., *Ankyropetalum* Fenzl and *Saponaria* L. (Caryophyllaceae) taxa of Turkey. *African J. Biotech*, 10: 9533-9541.
- Mabberley, D.J. (2008). *Mabberley's Plant-Book*. Third edition. Cambridge University Press, NewYork.
- Meyer, S.E. (1986). The ecology of gypsophile endemism in the eastern Mojave desert. *Ecology*, 67: 1303–1313.
- Moradi, M., Imani, F., Naji, H. R., Moradi Behbahani, S. ,Ahmadi, M.T. (2016). Biogeosciences and Forestry Variation in soil carbon stock and nutrient content in sand dunes after afforestation by *Prosopis juliflora* in the Khuzestan province (Iran). *Biogeosciences and Forestry* Biogeosciences . Short Communicationdoi: doi: 10.3832/for2137-010, pp. 585-589vol.
- Nejad Falatoury, A., Assadi, M. and Ghahremaninejad, F. (2015). Taxonomic significance of indumentum in the genus *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae). *Nova Biologica Reperta* , Vol. 2 (2): 91-102.
- Ozdemir, C., Ozkan, M. and Kandemir, A. (2010). The morphological and anatomical properties of *gypsophila lepidioides boiss* (aryophyllaceae) endemic to Turkey. *International Research Journal of Plant Science* Vol. 1 (4) pp. 069-074.
- Sumaira, S., Mir, A. K., Akbar, A. M. and Asma, J. (2008). Pollen morphology of the Genus *Silene* (*Silene*Caryopyllaceae) from Pakistan. –*Biol. Diversity Conservation (Biodicon)*, 1: 74-85.

- Rabizadeh, F., Zare-Maivan, H. and Kazempour Sh.(2018). Endemic gypsophytes composition delimited by soil properties and altitude: From calciphytes to halophytes in the south–central Alborz Ranges. *Nordic Journal of Botany*, e01568.
- Rabizadeh, F., Zare-Maivan, H. and Kazempour Sh.(2018). Ecological-anatomical comparative adaptability of two gypsophylic *Astragalus* species of gypsum soils. *Nova Biologica Reperta* 6(2): 241-253.
- Rechinger, K.H. (1988). *Gypsophila*. In: Rechinger, K. H. (ed), *Flora Iranica*. Vol. 163. Akad. Druck- und Verlagsanstalt, pp.206- 246.
- Williams, F.N. (1889). A revision of the genus *Gypsophila*. *J. of Bot.* 27: 321-329.1

Ecological, Anatomical, Morphological, and Micro-Morphological Characteristics of *Gypsophila mucronifolia* (Caryophyllaceae) endemic to gypsic soils of Semnan, Iran

F. Rabizadeh*¹

Received: 2019.6.26

Accepted: 2019.12.7

Abstract

Gypsophila mucronifolia Rech. Is an endemic plant species of Caryophyllaceae that It has been reported from gypsum deserts around Semnan, Iran. A few reports have been made on the distribution of *G. mucronifolia* in relation to its descriptive compromise characteristics with soil and altitude factors. Ecological studies of *G. mucronifolia* were performed for the first time. This species grows at altitudes of 1500 to 1800 meters from sea level, often on the northern slopes. Using Canoco for windows 4.5 software and statistical analyzes of RDA, the effect of environmental factors on the distribution of *G. mucronifolia* was determined. Elevation and gypsum contents showed positive correlation and content of CaCO₃ and Na negative correlation with occurrence and growth of *G. mucronifolia*. The leaf surface with a scanning electron microscope (SEM) has studied that show glandular hairs on stem and leaves it there, but did not observe on the calyx. Leaf cells of *G. mucronifolia* are filled with druse crystals.

Keywords: *Idioblast*, *Leaf*, *Hair*, *Gypsophyte*.

1-Department of Biology, Women's University of Semnan (Farzanegan), Semnan, Iran

*(Corresponding author: Rabizadeh@fgusem.ac.ir)

بررسی اثر نانوذرات سیلیکون بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی بنه‌های زعفران (*Crocus sativus*)

بهاره زارعی^۱، خدیجه کیارستمی^{۲*}، منیر حسین زاده نمین^۳، منا صراحی نوبر^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۳

چکیده

نانوذرات سیلیکون دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متمایزی هستند که از طریق ورود به گیاهان بر متابولیسم گیاه تاثیر گذاشته و موجب بهبود رشد و عملکرد گیاه در شرایط محیطی نامطلوب می‌شوند. این تحقیق به منظور بررسی اثرات فیزیولوژیک نانوسیلیکون بر روی بنه زعفران انجام شد. گیاهان با نانو ذره سیلیکون در دو غلظت ۹ و ۱۸ میلی گرم بر لیتر تیمار و مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه بار تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار با نانوسیلیکون محتوای عناصری از جمله سیلیکون، پتاسیم، آهن، روی، منیزیم و کلسیم را افزایش داد. اما تفاوت معنی‌داری بر وزن تر و خشک و همچنین محتوای پروتئین مشاهده نشد ولی تعداد بنه‌های دختری در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین محتوای پرولین و مالون دی آلدئید به طور معنی‌داری در بنه‌های زعفران تحت تیمار افزایش یافت. بیشترین میزان فنل و فلاونوئید، به ترتیب در گیاهان تیمار شده با غلظت های ۹ و ۱۸ میلی گرم بر لیتر نانوسیلیکون مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت تیمار با نانو ذرات سیلیکون می‌تواند محتوای تغذیه ای بنه زعفران و ظرفیت سیستم پاداکسایشی را از طریق تولید متابولیت های ثانوی افزایش دهد.

واژه های کلیدی: ترکیبات فنلی، سیستم پاداکسایشی، *Crocus sativus*.

مقدمه

امروزه محققان به دنبال روش‌های جدید، جهت افزایش عملکرد گیاهان هستند. کاربرد فناوری نانو در علوم گیاهی یکی از موضوعات جدید و به روز بوده که تحقیقات در این زمینه در حال گسترش است. تاکنون بسیاری از اثرها و کارکردهای نانومواد بر سازوکارهای فیزیولوژیک، متابولیک و افزایش عملکرد گیاهان مطالعه شده است و البته همچنان جنبه‌های ناشناخته‌ی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

۳- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۴- ستادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

بسیاری باقی است. همچنین با توجه به روند افزایشی تولید نانوذرات و استفاده روزافزون از آنها در صنایع مختلف، احتمال ورود آنها به اکوسیستم‌های مختلف افزایش یافته است. از این رو، ارزیابی اثرات آنها بر جنبه‌های مختلف حیات موجودات زنده ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از نانوذرات در کشاورزی، از مسائل جالب و مورد توجه در جهت به حداقل رساندن استفاده از کودهای شیمیایی و بهبود رشد و عملکرد و کیفیت محصول می‌باشد (Majumder *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Siddiqui & Al-Whaibi, 2014).

سیلیکون (Si) یکی از فراوان‌ترین عناصر موجود در پوسته‌ی زمین است که اثرات سودمند و مفید آن بر رشد گیاهان در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Rastogi *et al.*, 2019). مطالعات نشان می‌دهد؛ سیلیکون در افزایش تحریک تولید یا فعالیت برخی آنزیم‌های پاداکساینده، کاهش حساسیت به برخی بیماری‌های قارچی، ایجاد مقاومت به بیماری‌های گیاهی، تحمل تنش‌های خشکی، شوری و فلزات سنگین از طریق فعال کردن آنزیم‌های پاداکسایشی و بهبود شاخص‌های کمی و کیفی محصولات کشاورزی نقش مهمی را ایفا می‌کند (Mitani *et al.*, 2008).

نانوذرات دارای پتانسیل زیادی جهت افزایش متابولیسم گیاه می‌باشند. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که استفاده از غلظت‌های مناسب نانوذرات می‌تواند در افزایش رشد و بهبود کیفیت محصولات نقش مهمی را ایفا نماید (Sharma *et al.*, 2012). Kaveh *et al.*, 2013; Vannini *et al.*, 2013؛ استفاده از نانوذرات سیلیکون، به دلیل این ویژگی که می‌تواند به راحتی به درون سلول‌های گیاهی وارد شده و رشد و نمو را از طریق متابولیسم گیاه تحت تاثیر قرار دهند؛ می‌توانند در بهبود کشاورزی و تولید محصولات با کیفیت موثر واقع شوند (Cui *et al.*, 2017). نانوذرات سیلیکون همچنین می‌توانند به عنوان آفت کش، علف کش و کود مورد استفاده قرار گیرند و بنابراین دارای پتانسیل خوبی در بهبود کشاورزی هستند (Rastogi *et al.*, 2019). اثرات مثبت نانوذرات سیلیکون بر رشد و عملکرد گیاهان مختلف گزارش شده است که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: نانو ذرات سیلیکون، شرایط بهتری برای رشد گیاه گوجه فرنگی در شرایط تنش شوری فراهم آوردند و رشد ریشه و نوساقه را بهبود بخشیدند (Haghighi *et al.*, 2012). نانو ذرات سیلیکون اثرات منفی تنش شوری را بر وزن تر، غلظت کلروفیل، نرخ فتوسنتز و محتوای آب برگ گیاه سیب زمینی کاهش دادند (Haghighi & Pessarakli, 2013). افزودن نانو ذرات سیلیکون همراه با کروم (VI) دانه‌رست‌های نخود فرنگی را در مقابل سمیت کروم محافظت کرد (Tripathi *et al.*, 2015). اسپری برگی نانو سیلیکون به همراه نانو سلنیوم، رشد و کیفیت بذر، زیتوده و محتوای سلنیوم را در گیاه برنج افزایش داد (Hussain *et al.*, 2020).

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) از سرده زعفران، تیره زنبقیان (Iridaceae) و راسته مارچوبه‌ای‌ها است که ۸۵ گونه دارد (رستمی و محمدی، ۱۳۹۱) و از نظر اقتصادی و ارزش صادراتی دارای جایگاه بسیار مهمی در کشاورزی کشور ما می‌باشد. زعفران یک گیاه ژئوفیت است که گل‌دهی آن در فصل پاییز صورت می‌گیرد (Molina *et al.*, 2004). مراحل رشد و

نمو زعفران متأثر از عوامل محیطی و فیزیولوژی بنه است. بنه منبع ذخیره مواد فتوسنتزی است و گیاه بعد از مرحله خواب و در مراحل اولیه رشد از این ذخایر فتوسنتزی استفاده می‌کند. تنها راه تکثیر گیاه از طریق این اندام می‌باشد؛ بنابراین نقش محوری در چرخه‌ی زندگی زعفران بازی می‌کند (Saeidian, 2006). Amirshakari و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای با کاربرد بنه‌هایی با اندازه متفاوت نشان دادند که بنه‌های با اندازه بزرگ، تعداد و وزن خشک برگ را افزایش می‌دهند. همچنین وزن بنه مادری تأثیر زیادی بر تعداد گل‌های زعفران دارد و با افزایش وزن بنه مادری، بر تعداد گل‌های تولیدی افزوده می‌شود (Vurdu, 2003). مطالعات نشان می‌دهد کاربرد صحیح عناصر غذایی در رشد بنه دختری و عملکرد گل زعفران دارای اهمیت ویژه‌ای است (Amirshakari et al., 2007).

عاصمه و پوراکیبر (۱۳۹۷) اثر نانوذرات سیلیکون توام با تیمار شوری را بر برخی فاکتورهای رشدی در گیاه زعفران بررسی کردند. آنها نشان دادند؛ کاربرد نانوسیلیکون از طریق محلول پاشی توانست، تا حدود زیادی اثرات منفی ناشی از تنش شوری بر فاکتورهای رشدی را بهبود بخشد.

با توجه به اینکه گزارش‌های اندکی از اثر نانوسیلیکون و دیگر نانوذرات بر زعفران وجود دارد و از طرفی طبق پژوهش‌های انجام شده اثرات مثبت آنها بر انواع گیاهان گزارش شده است، برآن شدیم تا اثر نانوذرات سیلیکون را بر بنه زعفران بررسی کنیم. در پژوهش حاضر، اثر دو غلظت نانوسیلیکون در مرحله رویشی زعفران بر رشد، پارامترهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و محتوای عناصر جذب شده در بنه زعفران -به‌عنوان گیاه غیر تجمع‌کننده سیلیکون- مورد مطالعه قرار دادیم تا با توجه به اثرات گزارش شده نانوذرات سیلیکون در افزایش رشد و بهبود محصول و اثرات آن به عنوان آفت‌کش و کود، امکان استفاده از نانو ذرات سیلیکون را در بهبود کمی و کیفی محصول زعفران و امکان استفاده از آن در ارتقای کیفیت محصول این گیاه مهم زراعی را مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش

تهیه نانو سیلیکون

محلول نانو سیلیکون از شرکت شمس ایرانیان با مشخصات اندازه ذرات ۱۰-۲ نانومتر تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۹ و ۱۸ میلی گرم در لیتر از آن تهیه و به منظور مطالعه بر گیاه زعفران مورد استفاده قرار گرفت.

جمع آوری نمونه

بنه‌های زعفران در ابتدای مرحله رویشی از منطقه تربت حیدریه جمع آوری و بلافاصله به گلخانه انتقال یافتند. بنه ها در تاریخ ۱۹ آذر ماه ۱۳۹۷ به تعداد ۳ عدد در هر گلدان، با حجم ۳/۵ لیتر با ترکیب ۱/۵ واحد خاک و ۰/۵ واحد کود حیوانی، کاشته شدند و دو تیمار آبیاری با آب محتوی ۹ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون (تیمار ۱- T1) و ۱۸ میلی گرم در

لیتر (تیمار - T2) اعمال شد. نمونه‌های شاهد (CO) با آب معمولی آبیاری شدند (Tripathi et al., 2015; Hussain et al., 2012; Haghghi et al., 2020). هر تیمار با ۱۰ تکرار در شرایط گلخانه‌ای دمای ۲۵ درجه و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تیمارهای نانوسیلیکون در دو نوبت با فاصله‌ی زمانی یک ماه اعمال شدند. بعد از سه ماه، بنه‌ها از خاک خارج و به منظور بررسی پارامترهای رشد و فیزیولوژیک در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

محتوای عناصر

به این منظور ۰/۵ گرم از بافت گیاهی خشک، که حاصل از پودر خشک حداقل ۱۰ گیاه بود، در لوله‌های تفلونی حاوی اسید هیدروفلوئوریک، پیرکلریک، نیتریک و هیدروکلریک اسید (هرکدام به میزان ۵ میلی لیتر)، ریخته شد و تمامی نمونه‌ها در محفظه Hotplate در دمای ۲۲۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۴ ساعت قرار گرفت تا هضم کامل نمونه‌ها و تبخیر انجام گیرد (Ali et al., 1988). پس از آن نمونه‌ها در دمای محیط خنک شده و با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد؛ تا آماده خوانش دستگاهی با دستگاه ICP-MS (Model: ICP-MS HP series 4500) شوند.

مطالعه‌ی محتوای پروتئینی

پروتئین کل با استفاده از بافر فسفات سدیم با pH=6.8 استخراج و به روش برادفورد تعیین مقدار گردید (Bradford, 1976).

سنجش پرولین آزاد

برای سنجش پرولین آزاد از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱ گرم از نمونه خشک بنه درون هاون با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید 3 درصد تا یکنواخت شدن کامل (به مدت 5 دقیقه) ساییده شد. سپس با سرعت rpm 3500 سانتریفیوژ و حجم روشناور تعیین گردید. از روشناور حاصل ۲ میلی لیتر برداشت شد و به همراه ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال در لوله آزمایش به مدت یک ساعت در حمام آب جوش (دمای 100 درجه سیلیسیوس) قرار گرفت و بعد جهت رسیدن محلول به دمای محیط، بلافاصله به حمام یخ انتقال یافت. سپس به هر لوله میزان ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه و به مدت 20 تا 30 ثانیه ورتکس شد. جذب فاز بالایی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل LE80K در طول موج 520 نانومتر خوانده شد.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

به منظور سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بر اساس میزان مالون دی آلدئید (MDA) تولیدشده، از روش Heath & Packer (۱۹۶۸) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۰/۳ گرم بافت تر توسط ۵ میلی لیتر TCA (تری کلرواستیک

اسید) ۰/۰۱ درصد استخراج شد. سپس عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در 13000 rpm سانتریفوژ شد. در مرحله بعدی به ۰/۵ میلی لیتر از محلول روشن‌آور مقدار ۱ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سیلسیوس قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت سرد گردید. بعد از این مراحل، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط با سرعت 13000 rpm سانتریفوژ شد. در نهایت جذب محلول رویی حاصل از سانتریفوژ در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار مالون دی آلدئید (با ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی مول بر سانتی متر) براساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید.

استخراج و سنجش ترکیبات فنلی و سنجش فلاونوئید کل

برای تعیین محتوای ترکیبات فنلی، ۰/۱ گرم از پودر نمونه خشک بنه در ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سیلسیوس استخراج شد و محتوای ترکیبات فنلی بر طبق روش Ranganna (۱۹۸۶) با استفاده از معرف فولین-دنیس اندازه‌گیری شد.

برای تعیین فلاونوئید کل، ۱ میلی لیتر از محلول استخراج شده با متانول با ۰/۲ میلی لیتر محلول کلرید آلومینیوم (۱۰٪ (وزنی/حجمی) در متانول، ۰/۲ میلی لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۵/۶ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و جذب در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. داده خروجی به صورت میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Grand et al., 1994).

آنالیز آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

دو ماه پس از آغاز آزمایش، بنه‌های دختری با اندازه مختلف تشکیل شد (شکل ۱). بررسی محتوای نانوذرات سیلیکون در بنه‌های دختری نشان دهنده افزایش محتوای سیلیکون در بنه‌های تحت تیمار، نسبت به نمونه‌های شاهد بود (جدول ۱). بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز ICP-MS، محتوای عناصر کلسیم، پتاسیم، سیلیکون، روی، منیزیم و آهن تحت تیمار با نانوسیلیکون افزایش یافت و بالاترین افزایش مربوط به کلسیم (از ۸۰۴ میکروگرم بر گرم در نمونه‌ی شاهد به ۲۲۸۳ میکروگرم بر گرم در تیمار ۱) بود که مقدار آن در تیمار ۱ نسبت به شاهد بیش از ۲/۸ برابر بود (جدول ۱).



شکل ۱: نمایی از ایجاد بنه های دختری در نمونه های زعفران دو ماه پس از کاشت

جدول ۱: مقادیر عناصر اندازه گیری شده در بنه های دختری تحت تأثیر غلظت های مختلف نانوسیلیکون

نمونه شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
μg/g d.w	μg/g d.w	μg/g d.w
Si	۱۶۷/۲۵	۱۷۸/۱۸
B	۱۱۱/۸۵	۱۱۰/۱۲
Ca	۸۰۴/۶۴	۲۲۸۳/۶۵
Fe	۲۹۰۲/۳۶	۲۹۳۸/۴۰
K	۸۹۶۷/۳۲	۹۰۸۰/۰۹
Zn	۱۷/۶۰	۱۹/۱۴
Mn	۸/۴۸	۸/۵۲
Mg	۳۳۶/۴۸	۴۴۳/۲۷

تیمار ۱: تیمار آبیاری با آب محتوی ۹ میلی گرم در لیتر و تیمار ۲: آبیاری با آب محتوی ۱۸ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون می باشد. اعداد مربوط به اندازه گیری محتوای عناصر در نمونه های مخلوط شده از ۱۰ نمونه گیاه می باشد.

در نمونه های تحت تیمار ۲ نانوسیلیکون، تعداد بنه های دختری به طرز معنی داری افزایش یافت. در سایر پارامترهای رشد از جمله وزن تر، وزن خشک و اندازه بنه های دختری تغییر معنی داری تحت تیمار نانوسیلیکون مشاهده نشد (جدول ۲).

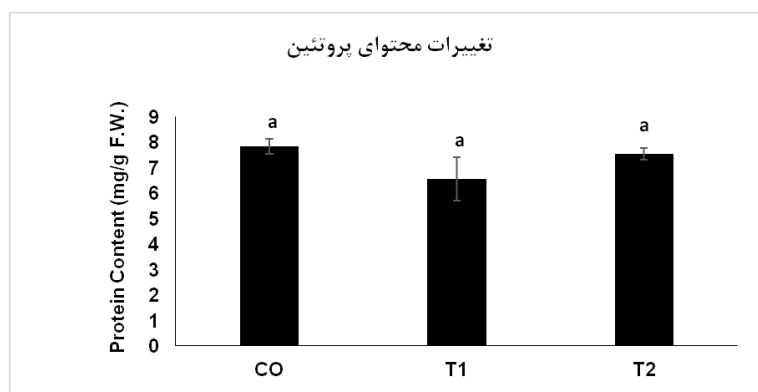
جدول ۲: برخی از شاخص های رشد در بنه های دختری گیاه زعفران تحت تأثیر غلظت های مختلف نانوسیلیکون

نمونه شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
تعداد بنه های دختری	۵/۰ ± ۸/۹۲b	۷/۱ ± ۶/۴۳a
وزن تر بنه های دختری (گرم)	۱/۰ ± ۸۷/۴a	۱/۰ ± ۶۲/۲۰a
وزن خشک بنه های دختری (گرم)	۱/۰ ± ۴۸/۱۴a	۱/۰ ± ۳۵/۱۱a
اندازه (سانتیمتر)	۱/۰ ± ۵۵/۱۵a	۱/۰ ± ۴۸/۲۳a

تیمار ۱: آبیاری با آب محتوی ۹ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون و تیمار ۲: آبیاری با آب محتوی ۱۸ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون می باشد. اعداد در هر ردیف معرف میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف ناهمسان در هر ردیف معرف تفاوت معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ براساس آزمون دانکن می باشد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود؛ نانوذره سیلیکون منجر به تغییر معنی داری در محتوای پروتئینی بنه‌ها

نشده است.



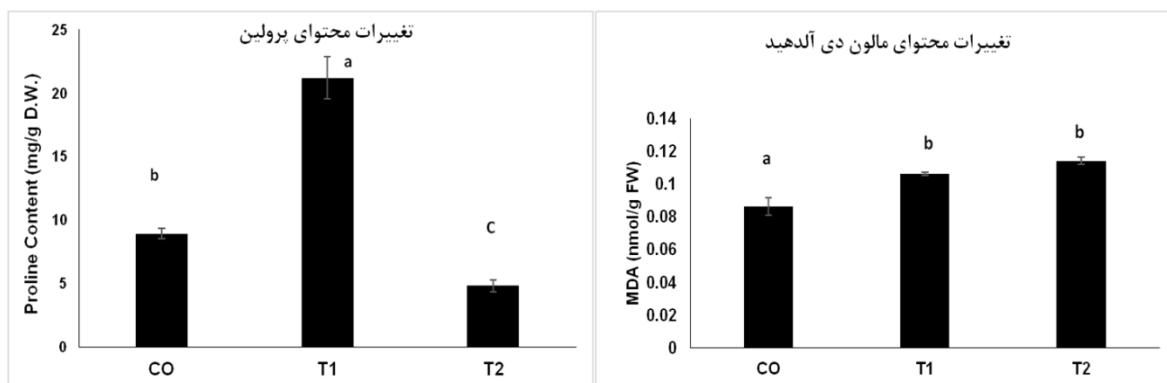
شکل ۲: تغییرات محتوای پروتئین نمونه‌های بنه دختری زعفران تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوسیلیکون (T1: تیمار آبیاری با آب محتوی ۹ میلی گرم در لیتر و T2: آبیاری با آب محتوی ۱۸ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون می باشد). اعداد میانگین $\pm$ خطای استاندارد سه بار تکرار بوده حروف همسان تفاوت غیرمعنی دار را در سطح $P \leq 0.05$ براساس آزمون دانکن نشان می دهد.

مطالعه‌ی تغییرات مقدار پرولین حاکی از آن است که تیمار بنه‌ها با نانوسیلیکون در غلظت ۹ میلی گرم در لیتر (تیمار

۱)، موجب افزایش معنی‌دار محتوای این اسیدآمین به نسبت به شاهد شد در حالی که محتوای آن در تیمار با غلظت ۱۸ میلی گرم

در لیتر از نانوسیلیکون نسبت به شاهد و تیمار ۱ به شکل معنی‌داری کاهش نشان داد. بررسی روند تغییرات مالون دی آلدئید

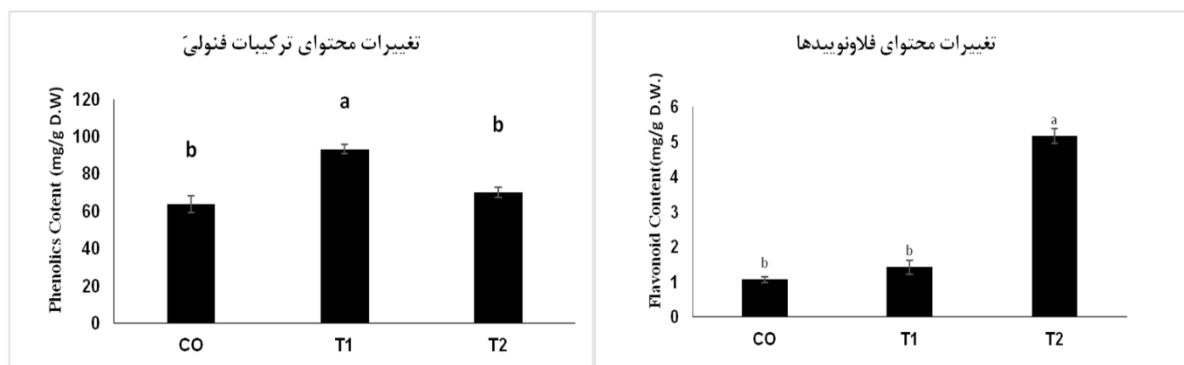
نیز نشان داد؛ محتوای این ترکیب در هر دو تیمار به صورت معنی داری نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات محتوای پرولین و مالون دی آلدئید در نمونه‌های بنه دختری زعفران تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوسیلیکون (تیمار ۱: تیمار آبیاری با آب محتوی ۹ میلی گرم در لیتر و تیمار ۲: آبیاری با آب محتوی ۱۸ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون می باشد). اعداد میانگین $\pm$ خطای استاندارد سه بار تکرار بوده، حروف غیرهمسان تفاوت معنی دار را در سطح $P \leq 0.05$ براساس آزمون دانکن نشان می دهد.

بر اساس نتایج، تیمار ۱ نانوسیلیکون سبب افزایش معنی‌دار محتوای ترکیبات فنولی شد. مقدار فلاونوئید کل تحت

تأثیر تیمار ۱ قرار نگرفت اما در تیمار ۲ بیش از سه برابر نمونه شاهد افزایش یافت (شکل ۴).



شکل ۴: تغییرات محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئید کل و در نمونه‌های بنه دختری زعفران تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوسیلیکون (تیمار ۱: تیمار آبیاری با آب محتوی ۹ میلی‌گرم در لیتر و تیمار ۲: آبیاری با آب محتوی ۱۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون می‌باشد). اعداد میانگین $\pm$ خطای استاندارد سه بار تکرار بوده، حروف غیرهمسان تفاوت معنی دار را در سطح $P \leq 0.05$ براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

بحث

اثرات نانوذرات بر رشد گیاه، وابسته به شرایط و همچنین گونه گیاهی است. در بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر روی گونه‌های گیاهی مشخص شده است؛ نانوذرات سیلیکون بدون تاثیر یا دارای تاثیر مثبت بر پارامترهای رشد گیاه هستند که این نتایج در گیاهان نخودفرنگی، برنج، سیبزمینی، گوجه‌فرنگی و باقلا گزارش شده است (Haghighi *et al.*, 2012; Haghighi & Pessarakli, 2013; Hussain *et al.*, 2020; Tripathi *et al.*, 2015; Roohizahed *et al.*, 2015). این موضوع در نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر نیز مشهود بود به‌طوری که پارامترهای رشدی گیاه از جمله وزن تر، وزن خشک و ابعاد بنه تحت تاثیر تیمار با نانو سیلیکون قرار نگرفت، درحالی که تعداد بنه‌های دختری افزایش یافت. محتوای پروتئین محلول نیز که به عنوان یک شاخص مهم برای رشد و فعالیت طبیعی گیاه مطرح است در گیاه در معرض نانوذره سیلیکون تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداد که می‌تواند نشان دیگری از عدم وجود اثر سمی نانوذره سیلیکون بر سلول در سطح پروتئینی باشد. این شواهد نشان می‌دهد دست کم در غلظت‌های استفاده شده در تحقیق حاضر، نانو سیلیکون فاقد اثرات سمی برای زعفران بوده است.

محققان بر این باورند که سیلیکون با افزایش کشش و گسترش دیواره‌های اولیه سلولی باعث بهبود رشد گیاهان می‌شود (Epstein, 2009). داده‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیمار نانوسیلیکون موجب افزایش محتوای سیلیکون در بنه زعفران شده است. توجه به این نکته ضروری است که با وجود اینکه سیلیکون دومین عنصر فراوان پس از اکسیژن در پوسته‌ی زمین می‌باشد اما بیشتر آن به شکل سیلیکات‌های معدنی بوده و برای جذب در دسترس گیاه قرار ندارد (Struyf *et al.*, 2010). مطالعه‌ی صورت گرفته توسط نظرعلیان و همکاران (۱۳۹۵)، در گیاه شبلیله نیز نشان داد تیمار نانوسیلیکون (در غلظت ۰/۵ تا ۲/۵ میلی‌مولار) باعث افزایش محتوای سیلیکون در گیاه می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. فاطمی و همکاران

(۱۳۸۸)، اسدی و همکاران (۱۳۹۳)، بهتاش و همکاران (۱۳۸۹) و Takahashi & Miyake (۱۹۸۳) نتایج مشابهی را در مورد اثر مثبت کاربرد تیمارهای مختلف سیلیکون بر محتوای آن به ترتیب در گیاهان توت‌فرنگی، گندم، چغندر و خیار گزارش کرده‌اند.

تأثیر مثبت تیمار نانوسیلیکون بر رشد و بویژه تعداد بنه‌های دختری زعفران، همچنین ممکن است ناشی از تأثیرات مثبت آن بر افزایش محتوای سایر عناصر بوده باشد. در مطالعه‌ی حاضر، افزایش محتوای کلسیم نسبت به نمونه شاهد، در بنه‌هایی که تحت تیمار نانوسیلیکون قرار گرفته بودند نیز مشاهده گردید. افزایش مقدار کلسیم در نتیجه‌ی تیمار سیلیکون در گیاه جو و برنج نیز گزارش شده است (Liang *et al.*, 1996; Islam & Saha, 1969). سازوکار فیزیولوژیک اثر سیلیکون بر جذب و انتقال کلسیم در گیاهان روشن نیست.

محتوای پتاسیم نیز تحت تأثیر تیمار نانوسیلیکون در بنه‌های زعفران افزایش نشان داد. Liu و همکاران (۲۰۰۹) و Miao و همکاران (۲۰۱۰) به ترتیب افزایش غلظت پتاسیم در اندام هوایی گیاه یونجه و برگ، ساقه و ریشه گیاه سویا در اثر کاربرد سیلیسیم را گزارش کردند. Liang (۱۹۹۹) افزایش فعالیت پمپ $H^+ - ATPase$ غشای پلاسمایی ریشه در اثر کاربرد سیلیسیم را عامل احتمالی افزایش جذب پتاسیم توسط گیاه معرفی کرد. همچنین مطالعات، ارتباط نزدیکی بین سیالیت غشا و فعالیت $H^+ - ATPase$ غشای سلولی را گزارش داده است، به نظر می‌رسد؛ سیلیکون از طریق افزایش سیالیت غشا می‌تواند بر فعالیت این پمپ تأثیر بگذارد (Leidi *et al.*, 1991).

در مطالعه‌ی حاضر افزایش محتوای روی در اثر تیمار نانوسیلیکون در بنه‌ی زعفران مشاهده گردید. عنصر روی در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه، شامل فعال‌سازی آنزیم‌ها، سنتز پروتئین، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، بیان ژن و تنظیم و نمو زایشی دخالت دارد (Chang *et al.*, 2005). یوسفی و اثنی عشری (۱۳۹۴) نشان دادند؛ تیمار میکرو و نانوذرات سیلیسیم محتوای عنصر روی را در گیاه توت‌فرنگی افزایش می‌دهد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر با افزایش غلظت نانوسیلیکون، مقدار آهن جذب شده در بنه‌های زعفران نسبت به شاهد افزایش یافت. یوسفی و اثنی عشری (۱۳۹۴) با مطالعه بر روی تأثیر میکرو و نانوذرات سیلیسیم بر غلظت عناصر گیاه توت‌فرنگی دریافتند؛ تیمار سیلیسیم با افزایش محتوای آهن در اندام‌های هوایی گیاه همراه است که با نتایج پژوهش حاضر منطبق است. Pavlovic و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش دادند که افزودن سیلیس به محلول غذایی گیاه خیار از طریق تنظیم سطوح بیان ژن پروتئین‌ها و در نتیجه آن افزایش میزان تحرک آهن باعث افزایش جذب آهن در گیاه خیار گردید. Gottardi و همکاران در سال ۲۰۱۲ افزایش محتوای آهن در نتیجه کاربرد سیلیسیم را گزارش کردند و با بررسی بیان ژن به این نتیجه رسیدند که جذب آهن در گیاهان تیمار شده با سیلیسیم مربوط به افزایش فعالیت و فراوانی رونوشت ژن Fe- chelate reductase در ریشه می‌باشد.

به طور کلی مطالعات نشان داده است که کاربرد سیلیکون جذب عناصر غذایی نظیر روی، کلسیم، پتاسیم، فسفر و بور در گیاهان مختلف را افزایش می‌دهد (Mehrabanjoubani *et al.*, 2015). این موضوع با توجه به اهمیت این عناصر در فیزیولوژی و تغذیه گیاه بسیار با اهمیت است و می‌تواند جنبه‌های مختلف حیات گیاه را تحت تاثیر قرار دهد.

مطالعات زیادی نشان می‌دهد که نانو ذرات می‌توانند از طریق تاثیر بر تولید رادیکال‌های آزاد منجر به ایجاد تنش در گیاهان شوند (Kumar *et al.*, 2018). هنگامی که تولید رادیکال‌ها از میزان حذف آنها بیشتر است، تنش اکسایشی در گیاهان رخ می‌دهد که منجر به آسیب DNA، پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌شود (Hashemi, 2019). شاخص کلیدی تنش اکسایشی، پراکسیداسیون لیپیدها است. اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشای سلولی، از مهم‌ترین هدف‌های رادیکال‌های آزاد هستند. نتایج به دست آمده در این مطالعه حاکی از افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید تحت تیمار نانوسیلیکون می‌باشد. افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی (Imtiaz *et al.*, 2016) و همچنین کاهش آسیب‌های اکسایشی از طریق القای سیستم دفاعی پاداکسایشی، از اثرات تایید شده نانوسیلیکون در گیاهان است (Shi *et al.*, 2014). طبق مطالعات Qados (۲۰۱۵) در گیاه باقلای تحت تنش شوری، تیمار نانوسیلیکون در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار (از ۲۸ تا ۸۴ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش سطح MDA گردید که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارد. دلیل این عدم تطابق می‌تواند؛ تفاوت غلظت مورد استفاده، نوع گیاه، نوع اندام مورد مطالعه و سن و مرحله رویشی باشد.

به دنبال ایجاد تنش‌های اکسایشی در گیاهان سیستم‌های پاداکسایشی آنزیمی و غیرآنزیمی برای حذف آنها فعال می‌شود. اسمولیت‌های سازگار از جمله پرولین به‌عنوان سیستم پاداکسایشی غیرآنزیمی نقش مهمی در جابجایی انواع فعال اکسیژن بر عهده دارند. پرولین می‌تواند در اعمالی از جمله تنظیم پتانسیل ردوکس سلول، تثبیت فسفولیپیدهای غشا، تنظیم pH سلول، حفظ پروتئین‌ها و محافظت از آنزیم‌ها در مقابل دنا توره شدن نقش داشته باشد (Chen & Murata, 2002). در مطالعه حاضر محتوای پرولین تحت تیمار ۹ میلی‌گرم در لیتر نانو سیلیکون افزایش بسیار معنی‌داری داشت. نتایج مشابهی نیز توسط Crusciol و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در گیاه سیب زمینی گزارش شده است که طبق آن نانوذره‌ی سیلیکون محتوای پرولین را در گیاه سیب‌زمینی افزایش داده است. اما در تیمار ۱۸ میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیکون، تفاوت معنی‌داری در محتوای پرولین رخ نداد که دلیل احتمالی آن می‌تواند؛ استفاده گیاه از سیستم‌های پاداکسایشی دیگر مانند آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی باشد که در گیاه نخودفرنگی تحت تیمار ۰/۱ میلی‌مولار و در گیاه باقلا تحت تیمار ۱ تا ۳ میلی‌مولار نانوسیلیکون نیز گزارش شده است (Qados, 2015 و Tripathi *et al.*, 2015).

ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی مهارکننده‌های قوی تنش اکسایشی هستند و در همکاری با آنزیم‌های پاداکسایشی در جمع‌آوری یا حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن شرکت می‌کنند (Kováčik *et al.*, 2009). این ترکیبات با داشتن گروه‌های آزاد هیدروکسیل متصل به حلقه‌ی آروماتیک در روبشگری رادیکال‌ها از طریق فروکشی اکسیژن یکتایی آسیب‌های اکسایشی را

کاهش می‌دهند و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را محافظت می‌نماید. این ترکیبات همچنین با جلوگیری از عمل لیپواکسیژناز از اکسیدشدن لیپیدها جلوگیری می‌نمایند (Yanishlieva-Maslarova & Heinonen, 2001). در مطالعه‌ی حاضر، محتوای فنل کل در تیمار ۹ میلی گرم در لیتر و محتوای فلاونوئید در تیمار ۱۸ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون افزایش معنی داری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد که با نتایج حبیبی و عابدینی (۱۳۹۴) مبنی بر افزایش ترکیبات فنلی و تحریک سیستم دفاعی میوه‌ی آلو‌ی شابلون تحت تیمار ۵ گرم در لیتر سیلیکات مطابقت دارد. مطالعات Khanizadeh و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نیز نشان داد کاربرد سیلیکون سبب افزایش ترکیبات فنلی و تحریک سیستم دفاعی میوه‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری

غلظت‌های ۹ و ۱۸ میلی گرم بر لیتر نانوذره سیلیکون نه تنها اثر سمی بر بانه‌های زعفران نداشتند بلکه با افزایش محتوای برخی عناصر مغذی مانند پتاسیم، کلسیم، سیلیکون، آهن و منیزیم و همچنین تاثیر مثبت بر تعداد بانه‌های دختری می‌تواند در ارتقای کیفیت بانه زعفران موثر باشد. علیرغم افزایش نسبی مالون‌دی‌آلدئید که شاهده‌ی از ایجاد تنش اکسایشی در بانه‌های زعفران تحت تیمار نانوسیلیکون بود؛ القای تولید پرولین و افزایش محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها نیز می‌تواند سطح آمادگی گیاه را برای مقابله با تنش‌های محیطی افزایش دهد. این مطالعه بستر ابتدایی برای بررسی اثر نانوسیلیکون بر بانه‌های زعفران به‌منظور مشاهده اثرات بعدی آن بر کیفیت گلدهی و احتمالاً کیفیت محصول نهایی فراهم آورده است.

منابع

- اسدی، ا.، حقنیا، غ.، لکزیان، ا.، مفتون، م. (۱۳۹۳). تأثیر مقادیر مختلف سیلیسیم و نیتروژن بر خصوصیات مورفولوژی، عملکرد و اجزای عملکرد دو رقم گندم. نشریه زراعت (پژوهش و سازندگی) ۱۰۳: ۱۶۷-۱۷۸.
- بهتاش، ف.، طباطبایی، ج.، ملکوتی، م.، سرورالدین، م.، اوستان، ش. (۱۳۸۹). اثر کادمیم و سیلیسیم بر رشد و برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی چغندر لبویی. مجله دانش کشاورزی پایدار (۲۰): ۵۶-۵۳.
- پیوست، غ.، زارع بوانی، م.، سمیعزاده لاهیجی، ح. (۱۳۸۷). تأثیر سیلیسیم بر روی عناصر غذایی و نیترات در کاهو. مجله علوم باغبانی ایران (۱) ۳۹: ۱-۸.
- دهقانی پوده، ص. (۱۳۹۱). اثر سیلیکات پتاسیم و نانوسیلیکون روی رشد و نمو توت فرنگی تحت شرایط تنش آبی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۴ صفحه.
- رستمی، م.، محمدی، ه. (۱۳۹۱). بررسی اثر کاشت تراکم بانه بر رشد و عملکرد زعفران در شرایط اقلیمی ملایر. نشریه بوم شناسی کشاورزی. (۵) ۱: ۳۸-۲۸.
- حبیبی، ق.، عابدینی، م. (۱۳۹۴). اثر کاربرد سیلیکون بر مقدار فنل، سیستم آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در میوه‌های آلو‌ی شابلون انبار شده. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی. (۵) ۱۹: ۹۳-۱۰۰.

عاصمه، م.، پور اکبر، ل. (۱۳۹۵). اثر نانوذرات سیلیکات بر برخی فاکتورهای رشدی در گیاه زعفران تحت تنش شوری. نوزدهمین کنگره ملی و هفتمین کنگره بین المللی زیست شناسی ایران، تبریز، دانشگاه تبریز و انجمن زیست شناسی ایران.

فاطمی، س.، طباطبایی، م.، فلاحی، ا. (۱۳۸۸). اثر سیلیسیم بر رشد و عملکرد گیاه توت فرنگی در شرایط تنش شوری. مجله علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) (۲۳): ۱: ۸۸-۹۵.

نظر علیان، ص.، مجد، ا.، آیریان، س.، قهرمانی نژاد، ف.، نجفی، ف.، گرگر، م. (۱۳۹۵). تاثیر سیلیس و نانو ذرات سیلیس بر جوانه زنی بذر ها و رشد گیاه شنبلیله. فصلنامه زیست شناسی تکوینی. (۳): ۱: ۶۲-۵۳.

یوسفی، ر.، اثنی عشری، م. (۱۳۹۶). تأثیر میکرو و نانوذرات سیلیسیم بر غظت عناصر پرمصرف، کم مصرف و میزان سیلیسیم گیاه توت فرنگی در شرایط کشت بدون خاک. مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای. (۱): ۸: ۵۷-۷۱.

Ali, M., Zoltai, S. and Radford, F. (1988). A comparison of dry and wet ashing methods for the elemental analysis of peat. Canadian journal of soil science, 68(2), 443-447 .

Amirshakari, H., Sorooshzadeh, A., Modaress, A. and Jalali, M. (2007). Effects of root-zone temperature, corm size and gibberellin on vegetative growth of Saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Agriculture Science and Natural Resource, 14, 96-103 .

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1), 205-207 .

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2), 248-254 .

Chang, H.-B., Lin, C.-W. and Huang, H.-J. (2005). Zinc-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. Plant Growth Regulation, 46(3), 261-266 .

Chen, T. H. and Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology, 5(3), 250-257 .

Crusciol, C. A., Pulz, A. L., Lemos, L. B., Soratto, R. P. and Lima, G. P. (2009). Effects of silicon and drought stress on tuber yield and leaf biochemical characteristics in potato. Crop Science, 49(3), 949-954 .

Cui, J., Liu, T., Li, F., Yi, J., Liu, C. and Yu, H. (2017). Silica nanoparticles alleviate cadmium toxicity in rice cells: mechanisms and size effects. Environmental Pollution, 228, 363-369 .

Epstein, E. (2009). Silicon: its manifold roles in plants. Annals of Applied Biology, 155(2), 155-160 .

Grand, A. A., Vennat, B., Pourrat, A. and Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. Journal de pharmacie de Belgique, 49(6), 462-468.

Gottardi, S., Iacuzzo, F., Tomasi, N., Cortella, G., Manzocco, L., Pinton, R. and Dalla Costa, L. (2012). Beneficial effects of silicon on hydroponically grown corn salad (*Valerianella locusta* (L.) Laterr) plants. Plant Physiology and Biochemistry, 56, 14-23 .

Haghighi, M., Afifipour, Z. and Mozafarian, M. (2012). The effect of N-Si on tomato seed germination under salinity levels. Journal of Biological and Environmental Sciences, 6(16), 87-90 .

Hashemi, S. (2019). Effect of Nanoparticles on Lipid Peroxidation in Plants Lipid Metabolism: IntechOpen.

- Heath, R. L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198 .
- Hussain, B., Lin, Q., Hamid, Y., Sanaullah, M., Di, L., Khan, M. B. and Yang, X. (2020). Foliage application of selenium and silicon nanoparticles alleviates Cd and Pb toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Science of the Total Environment*, 712, 136497 .
- Islam, A. and Saha, R.C. (1969), Effects of silicon on the chemical composition of rice plants. *Plant Soil*, 30:446–458.
- Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Mushtaq, M. A., Ashraf, M., Shahzad, S. M., Yousaf, B. and Mehmood, S. (2016). Silicon occurrence, uptake, transport and mechanisms of heavy metals, minerals and salinity enhanced tolerance in plants with future prospects: a review. *Journal of Environmental Management*, 183, 521-529 .
- Kaveh, R., Li, Y.-S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L. and Van Aken, B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10637-10644 .
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M. T. and Rupasinghe, H. V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 396-401 .
- Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Strnad, M. and Repčák, M. (2009). Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports*, 28(1), 135 .
- Kumar, V., Sharma, M., Khare, T. and Wani, S. H. (2018). Impact of nanoparticles on oxidative stress and responsive antioxidative defense in plants. *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*, 393-406.
- Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H. and Kweon, H. S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1915-1921 .
- Leidi, E., Silberbush, M. and Lips, S. (1991). Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. II. Photosynthesis and transpiration. *Journal of Plant Nutrition*, 14(3), 247-256 .
- Liang, Y. (1999). Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil*, 209(2), 217 .
- Liang, Y., Shen, Q., Shen, Z. and Ma, T. (1996). Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 19(1), 173-183 .
- Liu, H.-x., Guo, Z.-g., Guo, X.-h., Zhou, X., Hui, W. and Wang, K. (2009). Effect of addition of silicon on water use efficiency and yield components of alfalfa under the different soil moisture. *Acta Ecologica Sinica*, 29(6), 3075-3080 .
- Majumder, D. D., Banerjee, R., Ulrichs, C., Mewis, I. and Goswami, A. (2007). Nano-materials: Science of bottom-up and top-down. *IETE Technical Review*, 24(1), 9-25 .
- Mehrabanjoubani, P., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H. R. and Aghdasi, M. (2015). Silicon affects transcellular and apoplastic uptake of some nutrients in plants. *Pedosphere*, 25(2), 192-201 .
- Miao, B.-H., Han, X.-G., and Zhang, W.-H. (2010). The ameliorative effect of silicon on soybean seedlings grown in potassium-deficient medium. *Annals of Botany*, 105(6), 967-973 .

- Mitani, N., Chiba, Y., Yamaji, N. and Ma, J. F. (2009). Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *The Plant Cell*, 21(7), 2133-2142 .
- Miyake, Y. and Takahashi, E. (1983). Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 29(1), 71-83 .
- Molina, R. V., García-Luis, A., Coll, V., Ferrer, C., Valero, M., Navarro, Y. and Guardiola, J. L. (2004). Flower Formation in the Saffron Crocus (*Crocus sativus* L.). The Role of Temperature. *Acta Horticulture*, 39-48 .
- Pavlovic, J., Samardzic, J., Maksimović, V., Timotijevic, G., Stevic, N., Laursen, K. H. and Liang, Y. (2013). Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist*, 198(4), 1096-1107 .
- Qados, A. M. A. (2015). Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *Journal of Experimental Agriculture International*, 78-95 .
- Ranganna, S. (1986). *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products*: Tata McGraw-Hill Education.
- Rastogi, A., Tripathi, D. K., Yadav, S., Chauhan, D. K., Živčák, M., Ghorbanpour, M. and Brestic, M. (2019). Application of silicon nanoparticles in agriculture. *Biotech*, 9(3), 90 .
- Saeidian, S., Keyhani, E. and Keyhani, J. (2006). Polyphenol Oxidase Activity during Development of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corm. Paper presented at the II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M., Saradhi, P. P., Khanna, P. and Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of Brassica juncea. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8), 2225-2233 .
- Shi, Y., Zhang, Y., Yao, H., Wu, J., Sun, H. and Gong, H. (2014). Silicon improves seed germination and alleviates oxidative stress of bud seedlings in tomato under water deficit stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 27-36 .
- Siddiqui, M. H. and Al-Whaibi, M. H. (2014). Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* seeds Mill.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(1), 13-17 .
- Struyf, E., Smis, A., Van Damme, S., Garnier, J., Govers, G., Van Wesemael, B., Conley, D.J., Batelaan, O., Frot, E., Clymans, W., et al. (2010) Historical land use change has lowered terrestrial silica mobilization. *Nature Communication*, 1(1):1-7.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., Dubey, N. K. and Chauhan, D. K. (2017). Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 70-81 .
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L. and Bracale, M. (2013). Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *Plos One*, 8(7), 68-75.
- Vurdu, H. (2003). Room table: agronomical and biotechnological approaches for saffron improvement. Paper presented at the I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650.

Yanishlieva-Maslarova, N. and Heinonen, I. (2001). Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. *Antioxidants in Food, Practical Applications*, 210-266.

Effect of silicon nanoparticles on some physiological parameters of saffron corm (*Crocus sativus*)

B. Zareyi¹, Kh. Kiarostami^{2*}, M. Hosseinzadeh Namin³, M. Sorahinobar²

Received: 2020.2.19

Accepted: 2020.6.2

Abstract

Silicon nanoparticles have distinctive physicochemical characteristics. They are able to enter into plants and impact the metabolisms of plants as well as improve plant growth and yield under unfavorable environmental conditions. This research was done in order to study the physiological effects of nanosilicon on *Crocus sativus* corm. The corms were treated with silicon nanoparticles in concentrations of 0, 9 and 18 mg L⁻¹. The experiment was done as completely randomized design in three replicates. The results showed that nano-silicon treatment increased content of silicon, potassium, iron, zinc, magnesium and calcium contents in plants but did not affect the fresh and dry weight as well as protein content, significantly. Moreover, the number of daughter corms, malondialdehyde and proline content significantly increased in nano-silicon treated plants as compared to non-treated control. The maximum content of total phenolics and flavonoid content were observed in plants treated with 9 and 18 mg L⁻¹ respectively. Based on the results, it can be concluded that the examined concentrations of silicon nanoparticles can increase saffron corm nutrient content, its capacity of antioxidant system by the production of secondary metabolites.

Keywords: Antioxidant system, *Crocus sativus*, Nanosilicon.

1-MSc of Plant Physiology, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

*(corresponding author: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir)

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

4- Assistant Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

بررسی اثر بتائین بر اختلال حافظه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مدل آلزایمری ناشی

از تزریق درون هیپوکمپی پروتئین آمیلوئید بتا

فاطمه علی پور فرد^۱، هومن شجیعی^{۲*}، فرزانه نظری سرنجه^۳، ویدا حجتی^۴، مسعود علیرضایی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

چکیده

مطالعات نشان می دهد که استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد. بتائین دارای خواص پاداکسایشی و محافظت نوروئی است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر بتائین بر نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا (AB) به درون هیپوکمپ و ارزیابی فعالیت آنزیم پاداکسایشی (اندوژنی) سوپراکسید دیسموتاز است. در این تحقیق تجربی ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد ویستار به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه شاهد، گروه آلزایمری القاء شده با پروتئین آمیلوئید بتا، و گروه های آلزایمری دریافت کننده مقادیر مختلف بتائین (۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) تقسیم شدند. یک هفته پس از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا، ارزیابی حافظه با استفاده از روش یادگیری اجتنابی غیر فعال انجام شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز به روش شیمیایی اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد، تزریق آمیلوئید بتا میزان به یادآوری حافظه و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. تزریق بتائین در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن، اثر ناشی از تزریق آمیلوئید بتا را مهار و سبب بهبود حافظه و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد که نشان دهنده کاهش اثر استرس اکسیداتیو است این مطالعه نشان می دهد که بتائین، با کاهش استرس اکسیداتیو می تواند سبب بهبود حافظه در موش های آلزایمری القایی گردد.

واژه های کلیدی: آلزایمر، بتائین، یادگیری اجتنابی غیر فعال، سوپراکسید دیسموتاز

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران

۲- استاد یار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران

* (نویسنده مسئول: drhshajiee@gmail.com)

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴- استاد یار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران

۵- دانشیار بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

مقدمه

بیماری آلزایمر، یک بیماری تحلیل برنده عصبی پیشرونده است که با از دست دادن حافظه، تغییرات شخصیتی، افسردگی، اضطراب و سایر اختلالات ذهنی همراه است. (Zhangetal,2012) تجمع و رسوب پروتئین آمیلوئید بتا در پلاک های آمیلوئیدی خارج سلولی و هیپرفسفریله شدن پروتئین تائو در داخل نورون ها بویژه در نواحی دخیل در یادگیری و حافظه مانند هیپوکمپ از عوامل اصلی تخریب نورونی و بروز بیماری آلزایمر شناخته می شوند (Wojsiatetal, 2018). علاوه بر این دو عامل اصلی، فاکتورهای پاتو فیزیولوژیکی دیگری همانند اختلال عملکردی میتوکندری، التهاب، تخریب اکسایشی، اختلال چرخه سلولی و اختلال در انتقال سلولی هم در شروع و پیشرفت بیماری موثرند (Zhu et al.,2013).

استرس اکسیداتیو که ناشی از برهم خوردن تعادل بین انواع فعال اکسیژن و خنثی شدن آنها توسط آنزیم های پاداکسایشی است، از جمله سازوکار های مهم در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر است (Wojsiat et al., 2018; Huang et al., 2016). انواع فعال اکسیژن عمدتاً در میتوکندری سلول ها و در طی فرآیند فسفریلاسیون اکسایشی تولید می شوند. افزایش تولید انواع فعال اکسیژن و کاهش قدرت دفاعی پاداکساینده ها سبب اختلال در متابولیسم سلولی و اختلال در هومئوستازی کلسیم شده و در نهایت فعالیت و انتقال سیناپسی را تحت تاثیر قرار داده و سبب بروز اختلالات شناختی می گردد (Tonnie & Trushina, 2017). استرس اکسیداتیو، همچنین سبب اختلال در پردازش پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا شده و سبب افزایش تولید پروتئین آمیلوئید بتا می گردد (Cai et al., 2011). در شرایط طبیعی، ترکیبات پاداکساینده مانند گلوتاتیون، کاروتنوئیدها و ویتامین E و نیز آنزیم های پاداکساینده مانند سوپراکسید دیسمو تاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز میزان رادیکال آزاد در سلول را کنترل می کنند و مانع آسیب به ساختارهای سلولی می شوند (Su et al., 2008). سوپر اکسید دیسمو تاز که اولین بار توسط مانا در سال ۱۹۳۸ خالص سازی شد (Das et al.,2005) با خنثی کردن یون سوپر اکسید در جلوگیری از استرس موثر است این آنزیم در یوکاریوت ها دارای دو فرم سیتوپلاسمی و میتوکندریایی است و اولین خط دفاعی در مقابل سمیت اکسیژن محسوب می شود و سوپر اکسید را که فراوان ترین رادیکال آزاد می باشد را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن کاتالیز می کند و سپس این پراکسید هیدروژن توسط کاتالاز یا گلوتاتیون پراکسیداز به آب تبدیل می شود. (Singh et al.,2010).

امروزه با توجه به نقش شناخته شده استرس اکسیداتیو در شروع و پیشرفت بیماری آلزایمر استفاده از ترکیبات دارای خواص پاداکساینده و حفاظت نورونی جهت پیشگیری یا درمان مورد توجه قرار گرفته است. بتائین یا تری متیل گلیسین، یک ماده آلی است و ویژگی های آنتی اکسیدانی آن به طور گسترده شناخته شده است (Craig, 2004). بتائین بر روی میزان فعالیت آنزیم های پاداکساینده اثر گذاشته و سبب بهبود استرس اکسیداتیو ناشی از داروهایی مانند لوودوپا و بنسرازید

می‌گردد (Alirezaei *et al.*, 2015). این ترکیب به عنوان اسمولیت سلول‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را در شرایط استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. بتائین همچنین به عنوان یک دهنده متیل در متیلاسیون هموسیستئین و تبدیل آن به متیونین نقش دارد که توسط آنزیم بتائین-هموسیستئین متیل ترانسفراز کاتالیز می‌شود (Ho *et al.*, 2002). تجمع هموسیستئین سبب القاء استرس اکسیداتیو، تجمع آمیلوئید بتا، هیپرفسفریلاسیون پروتئین تائو و القاء آلزایمر می‌شود (Zhang *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2016). مطالعات قبلی اثر بتائین بر فرآیند حافظه را تأیید نموده است. در این رابطه نشان داده شده است که بتائین سبب بهبود اختلال حافظه ناشی از تزریق هموسیستئین و لیپوپولی ساکاریدها می‌شود (Chai *et al.*, 2013; Miwa *et al.*, 2011). با این وجود تاکنون اثرات آنتی اکسیدان بتائین بر استرس اکسیداتیو که در بیماری آلزایمر اتفاق می‌افتد به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا با توجه به خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی بتائین و نیز با توجه به اهمیت فرآیندهای التهاب و استرس اکسیداتیو در بروز و پیشرفت بیماری آلزایمر، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر بتائین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و بهبود حافظه در موش‌های القایی آلزایمری در مدل یادگیری اجتنابی است.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوانات

ابتدا 40 سر موش نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 20 گرم و سن تقریبی ۱۰ هفته از مرکز حیوانات دانشکده علوم پزشکی شیراز خریداری گردید. حیوانات به ۵ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند گروه شاهد: یک میلی لیتر آب مقطر را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی و با استفاده از گاواژ قبل از تزریق داخل هیپوکمپی سالین (حلال آمیلوئید بتا) دریافت نمودند. بر اساس مطالعه Miwa و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر تزریق بتائین به تنهایی بر روی حافظه مشابه با گروه کنترل است (Miwa *et al.*, 2011). گروه آلزایمری القایی: یک میلی لیتر آب مقطر را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی و با استفاده از گاواژ قبل از تزریق داخل هیپوکمپی آمیلوئید بتا دریافت نمودند. گروه‌های آلزایمری دریافت کننده بتائین: سه گروه از حیوانات مقادیر مختلف بتائین (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به مدت ۱۴ روز قبل از تزریق داخل هیپوکمپی آمیلوئید بتا دریافت نمودند. مقادیر بتائین بر اساس مطالعات قبلی و نیز پاسخ دوزی - دارویی انتخاب شد (Chai *et al.*, 2013).

القاء آلزایمر در موش های آزمایشگاهی

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن) بیهوش و در دستگاه استرئوتاکسی قرار گرفتند. مختصات ناحیه CA1 بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون به دست آمد: ۳/۸- میلی متر از برگما به سمت عقب، $\pm 1/8$ میلی متر از طرفین شکاف سائیتال و ۲/۲ میلی متر به طرف پایین از سطح از مجمه (Paxinos & Watson, 2007). بعد از مشخص نمودن محل های کانول گذاری، حیوانات در ناحیه هیپو کامپ پشتی کانول گذاری شدند و آمیلوئید بتا به صورت دو طرفه و با استفاده از سرنگ همیتون تزریق شد. حیوانات ۷ روز دوره بهبودی را سپری کرده و سپس حافظه و یادگیری آن ها به روش یادگیری اجتنابی غیرفعال ارزیابی شد.

مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال

یک هفته پس از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا به درون ناحیه هیپوکمپ حیوانات وارد آزمون رفتاری شدند. جهت ارزیابی حافظه از مدل یادگیری اجتنابی غیر فعال استفاده شد. دستگاه یادگیری اجتنابی غیر فعال از دو قسمت تاریک و روشن تشکیل شده است و بررسی حافظه در آن طی دو مرحله و در دو روز متوالی انجام می شود.

در روز اول و در مرحله سازش، حیوان به آرامی درون قسمت روشن دستگاه قرار می گیرد و به آن اجازه داده می شود به مدت ۵ ثانیه در این قسمت بماند تا با آن آشنا شود بعد از گذشت ۵ ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز می شود و به حیوان اجازه داده می شود تا وارد قسمت تاریک شود حیواناتی که ورود آن ها به قسمت سیاه بیش تر از ۱۰۰ ثانیه طول می کشید، از ادامه آزمایش حذف می شدند. پس از ۳۰ دقیقه مرحله آموزش انجام می شد. در این مرحله حیوان در بخش روشن دستگاه قرار می گرفت و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی دستگاه باز و مدت زمانی که طول می کشید تا حیوان وارد بخش تاریک دستگاه شود، ثبت می شد. به محض ورود حیوان به قسمت تاریک، درب گیوتینی بسته شده و به کف پای حیوان شوک وارد می شد. پس از ۲۰ ثانیه حیوان از دستگاه خارج شده و پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله فوق تکرار می شد. چنانچه حیوان قبل از ۱۲۰ ثانیه به قسمت تاریک وارد می شد، برای بار دوم شوک دریافت می کرد، در غیر این صورت آموزش موفق برایش ثبت می شد. حداکثر دفعات آموزش سه مرتبه انجام می شد (Nazari-Serenjeh et al, 2019).

۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش حیوانات وارد مرحله آزمون می شدند. در این مرحله ابتدا حیوان را در قسمت روشن دستگاه قرار داده و پس از ۵ ثانیه درب گیوتینی باز می شد. مدت زمانی که طول می کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک دستگاه شود زمان تاخیر یا STL (Step-Through Latency) نام داشت و به عنوان معیاری برای اندازه گیری میزان حافظه ثبت می شد. بیش ترین زمان تأخیر برای ورود به قسمت تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می شد.

سنجش سوپر اکساید دیسموتاز

پس از پایان آزمون رفتاری، ناحیه هیپو کامپ استخراج و با استفاده از بافر فسفات ۱/ مولار شستشو داده شد و با استفاده از ازت مایع هموژنیزه گردید. بافت هموژنیزه شده را درون میکروتیوب ریخته و با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در دمای 70 درجه نگهداری شد. محلول بیرونی با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. (Alirezaei, 2011) فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز براساس دستور العمل سازنده کیت (Kiazist, life science, Iran) اندازه گیری شد. یک واحد از سوپر اکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که موجب مهار ۵۰ درصد از واکنش احیا (۲-۴- یدوفینیل) (۳-۴- نیتروفنیل) (۵- فنیل تترازولیوم کلراید) تحت شرایط آزمایش گردد ارزیابی فعالیت با دستگاه اسپکتروفتومتری در مقابل بلانک در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت و به صورت واحد در میلی گرم پروتئین بافت بیان گردید (Alirezaei, 2012).

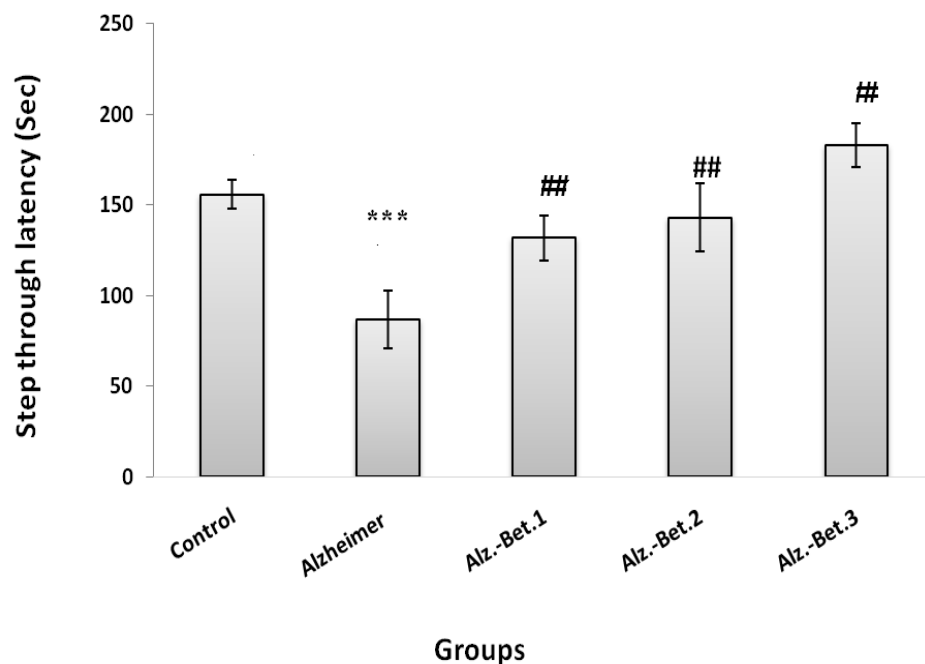
آنالیز آماری داده ها

به منظور تحلیل آماری، همه متغیرها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با هم مقایسه شدند و در صورت معنی دار بودن تفاوت ها از آزمون Tukey برای مقایسه جفت گروه ها استفاده گردید. تمام آنالیزها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر بتائین بر اختلال حافظه ناشی از تزریق آمیلوئید بتا به درون ناحیه هیپوکمپ پستی

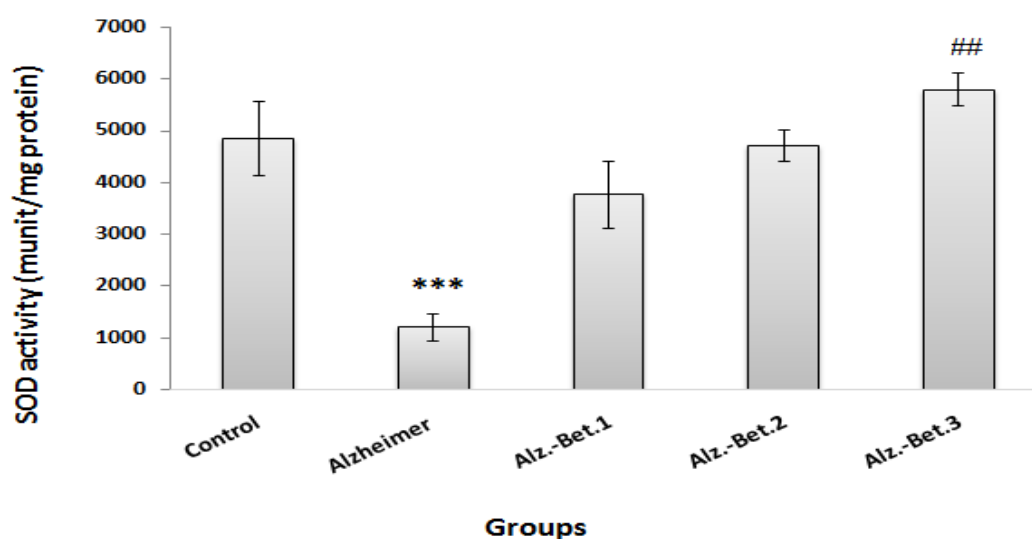
همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است در این مطالعه تزریق یک میکرولیتر از پروتئین آمیلوئید بتا در دوز ۵ میکروگرم در میکرولیتر به درون ناحیه هیپوکمپ پستی به صورت معنی داری سبب کاهش زمان ورود به اتاق تاریک در مقایسه با گروه کنترل شده است که بیانگر کاهش حافظه است ($P < 0.001$) همچنین درمان با بتائین در مقادیر استفاده شده (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) زمان ورود به اتاق تاریک را به صورت معنی دار در گروه های آلزایمری دریافت کننده بتائین در مقایسه با گروه القایی آلزایمر افزایش داده است ($P < 0.01$)



شکل ۱: اثرات درمان با بتائین بر حافظه در روش یادگیری اجتنابی غیر فعال. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است ($P < 0.001$) *** تفاوت آماری بین گروه آلزایمر القایی و کنترل را نشان می دهد و ($P < 0.01$) ## تفاوت آماری بین گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین و گروه آلزایمر القایی را نشان می دهد. Alz-Bet.1 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.2 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.3 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) می باشد

اثر بتائین بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به طور معنی داری در موش های دریافت کننده آمیلوئید بتا در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.001$) همچنین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در موش های درمان شده با بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن در مقایسه با گروه آلزایمر القایی به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.01$)



شکل ۲: اثرات درمان با بتائین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است ($P < 0.001$) * * * تفاوت آماری بین گروه آلزایمر القایی و کنترل را نشان می دهد. و ($P < 0.01$) ## تفاوت بین گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز (۱۵ میلی گرم بر وزن بدن) و گروه آلزایمر القایی را نشان می دهد. Alz-Bet.1 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.2 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) Alz-Bet.3 (گروه آلزایمری دریافت کننده بتائین با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن) می باشد.

بحث

شواهد متعدد نشان می دهد استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر دارد به طوری که نشانگرهای آسیب اکسایشی در مغز افراد مبتلا به آلزایمر افزایش می یابد (Chang, et al., 2014). بنابراین کاهش استرس اکسیداتیو، می تواند به عنوان یک هدف مناسب جهت درمان و پیشگیری از بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان داد، در مغز حیوانات مبتلا به آلزایمر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش می یابد و بتائین به عنوان یک ماده پاداکساینده، سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و بهبود نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا شده است. بیشترین اثر پاداکساینده بتائین در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد.

Wang در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای به بررسی مطالعات انجام شده در زمینه درمان بیماری آلزایمر با آنتی اکسیدان ها پرداخت. این محقق گزارش کرد که استرس اکسیداتیو نه تنها شدیداً در مراحل اولیه بیماری آلزایمر نقش دارد، بلکه نقش مهمی در افزایش و فعال سازی مسیرهای پیام رسانی سلولی چندگانه دارند که این روند در شکل گیری آسیب های ترکیبات سمی و سپس ایجاد بیماری آلزایمر نقش دارند (Wang, 2010). بافت مغز، به دلیل فعالیت بیوشیمیایی و آناتومی خاص در

مقابل استرس اکسیداتیو آسیب پذیر است (Wojsial *et al.*, 2018). یکی از مهمترین سازوکارهای پاداکسایشی بدن در برابر حمله انواع فعال اکسیژن، حضور و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیمی است که واکنش دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن را کاتالیز می کند. حضور مقدار کافی از این آنزیم در سلول ها و بافت ها، غلظت آنیون سوپراکسید را در سطح بسیار پایین نگه می دارد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سلول و محیط های خارج سلولی، برای جلوگیری از بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو و نیز پیشگیری از سایر اختلالات نورودژنراتیو مانند بیماری آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون حیاتی است (Yao *et al.*, 2006). مطالعات متعدد اثرات آنتی اکسیدان بتائین را در بافت های مختلف بدن نشان داده است (Alirezaei, 2013; Ganesan *et al.*, 2010). در مطالعه صورت گرفته توسط Detopoulou در سال ۲۰۱۰، مشخص گردید که مصرف بتائین خوراکی ۱/۵ درصد، استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد و میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می دهد (Deto poulou, ۲۰۱۰). مطالعه حاضر نیز نشان داد بتائین ظرفیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز ناحیه هیپوکامپ مغز را که ارتباط تنگاتنگی با حافظه و یادگیری دارد، بهبود بخشید. این آنزیم با اثر بر روی پردازش آمیلوئید بتا در پاتوژن بیماری آلزایمر نقش دارد در حقیقت سوپراکسید دیسموتاز سبب کاهش تشکیل پلاک های آمیلوئید بتا می شود و در مقابل بر میزان تشکیل آمیلوئید بتا محلول و رشته ای اثر ندارد (Massaad *et al.*, 2009).

Chai و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند بتائین نقص حافظه ناشی از هموسیستئین را بهبود بخشیده و تعداد شاخه های دندریتی و تراکم خارهای دندریتی را در ناحیه هیپوکامپ افزایش می دهد. افزایش هموسیستئین در پلاسما سبب کاهش LTP (Long-Term Potentiating) در هیپوکامپ می شود و این اثر توسط بتائین مهار می شود (Chai *et al.*, 2013). به علاوه مطالعه Chai و همکارانش نشان داد که بتائین سبب کاهش میزان آمیلوئید بتا در هیپوکامپ می شود (Chai *et al.*, 2013). با توجه به اثر بتائین در افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز این احتمال وجود دارد که بتائین از طریق افزایش فعالیت این آنزیم سبب کاهش پلاک های آمیلوئید بتا می گردد. قابل ذکر است که این اثرات بتائین در دوز ۱۲،۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات، مشاهده شده است که تقریباً مشابه با دوز استفاده شده در مطالعه ی حاضر است.

از سویی مطالعات نشان می دهد در بیماری آلزایمر سطح هموسیستئین پلاسما افزایش می یابد (Van Dam & Van Gool, 2008). بررسی های ایمنوهیستوشیمی نشان می دهد هموسیستئین، استرس اکسیداتیو را افزایش می دهد که به علت اکسیداسیون گروه سولفیدریل می باشد در نتیجه باعث تولید سوپراکسید و هیدروژن پراکسید می شود (Cacciapuoti, 2013). هموسیستئین بیان آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز را نیز مهار کرده و اثرات سمی رادیکال های آزاد را افزایش می دهد. (Hungetal, ۲۰۱۰). مطالعات انجام شده توسط علیر ضایی و همکاران نشان داد بتائین سبب کاهش میزان هموسیستئین پلاسما می گردد (Alirezaei *et al.*, 2014). بنابراین این احتمال وجود دارد که بتائین از طریق کاهش سطح هموسیستئین نیز

سبب بهبود حافظه گردد در تائید این فرض نشان داده شده است که بتائین نقص حافظه القاء شده توسط هموسیستئین در ماز آبی موریس را کاهش می دهد (Chai *et al.*, 2013).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که بتائین ممکن است یک پتانسیل آنتی اکسیدانی محافظت کننده در پیشگیری از نقص حافظه ناشی از تزریق پروتئین آمیلوئید بتا داشته باشد. پیشنهاد می شود جهت تائید بتائین به عنوان یک داروی موثر در پیشگیری و درمان آلزایمر، اثرات بتائین بر مسیرهای مولکولی و سیگنالینگ مهمی مانند (cAMP response element-binding protein) CREB و (calmodulin-dependent protein kinase II) CaMKII که در فرآیند یادگیری و حافظه نقش دارند مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه حاصل رساله دکتری فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می باشد بدین وسیله از تمامی عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند، تشکر می شود.

منابع

- Alirezaei, M. , Jelodar, G. Niknam, P. Ghayemi, Z. and Nazifi, S. (2011). Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* 67(4): 605-612.
- Alirezaei, M. , Dezfoulan, O. Sookhtehzari, A. Asadian, P. and Khoshdel, Z. (2014). Antioxidant effects of oleuropein versus oxidative stress induced by ethanol in the rat intestine. *Comp Clin Pathol* 23:1359-1365
- Alirezaei, M. , Jelodar, G. Niknam, P. Ghayemi, Z. and Nazifi, S. (2011). Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* 67(4): 605-612.
- Alirezaei, M., Jelodar, G. and Ghayemi, Z. (2012). Antioxidant defense of betaine against oxidative stress induced by ethanol in the rat testes. *Int J Pept Res Ther*; 18(3): 239-47.
- Aoi, Enokishima ., Toshitaka, Nabeshima. Yumiko Nog, uchi. Masaya, Miw a. Mizuki, Tsubo i. and ki, Hiramatsu. (2017). Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter. 796(5):122-130.
- Bo, Su. Xinglong, Wang. Akihiko, Nunomura. Paula I, Moreira. Hyoun-gon, Lee.. George, Perry. Mark A, Smith. and Xiongwei, Zhu. (2008). Oxidative Stress Signaling in Alzheimer's Disease. 5(9):525-532.
- Cacciapuoti, F. (2013). Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Thromb Thrombolysis* 36:258-262.

- Cai, Z, Zhao, B, and Ratka, A. (2011). Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 13(4): 223-50.
- Chai, GS, Jiang, X, Ni, ZF, Ma, ZW, Xie, AJ, Cheng, XS, Wang, Q, and Wang, JZ. (2013). Liu GP. Betaine attenuates hcy-induced cognitive deficits induced by homocysteine. *International Society for Neurochemistry. J. Neurochem* 124: 388—396.
- Chaieb, I. (2010). Saponins as insecticides. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5(1):39-50.
- Craig, S.A. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:539-549.
- Das, SK., Vasudevan, DM. (2005). Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems; a dose dependent study. *Indian Journal of Clinical Biochemistr*, 20(1):80-84.
- Deto, poulou p, panagiotak os, DB, and pitsavos, c. (2008). Stefandisc. dietary choline and betaine takes in relation concentrations of inflammatory markers in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5):424-430.
- Fang, Xie, Yun, Zhao, Jing, Ma, Jing-Bo, Gong, Shi-Da, Wang, Liang, Zhang, Xiu-Jie, Gao, and Ling-Jia, Qia. (2016). The involvement of homocysteine in stress-induced A β precursor protein misprocessing and related cognitive decline in rats. *Cell Stress Chaperones*, Sep;21(5):915-26
- Ganesan, B., Buddhan, S, Anandan, R, Sivakumar, R, and Anbinezhilan, R. (2010). Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Mole Biol Rep*, 37(3): 1319-27
- Heim, KE, and Taglia Ferro, AR, and Bobilya DJ. (2012). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J Nutr Biochemical*, 13(10): 572-84
- Ho, PI, Ortiz, D, Rogers, E, and Shea, TB. (2002). Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res*, 70: 694-702.
- Hung, s. (2010). Rosmaric acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *236: 211- 280*.
- Joanna, W, Katarzyna Marta, Z, Katarzyna LK, and Urszula, W. (2018). Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 22: 1-17.
- Massaad, CA, Washington, TM, Pautler, RG, and Klann, E. (2009). Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(32):13576-13581
- Nazari-Serenjeh, F, Darbandi, N, Majidpour, S, and Moradi, P. (2019). Ghrelin modulates morphine/nicotine interaction in avoidance memory: involvement of CA1 nicotinic receptors. *Brain Research*, 1720:1420-1436.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Academic Press San Diego.
- Reisi, P, Alaei, H, Babri, S, Sharifi, MR, and Mohaddes, G. (2009). Effects of treadmill running on spatial learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett*, 455(2): 79-83.
- Singh, Gill, S, and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.
- Tanzi, R., and Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 120:545-555.

- Van, Dam. ,and Van, Gool .(2008). Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. Archives of Gerontology and Geriatrics, 48(3) 425-430.
- Wang, M.(2010).Functions and Biotechnology of plant secondry Metabolites. Second edition.Inc. New Delhi, India. 20-30. with poor prognosis. Tumour Biol,37:5911–5917
- YaTing C, hang ., Wen-Neng Chang, Nai-Wen .Tsai Chih-Cheng, Huang .Chia,Te Kung. Yu-Jih, Su .Wei-Che, Lin .Ben-Chung, C .heng, Chih.Min .Su .Yi-Fang, Chiang.and C heng-Hsien, Lu.(2014). The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease.A Systematic Review. BioMed Research Internationa ,2014:182303.
- Yao, P. , Li, k .jin,Y .Song,F.Zho.S .Sun, X .Nussler ,A. K. andLiu, L .(2006).Oxidative damage after chronic ethanoi intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. Food chemistry, 99(2) :305-314.
- Zhang ,C. E., Tian, Q .Wei ,W .Peng, J. H .Liu, G. P.Zhou, X. W .Wang ,Q .Wang, D. W .and Wang, J. Z .(2008) .Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. Neurobiol Aging, 29: 1654–1665.
- Zhang, C. E., Wei, W .Liu ,Y. H .Peng, J. H .Tian, Q .Liu ,G. P.Zhang, Y .and Wang ,J. Z .(2009). Hyperhomocysteinemia increases beta amyloid by enhancing expression of gamma-secretase and phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain. Am. J.Pathol, 174, 1481–1491.
- Zhang, H. Ma Q., Zhang, Yw.and Xu, H. (2012) .Proteolyticprocessing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein.J Neurochem, 120(1): 9-21.
- Zhu , X., Perry, G .Smith, MA .andWang , X.(2013). Abnor- 885 mal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of 886 Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis ,33(Suppl 1), S253- 887.

Effect of Betaine on memory dysfunction and Activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme in Alzheimer's model induced by intra-hippocampal Beta-Amyloid Protein Injection

F. Alipourfard¹, H. Shajiee^{2*}, F. nazari-serenjah³, V. hojati⁴, M. alirezaie⁵

Received: 2020.2.9

Accepted: 2020.7.26

Abstract

Studies indicate that oxidative stress has important role in the pathogenesis of Alzheimer disease. Betaine has neuroprotective and antioxidant properties. The purpose of this study was to investigate the effect of betaine on memory dysfunction induced by intra-hippocampal injection of amyloid beta and measurement of superoxide dismutase (SOD) activity. In this experimental study, animals were divided into 5 groups (n=8 in each group) including: control group, Alzheimer group and betaine (5, 10, and 15 mg/kg body weight + A β) groups. Seven days after A β injection memory was assessed by avoidant learning. The activity of antioxidant enzyme was measured via chemical methods. Data were analyzed by One-way ANOVA test. Results: The results showed in the Alzheimer's group, A β impaired memory and reduced SOD activity in comparison with control group. In contrast, betaine pretreatment significantly improved memory and increased SOD activity. This study shows that betaine as an antioxidant can improve memory by decreasing the oxidative stress.

Keywords: Alzheimer, Betaine, Passive avoidance learning, Superoxide dismutase

1- Ph.D. Student, Department of Biology, Islamic Azad University Damghan Branch, Semnan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran

*(corresponding author: drhshajiee@gmail.com)

3- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran

5- Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Khorram Abad, Iran

بررسی خصوصیات آنزیم پراکسیداز و تهیه نانوذره پروتئینی از آن با روش محاسباتی و آزمایشگاهی

شیما فولادبند^۱، پریناز قدم^{۲*}، محبوبه ضرابی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

ساختارهای نانوپروتئینی می‌توانند توسط توانایی ذاتی خودتجمعی مولکول‌ها تشکیل شوند که این توانایی می‌تواند به وسیله حد واسطه‌ها اصلاح گردد. در میان عوامل خودتجمعی ذاتی پروتئین‌ها، هیدروفوبیسیته مهمترین عامل است. مولکول‌های حد واسطه‌ای مانند گلوتارآلدئید می‌تواند باعث تجمع پروتئینی و تشکیل نانوذره گردند. در این پژوهش از نرم افزار Aggrescan 3D برای بررسی پروتئین‌هایی که خاصیت خودتجمعی دارند استفاده شد و به این ترتیب آنزیم پراکسیداز با توانایی خودتجمعی انتخاب گردید و با استفاده از گلوتارآلدئید این آنزیم به نانوذره تبدیل شد. آنالیزهای FESM و DLS نشان دادند که اندازه متوسط نانوذره آنزیم ۵۰۰ نانومتر می‌باشد فعالیت نانوذره آنزیم نسبت به فعالیت آنزیم موندور در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH بهینه ۷ کاهش یافته است. با استفاده از همولوژی مدلینگ ساختار PDB دو آنزیم پراکسیداز به دست آمد و با داکینگ، اتصال گلوتارآلدئید به این دو بررسی شد. با استفاده از نرم افزار LigPlot مشاهده شد آمینو اسیدها با پیوند هیدروژنی به گلوتارآلدئید متصل شده اند و برای بررسی کاهش فعالیت نانوذره آنزیم، اتصالات جایگاه فعال با سرور COACH بررسی گردید و مشاهده شد که گلوتارآلدئید به آمینو اسیدهای جایگاه فعال نانوذره آنزیم متصل شده است. شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان داد که آنزیم موندور و نانوذره آنزیم در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و زمان ۵ نانوثانیه پایدار هستند.

واژه‌های کلیدی: ابزارهای زیست محاسباتی، تجمع پذیری، نانوذره آنزیم پراکسیداز.

مقدمه

نانوفناوری توانایی ساخت، طراحی و دستکاری ساختار در ابعاد یک تا ۵۰۰ نانومتر است ولی معمولاً نانوذرات زیستی کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشند (Klaessig et al., 2011). در نانوفناوری با استفاده از پروتئین‌هایی که خاصیت خودتجمع‌پذیری دارند، نانوپروتئین‌ها ساخته می‌شوند. خودتجمعی ساختارهای پروتئینی توسط عوامل محیطی مانند pH، دما، قدرت یونی و نوع

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

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

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

حلال تحت تاثیر قرار می گیرد، بنابراین برای تجمع پذیری پروتئین ها باید برهمکنش های پروتئین - پروتئین را مورد بررسی قرار داد (Luo et al., 2016).

در خودتجمعی پروتئین ها چندین پیوند ضعیف غیرکووالانسی مانند یونی، واندروالسی، هیدروژنی، هیدروفوبی و π -stacking دخالت دارند (Amdursky et al., 2010) که هیدروفوبیسته نقش مهمی در این مورد بازی می کند (Yan et al., 2010). از جمله ویژگی های دیگری که باعث تجمع پذیری پروتئین ها می شود، ساختارهای متقارن پروتئین ها و وجود پپتیدها می باشند (Luo et al., 2016). خودتجمعی پروتئین های مونومریک، الیگومرهای با دمین های متقارن مانند خطی، دی هیدرال حلقوی، مکعبی و غیره ایجاد می کند و نظم هندسی خاص بین محورهای تقارن دو پروتئین الیگومریک، امکان خودتجمعی پروتئین ها را فراهم می کند. ساختارهای ثانوی مانند آلفا هلیکس و صفحات بتا (Feverati et al., 2012) و موتیف های آمیلوئیدی و coiled coil (Selkoe, 2003) نیز می توانند سبب تجمع پروتئین ها شوند.

تجمع پذیری پروتئین ها به کمک واسطه هایی مانند آپتاмерهای DNA یا RNA (Liu et al., 2005) نیز صورت می گیرد. کئوردیناسیون فلزی و میانکنش های الکترواستاتیک (Luo et al., 2016) و استفاده از اتصال دهنده عرضی گلو تار آلدئید (Jahanshahi & Babaei., 2008) می توانند به تجمع پذیری پروتئین ها کمک کنند.

امروزه ابزارهای زیست محاسباتی مانند PAGE، PASTA، TARTAGLIA، AGGREGSCAN 3D و AGGREGSCAN

در پیش گویی خودتجمعی پروتئین ها استفاده می شود.

از تجمع پروتئین ها در حسگرهای زیستی (Qi et al., 2004)، طراحی بیوکاتالیزورها (Ma et al., 2015) و زیست پزشکی و درمان استفاده می شود (Luo et al., 2016).

با استفاده از روش های مختلفی از جمله حلال زدایی (desolvation) (Marty et al., 1978)، جداسازی فاز ته نشین شده (Coacervation-phase separation) (Elzoghby., 2013)، امولسیون (Emulsion) (Scheffel et al., 1972)، میسل معکوس (Reverse phase microemulsion) (Elzoghby., 2013)، پوشش دهی لایه به لایه ((Layer-by-Layer (LBL) (Borges & Mano., 2014)، خودسامانی (self-assembly) (Elzoghby., 2013) و نانو اسپری (Patel et al., 2010، Cal & Salahub., 2010، nano spray) (2009). می توان نانو ذره سنتز کرد.

در این مقاله برای انتخاب پروتئین مناسب برای تولید نانوذره از بین ابزارهای زیست محاسباتی، AGGREGSCAN 3D که بر اساس هیدروفوبیسته کار می کند، انتخاب گردید. سپس پروتئین هایی که دارای توانایی خودتجمعی بودند، مشخص شدند. در این نرم افزار امتیاز خودتجمعی پروتئین هایی مانند S-layer و آمیلوئیدها بالای یک به دست آمد که پروتئین هایی با امتیاز بالای یک، خودتجمعی مناسبی دارند. پس از بررسی ها از آنزیم پراکسیداز استفاده شد و این آنزیم با اتصالات عرضی

گلوآرالدهید (Liu et al., 2005) به نانوانزیم تبدیل شد؛ سپس با استفاده از ابزارهای آزمایشگاهی و زیست محاسباتی خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم و نانو آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعات محاسباتی آنزیم

بررسی تجمع پذیری پروتئین: با استفاده از سرور AGGRESCAN تمایل تجمع پذیری هر آمینو اسید تعیین و خروجی به صورت امتیاز برای هر یک از پروتئین ها بر اساس هیدروفوبیسته آن ها تعریف می شود. مجموعه ای از پروتئین ها که در مقالات دارای توانایی تجمع پذیری هستند، با استفاده از این سرور بررسی شدند. در نهایت آنزیم پراکسیداز به عنوان پروتئین مورد نظر انتخاب گردید.

جست و جو ساختار سوم آنزیم پراکسیداز: با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز به صورت خالص خریداری شد و اطلاعاتی درباره وزن مولکولی دقیق و pI آنزیم در دسترس نبود، بنابراین با استفاده از وزن مولکولی آنزیم که حدودا در سایت سیگما ۳۰ کیلو دالتون گزارش شده بود، دو ایزوآنزیم این آنزیم با کدهای (الف) P59121 با وزن مولکولی ۳۳/۷ کیلو دالتون و (ب) P80679 با وزن مولکولی ۳۱/۹ کیلو دالتون و pI ۴/۷ (اسیدی) انتخاب شدند، که هر دو این کدها متعلق به گیاه *Armoracia rusticana* می باشند. با توجه به این که برای انجام مطالعات محاسباتی کد PDB آنزیم مورد نیاز است و این دو آنزیم فاقد کد PDB بودند، برای هر دو، با استفاده از روش همولوژی مدلینگ و نرم افزار مدلر (Modeller) مدل سازی انجام شد.

در آزمایشگاه از گلوآرالدهید به عنوان اتصال دهنده عرضی برای اتصال مولکول های آنزیم و سنتز نانوذره استفاده شد. با استفاده از نرم افزار اتوداک (Auto Dock) داکینگ بین مدل های پروتئینی ساخته شده و گلوآرالدهید انجام گردید و با کمک برنامه لیگ پلات (LigPlot) آمینو اسیدهای متصل به گلوآرالدهید برای هر یک از مدل های ساخته شده، مشاهده گردید. **پیش گویی آمینو اسیدهای جایگاه فعال مدل های ساخته شده:** به کمک سرور کوچ (COACH) آمینو اسیدهای احتمالی در جایگاه فعال مدل های ساخته شده پیش گویی شد.

بررسی محاسبات شبیه سازی دینامیک مولکولی: شبیه سازی با استفاده از نرم افزار گرومکس (Gromacs) برای آنزیم پراکسیداز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۵ نانوثانیه صورت گرفت. نمودارهای RMSF، RMSD، شعاع ژیراسیون و انرژی پتانسیل برای مدل های ساخته شده پروتئینی و کمپلکس پروتئین و گلوآرالدهید مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعات آزمایشگاهی آنزیم

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم، محلول پتاسیم فسفات مونوبازیک ۱ مولار، محلول پتاسیم فسفات دی بازیک ۱ مولار (بافر پتاسیم فسفات pH ۶ و دمای ۲۰ درجه سلسیوس)، محلول هیدروژن پراکسید ۵ درصد (v/v) و محلول پیروگالول ۵ درصد (w/v) و محلول پراکسیداز ۰/۶ U/ml در بافر پتاسیم فسفات (بلافاصله قبل از استفاده) (Sigma-Aldrich) تهیه شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم ۱/۰۵ میلی لیتر آب دیونیزه، ۰/۲۰۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات، ۰/۰۸ میلی لیتر محلول هیدروژن پراکسید و ۰/۱۶ میلی لیتر پیروگالول به آرامی مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نگه داشته شدند. سپس ۰/۰۰۵ میلی لیتر محلول پراکسیداز در همان دما اضافه و به آرامی پیپتاژ شد و افزایش جذب برای ۳ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. تعریف فعالیت آنزیم پراکسیداز عبارت است از: یک واحداز پراکسیداز باعث ایجاد ۱ میلی گرم پرپروگالین (Purpurogallin) از پیروگالول (Pyrogallol) در مدت زمان ۲۰ ثانیه در pH ۶ در دمای ۲۰ درجه سلسیوس می شود که تغییر جذب در مدت زمان ۲۰ ثانیه باید ۰/۱۸ تا ۰/۳۴ باشد (Lenga 1988).

بررسی عملکرد دمایی آنزیم پراکسیداز: برای بررسی اثر دما بر عملکرد آنزیم پراکسیداز در هر یک از دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس محلول سنجش آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و سپس آنزیم به محلول سنجش در هر یک از این دماها اضافه شد.

بررسی عملکرد آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس: به منظور بررسی پایداری فعالیت آنزیم پراکسیداز، آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه، ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس فعالیت آن سنجیده شد.

بررسی عملکرد آنزیم در pH های مختلف: عملکرد آنزیم پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ که با استفاده از بافر بریتون-رابینسون تهیه شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه این بافر از بوریک اسید (۱ مولار)، فسفریک اسید (۱ مولار) و استیک اسید (۱ مولار) استفاده شد که هر کدام به غلظت نهایی (۰/۰۴ مولار) رسیدند.

سنتز نانوانزیم پراکسیداز: برای سنتز نانوذره پروتئینی ابتدا با استفاده از NaOH ۰/۱ مولار، pH آب دیونیزه ۷/۵ یا ۸ تنظیم شد، سپس ۰/۰۰۱ گرم از آنزیم برداشته و در ۰/۵ میلی لیتر آب دیونیزه با pH ۷/۵ یا ۸ حل گردید، سپس ۲ میلی لیتر اتانول توسط پمپ پریستالتیک با سرعت ۰/۲۵ ml/min، به محلول اضافه گردید. به محلول در حال همزدن و در دمای اتاق ۰/۲۳۵ میکرولیتر گلو تار آلدهید ۸ درصد اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در حمام یخ قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴

ساعت ۰/۰۵ گرم از L-Cys به محلول اضافه و محلول برای ۴ ساعت در یخچال هم‌زده شد. سپس محلول برای ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و بعد از دو بار شست و شو فعالیت نانو آنزیم ایجاد شده سنجیده شد (Liu et al., 2005).

ارزیابی دمای بهینه نانو آنزیم پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم، محلول های مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیمی پراکسیداز ۱۰ دقیقه در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در اینجا محلول سنجش بدون نانو آنزیم ۱۰ دقیقه در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس نانو آنزیم اضافه گردید و سنجش فعالیت نانو آنزیم با سه بار تکرار انجام شد.

ارزیابی pH بهینه نانو آنزیم پراکسیداز: با استفاده از بافر بریتون-رابینسون pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ تنظیم و بعد از اضافه کردن آنزیم، نمونه ها به حجم رسانده شدند و سنجش فعالیت آنزیمی در دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس با ۳ بار تکرار انجام شد.

بررسی پایداری فعالیت دمایی نانو ذره پراکسیداز: برای بررسی عملکرد دمایی، نانو آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس سنجش فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی عملکرد نانو آنزیم پراکسیداز در pH های مختلف: برای بررسی عملکرد نانو آنزیم پراکسیداز در pH های مختلف از بافر بریتون-رابینسون استفاده شد. به مدت ۳۰ دقیقه نانو آنزیم در دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی گراد pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ قرار گرفت و سپس سنجش فعالیت آنزیمی انجام شد.

نتایج و بحث

برای بررسی تجمع پروتئین ها از سرور AGGRESCAN 3D استفاده شد. امتیاز تجمع پذیری پروتئین های نمونه در مقاله (Luo et al., 2016) در جدول ۱ مشاهده می شود.

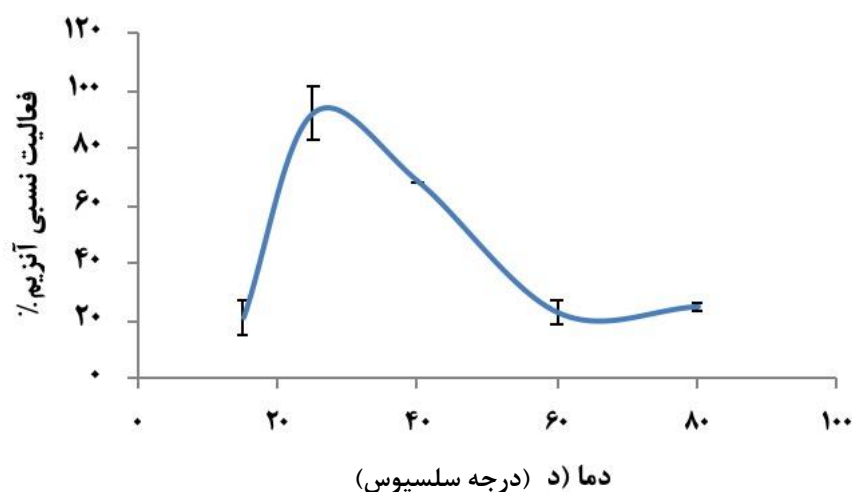
جدول ۱: امتیاز بندی تجمع پذیری بر اساس هیدروفوبیسیته پروتئین های نمونه در مقاله (Luo et al., 2016)

توسط سرور Aggrescan 3D		
Protein	PDB code	Score of hydrophobicity
Amyloid	2MXU	2.76
β -clamp	2POL	1.42
Trp RNA-binding attenuation protein	1QAW	1.27
Bacteriophage tail	4JPP	1.99
α -hemolysin pore complex	7AHL	3.05
Ferritin	1BFR	0.81
S-layer	4UID	1.23

هم چنین با استفاده از این سرور امتیاز تجمع پذیری آنزیم Horseradish peroxidase ۱/۳۳ به دست آمد.

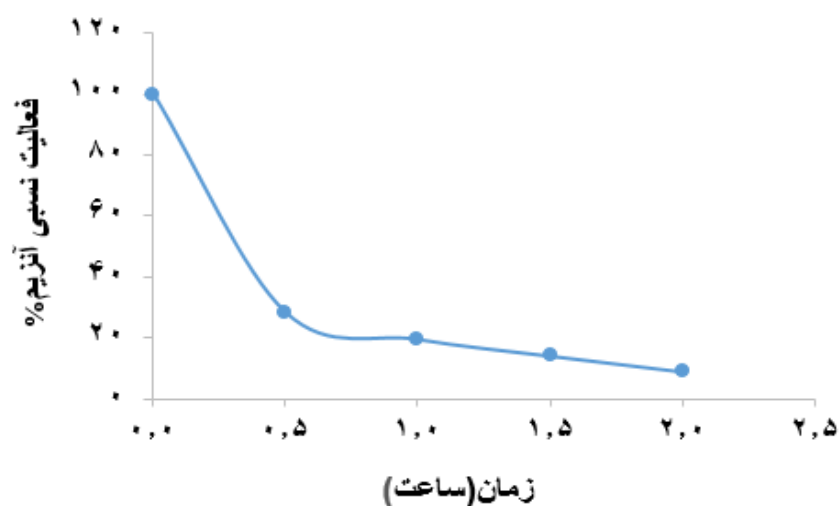
بررسی ویژگی های بیوشیمیایی قبل و بعد از نانو ذره شدن آنزیم پراکسیداز

عملکرد دمایی آنزیم پراکسیداز: بعد از قرار گرفتن آنزیم در دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نتایج حاصل از فعالیت آنزیم با ۳ بار تکرار در شکل ۱ قابل مشاهده است. در این نمودار فعالیت آنزیم در لحظه صفر بدون تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.



شکل ۱: بررسی پایداری فعالیت آنزیم در دماهای مختلف پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه

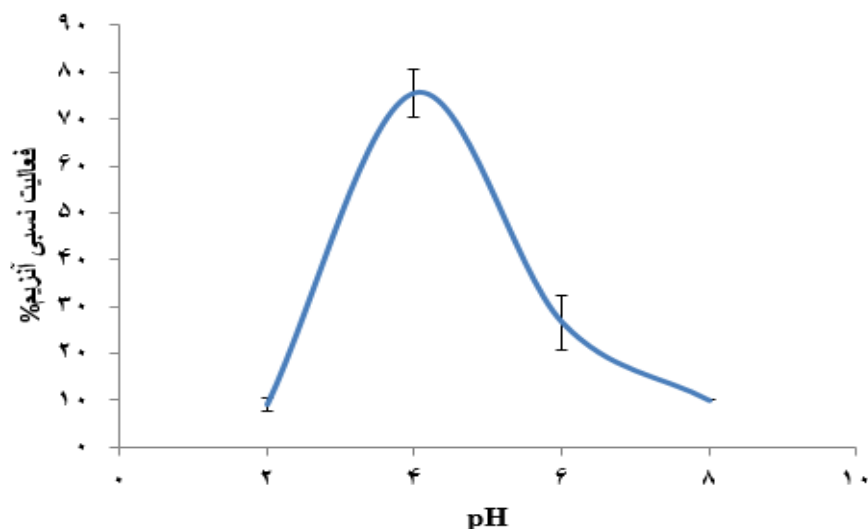
عملکرد آنزیم پراکسیداز در دمای ۸۰ درجه سلسیوس: بعد از قرار گرفتن آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه، ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، فعالیت باقی مانده آنزیم سنجش شد (شکل ۲). فعالیت آنزیم در لحظه صفر و بدون تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.



شکل ۲: فعالیت باقی مانده آنزیم پراکسیداز در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد طی ۲ ساعت

بررسی عملکرد آنزیم در pH های مختلف: بعد از قرار گرفتن آنزیم در pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ به مدت

۳۰ دقیقه، فعالیت باقی مانده آنزیم سنجیده شد. فعالیت آنزیم در pH ۶ در لحظه صفر ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۳).

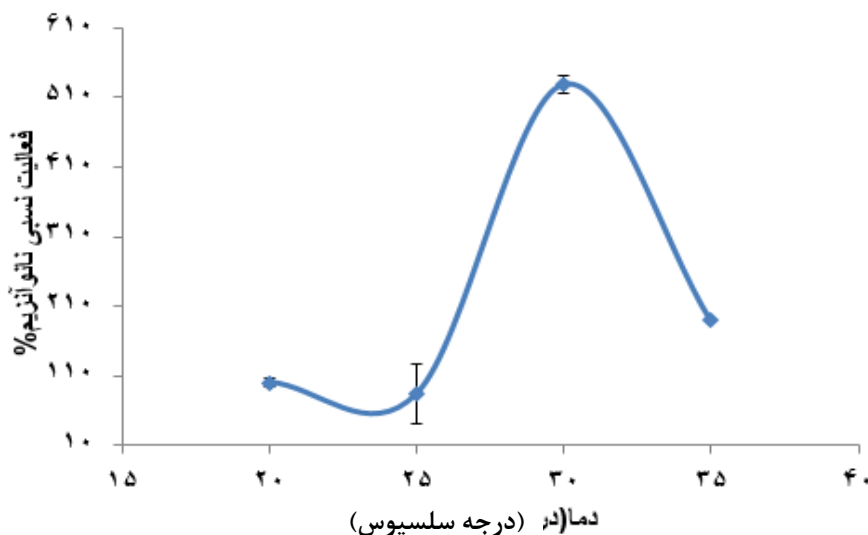


شکل ۳: بررسی پایداری فعالیت آنزیم پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در pH های مختلف

ارزیابی دمای بهینه نانوانزیم پراکسیداز: بعد از قرار گرفتن محلول سنجش فعالیت آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه در

دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم سنجیده شد. فعالیت آنزیم در لحظه صفر و هنگامی که محلول سنجش

فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۴).

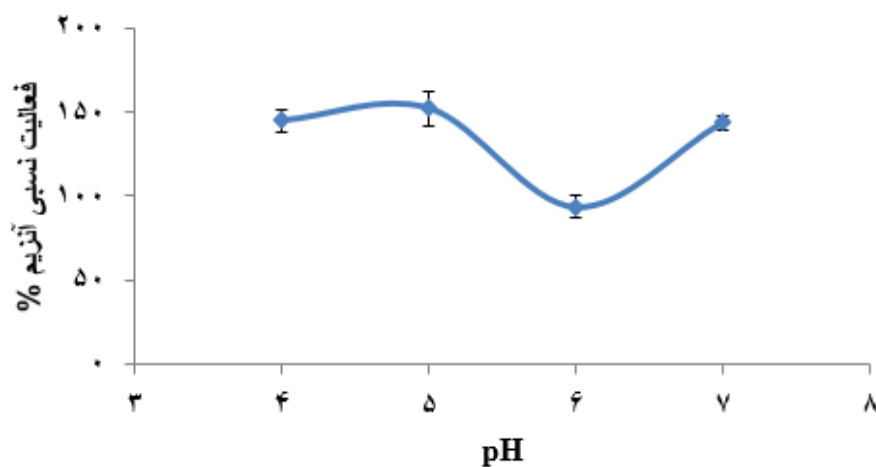


شکل ۴: بررسی دمای بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز

ارزیابی pH بهینه نانوانزیم پراکسیداز: pH بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز با استفاده از مقادیر مختلف pH بافر

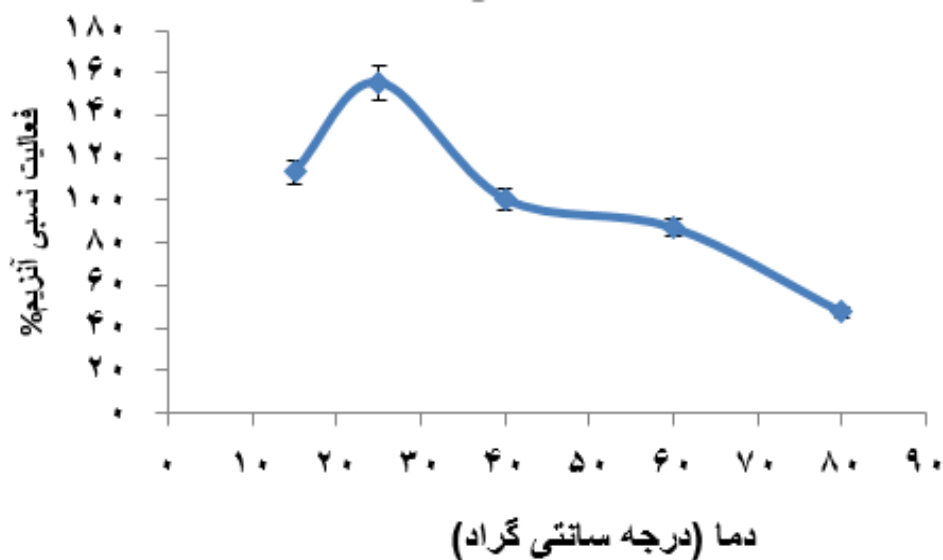
بریتون-رابینسون به جای بافر سنجش با pH ۶ که در روند معمول سنجش آنزیم به کار می رود، تعیین شد. فعالیت نانوانزیم

در بافر pH ۶، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی pH بهینه فعالیت نانوآنزیم پراکسیداز

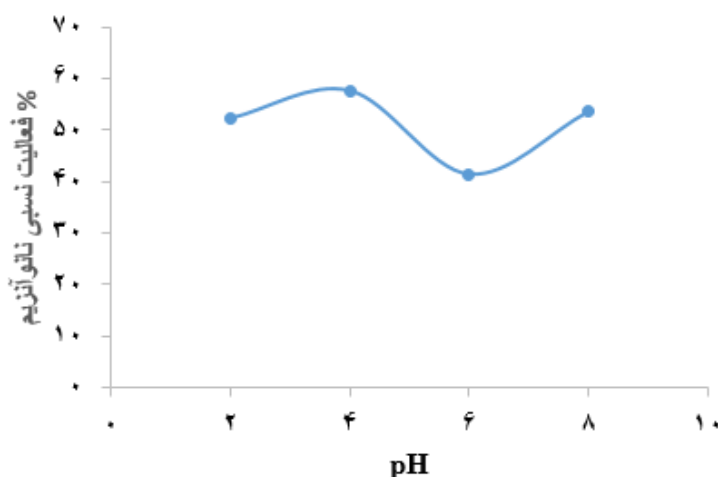
بررسی پایداری دمایی فعالیت نانوآنزیم پراکسیداز: برای بررسی پایداری دمایی، دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس انتخاب شدند. بعد از اینکه نانوآنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در هریک از این دماها قرار گرفت، نتایج حاصل از فعالیت نانوآنزیم با سه بار تکرار در شکل ۶ قابل مشاهده است. فعالیت نانوآنزیم در لحظه صفر در دمای ۳۰ درجه سانتی سلسیوس و pH ۷ بدون تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.



شکل ۶: پایداری دمایی نانوآنزیم پراکسیداز پس از قرار گیری در دماهای مختلف به مدت ۳۰ دقیقه

بررسی پایداری pH فعالیت نانوانزیم پراکسیداز: با استفاده از بافر بریتون-رابینسون نانوانزیم در pH های ۲، ۴،

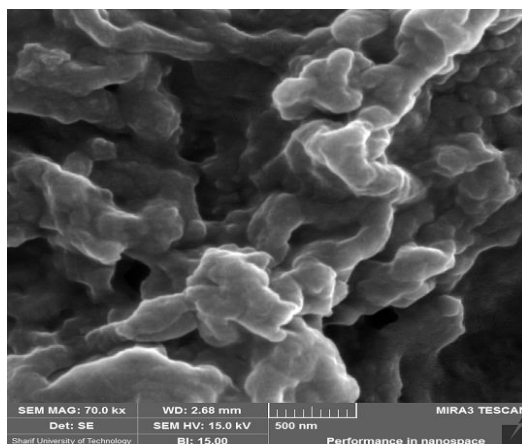
۶ و ۸ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. با استفاده از همین بافر، در pH ۷ فعالیت نانوانزیم در لحظه صفر محاسبه و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۷).



شکل ۷: بررسی پایداری فعالیت نانوانزیم در pH های مختلف در مدت زمان ۳۰ دقیقه

آنالیز نانوساختار پراکسیداز با استفاده از FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscope):

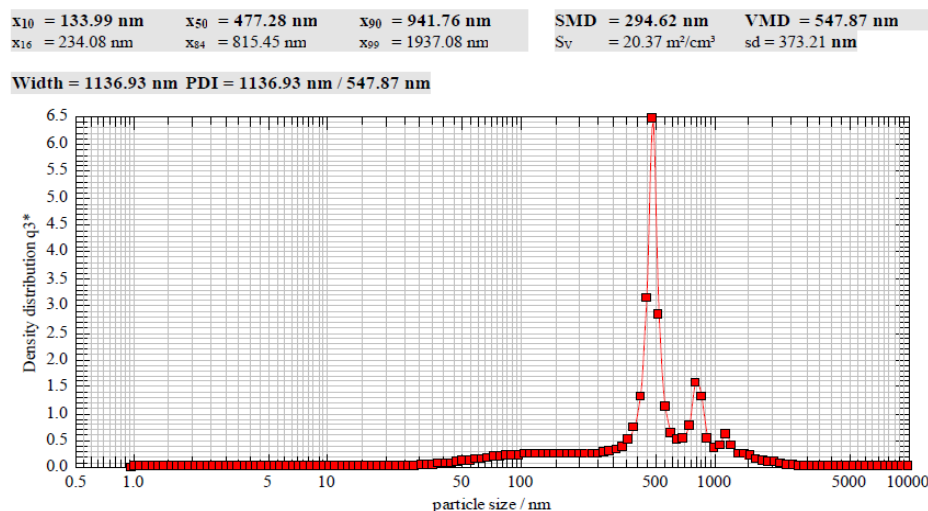
با بررسی هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM انجام گردید، مشاهده شد که این نانوذرات می توانند اندازه ای در حدود ۵۰۰ نانومتر داشته باشند (شکل ۸).



شکل ۸: نتایج حاصل از FESEM نانوانزیم پراکسیداز

آنالیز نانوانزیم پراکسیداز با استفاده از DLS (Dynamic Light Scattering): مقدار ۵۰ درصد نانوذرات اندازه

ی زیر ۴۷۷/۲۸ نانومتر دارند و دو پیک نشان دهنده پراکندگی اندازه نانوذرات می باشد (شکل ۹).

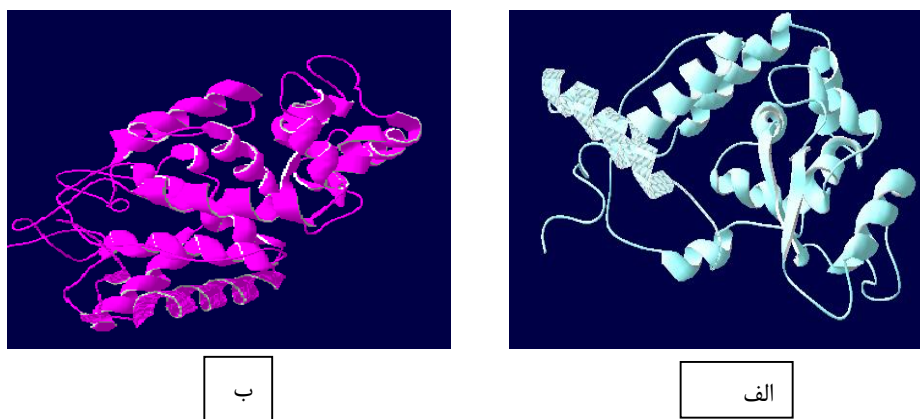


شکل ۹: نتایج حاصل از DLS نانوذرات پراکسیداز

بررسی بعضی از خصوصیات آنزیم و نانوذرات آنزیم با استفاده از ابزارهای محاسباتی

مدل سازی آنزیم با استفاده از همولوژی مدلینگ: مدل سازی پروتئین ها با استفاده از برنامه مدلر ۹-۱۹ انجام

شد که ساختار سوم آنزیم پس از بهینه سازی و کمینه سازی انرژی به صورت شکل ۱۰ قابل مشاهده است.



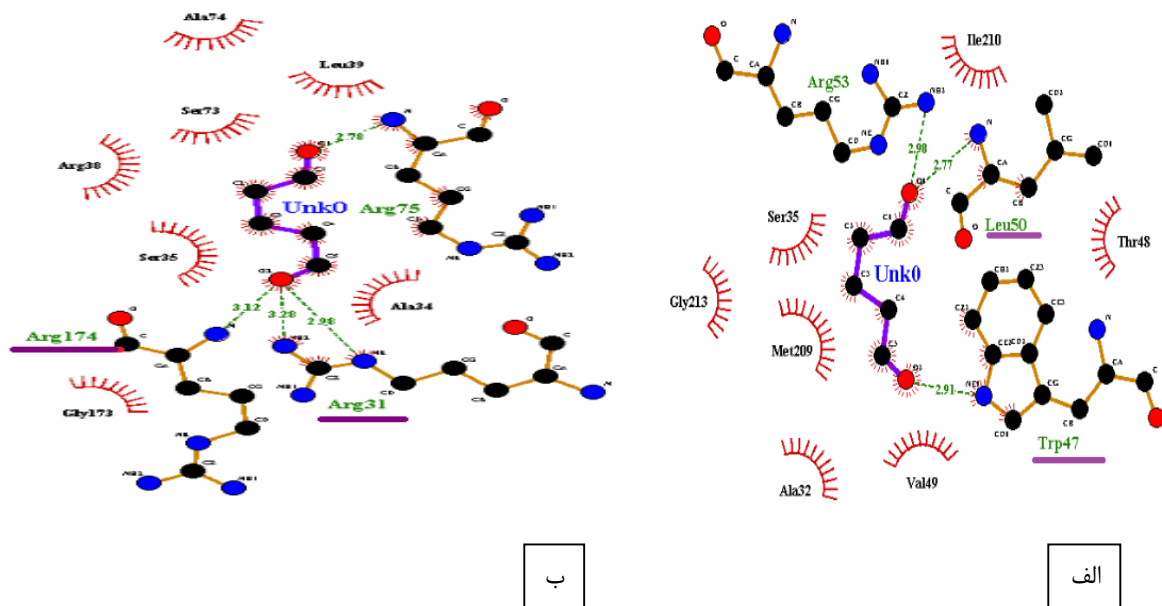
شکل ۱۰: الف) کد Uniprot P80679 ایزوآنزیم پراکسیداز و ب) کد Uniprot P59121 ایزوآنزیم پراکسیداز مدل سازی شده

بر اساس شباهت با الگو به وسیله برنامه مدلر ۹-۱۹ مشاهده شده در برنامه Swiss-PDB Viewer 4.1.0PDB

نتایج داکینگ آنزیم پراکسیداز و پپتیدسنتزی با گلوکارآلدئید: از بین ساختارهای ایجاد شده با استفاده از

برنامه اتوداک و نرم افزار LigPlot رزیدوهای که درگیر پیوند هیدروژنی و هیدروفوبی با آنزیم پراکسیداز هستند، مشخص

شدند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: مشاهده آمینو اسیدهای درگیر در برهم کنش گلوکارآلدهید و آنزیم پراکسیداز مدل سازی شده (الف) کد P80679 و (ب) کد P59121.

پیش گویی آمینو اسیدهای جایگاه فعال مدل های ساخته شده: برنامه کوچ که جایگاه فعال را پیش گویی می کند، با روش TM-SITE و S-SITE جایگاه فعال را پیش گویی می کند. در جدول ۲ و ۳ به ترتیب احتمال آمینو اسیدهایی که ممکن است در جایگاه فعال آنزیم با کد P59121 و P80679 باشد، مشخص شده است.

جدول ۲: پیش گویی جایگاه فعال P59121 توسط سرور کوچ

Rank	C-score	Ligname	Predicted binding site residue
1	0.81	HEM	31,34,35,38,41,73,139,140,141,148,152,163,166,169,170,172,173,174,175
2	0.64	BHO	38,41,42,68,69,139,141,179
3	0.63	FER	38,69,73,139,140,142,179
4	0.62	CA	171,222,225,228,230
5	0.59	ACT	38,41,42,139

C-score: ضریب اطمینان برای پیش گویی ساختار PDB است. این ضریب بین ۰-۱ است و هر چه عدد به ۱ نزدیک تر باشد نشان دهنده پیش گویی دقیق تر است.

PDB HIT: نشان دهنده کد پروتئین الگو می باشد.

Ligname: نام لیگاند

Predicted binding site residues: پیش گویی جایگاه اتصالی لیگاند به آمینو اسیدها

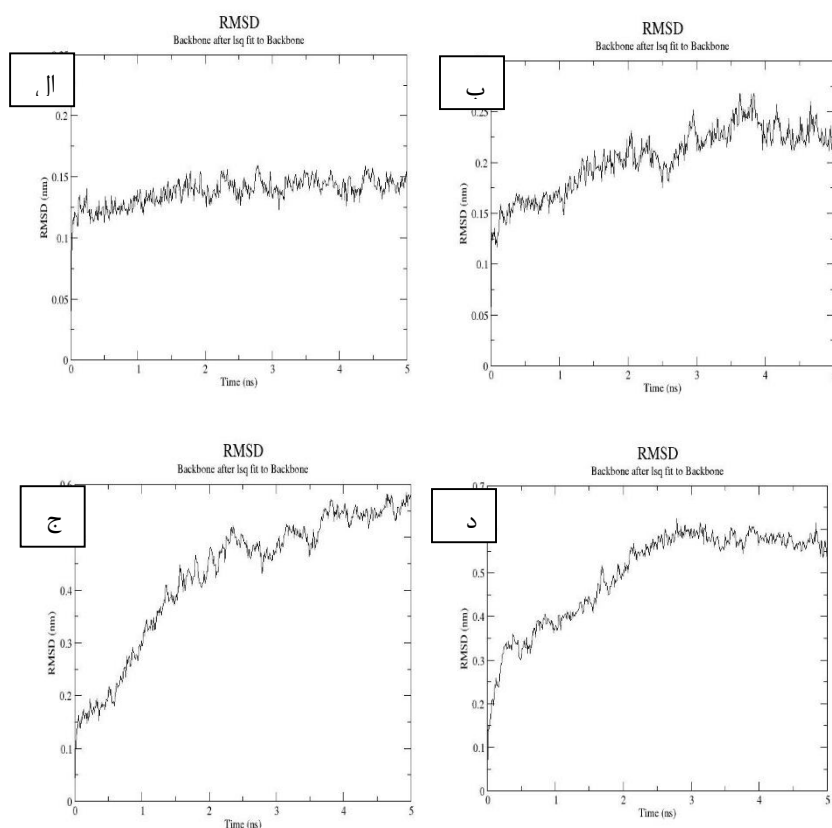
جدول ۳: پیش‌گویی جایگاه فعال P80679 توسط سرور کوچ.

Rank	C-score	Ligname	Predicted binding site residues
1	0.97	HEM	34,35,37,38,41,139,140,141,148,152,166,167,169,170,172,173,174,175
2	0.21	BHO	38,41,42,68,69,139,140,141,179
3	0.12	26D	170,172,173,174,175,221,143,244,247
4	0.10	CA	171,22,225,228,230
5	0.07	CA	43,46,47,48,50,52

نتایج محاسبات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: با روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و نرم افزار گرومکس در

مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس مدل های ساخته شده آنزیم پراکسیداز و کمپلکس مدل های ساخته شده با

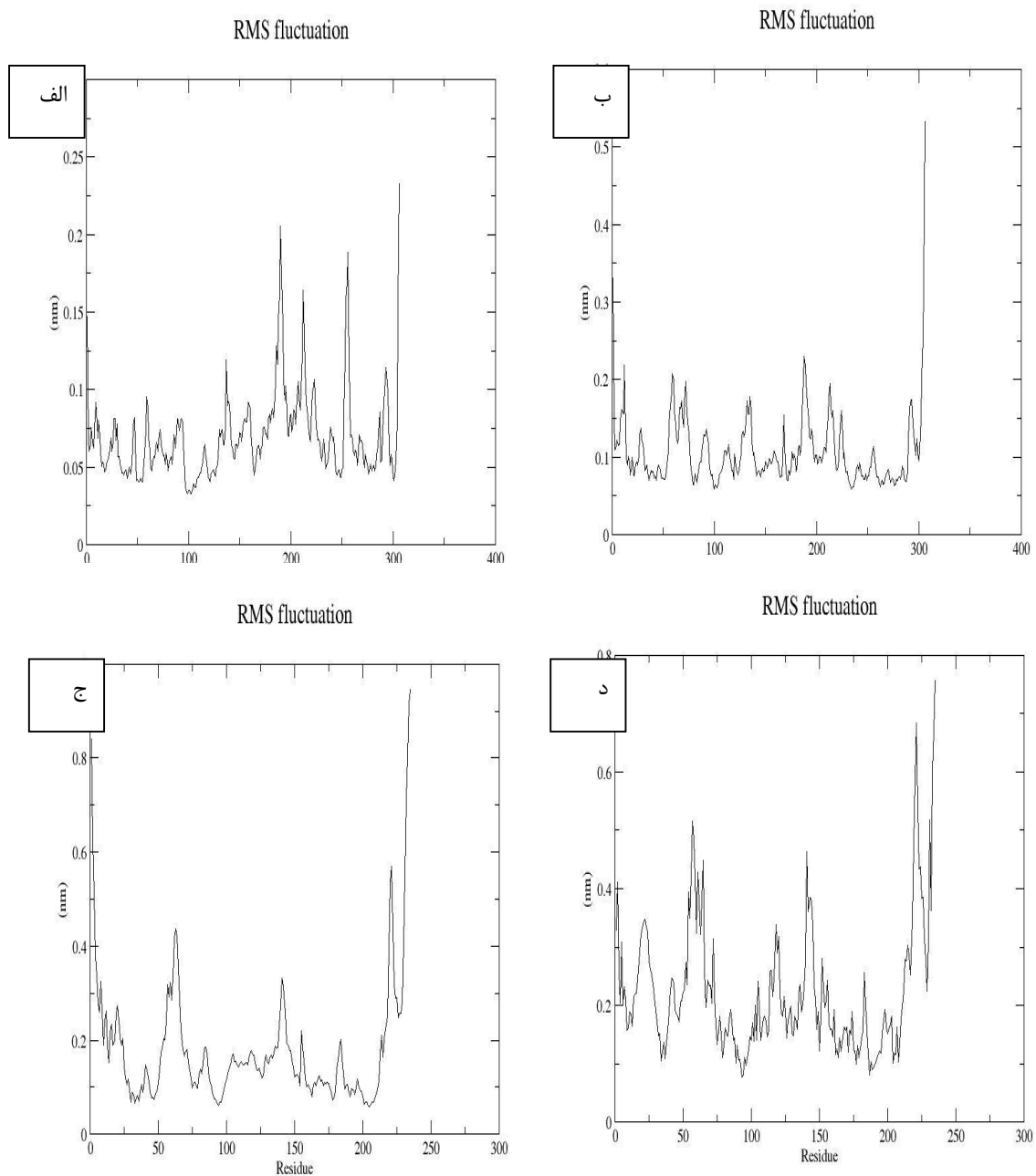
گلوتارالدهید بررسی شدند (اشکال ۱۲ تا ۱۵) که نشان داده شد آنزیم و نانواآنزیم در این مدت زمان پایدارند.



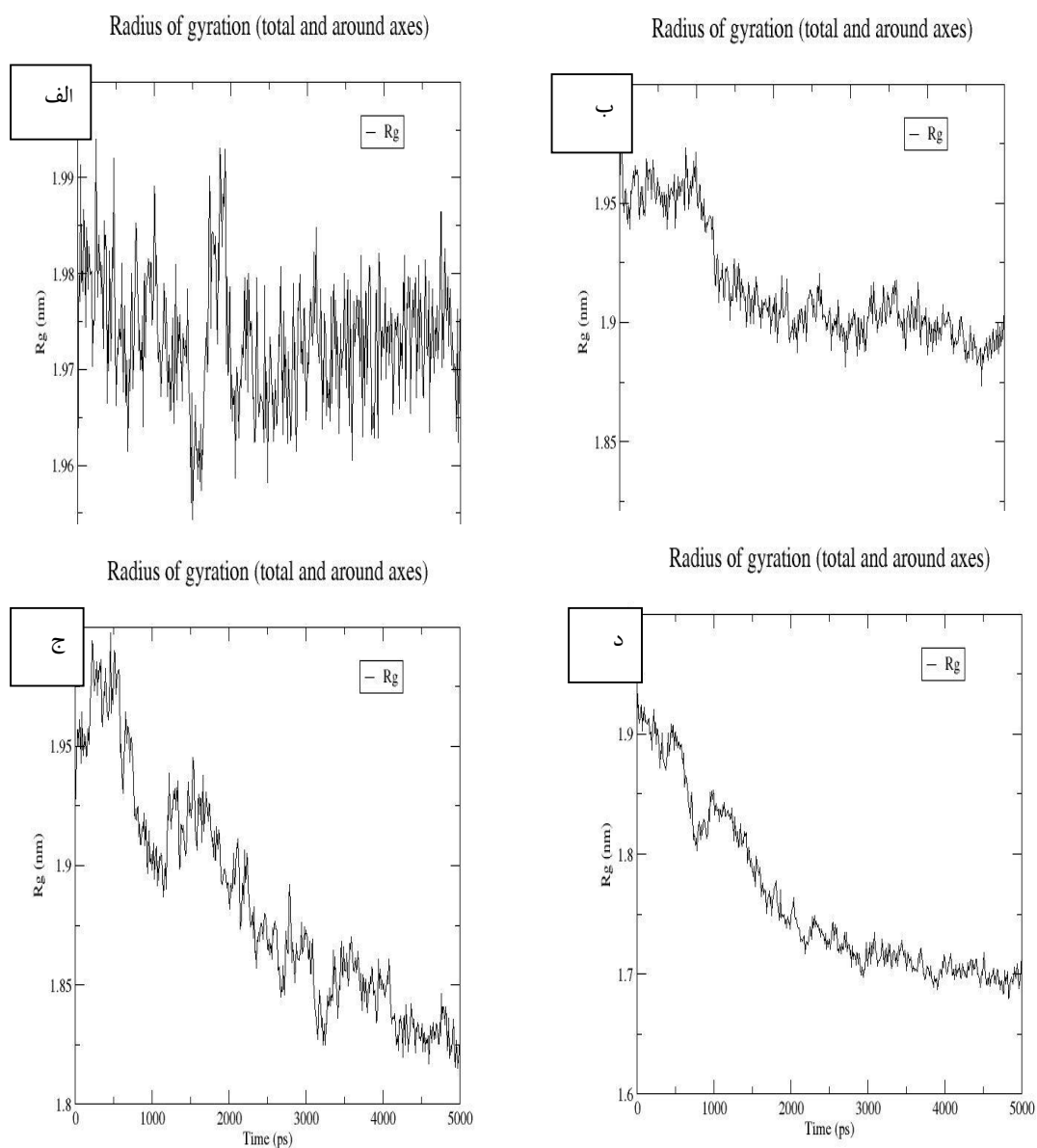
شکل ۱۲: نمودار RMSD مربوط به شبیه‌سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم

پراکسیداز. شکل الف: مربوط به کد P59121. شکل ب: مربوط به کد P59121 با گلوتارآلدهید. شکل ج: مربوط به کد P80679.

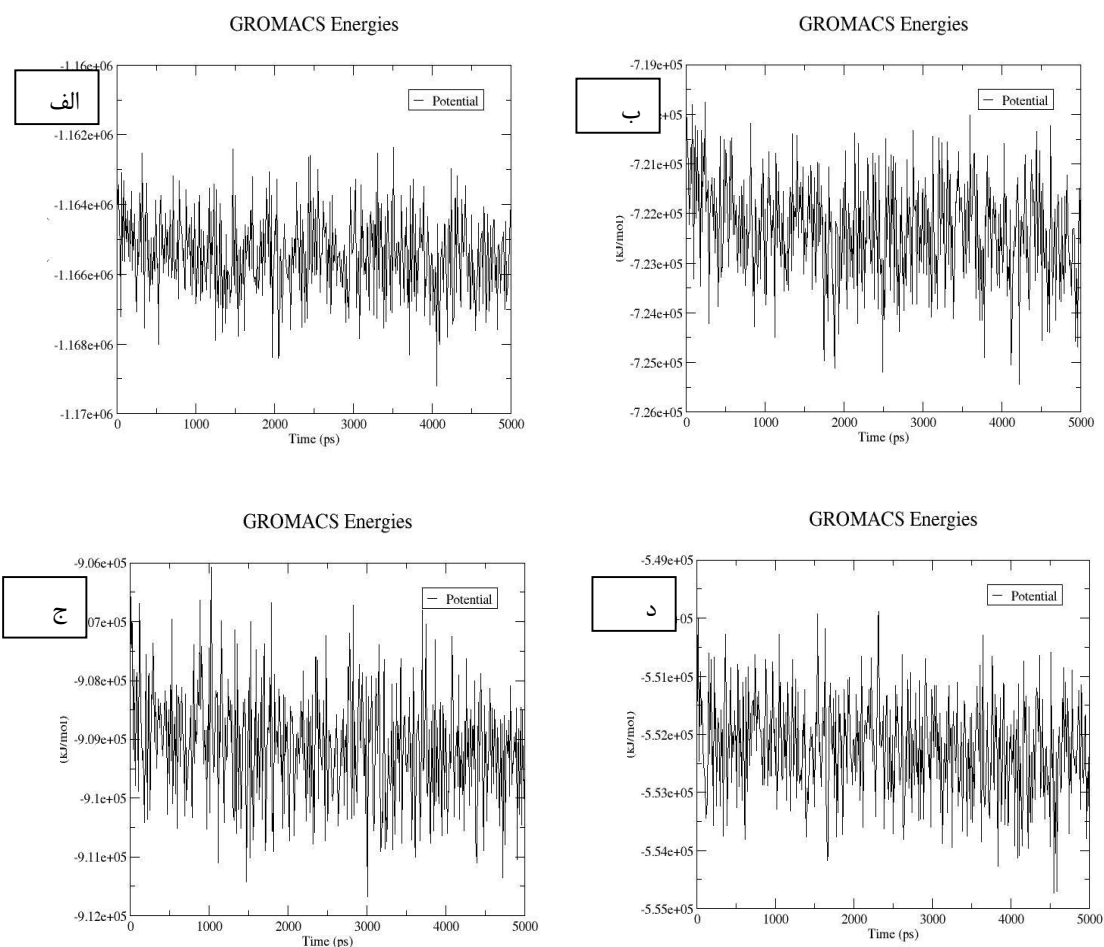
شکل د: مربوط به کد P80679 با گلوتارآلدهید



شکل ۱۳: نمودار RMSF مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلوکار آلدهید. ج: مربوط به کد P80679. شکل د: مربوط به کد P80679 با گلوکار آلدهید



شکل ۱۴: نمودار R_g مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلوآرآلدهید. ج: مربوط به کد P80679. د: مربوط به کد P80679 با گلوآرآلدهید



شکل ۱۵: نمودار انرژی پتانسیل مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلو تار آلدئید. ج: مربوط به کد P80679. د: مربوط به کد P80679 با گلو تار آلدئید

تجمعات پروتئینی کاربرد گسترده ای در حسگرهای زیستی (Qi *et al.*, 2004)، در طراحی بیوکاتالیزورهای حیاتی (Ma *et al.*, 2016) و در تشخیص زیست پزشکی و درمان (Sripriyalakshmi *et al.*, 2014) دارند.

در این پژوهش ابزارهای زیست محاسباتی که تجمع پروتئین ها را بر اساس هیدروفوبیسته پیش گویی می کنند، بررسی شدند. بیشتر ابزارهایی که به منظور پیش گویی تجمع پذیری پروتئین استفاده می شوند، از توالی به عنوان ورودی استفاده می کنند؛ بنابراین نمی توانند ویژگی تجمع پذیری در پروتئین های کروی را بررسی کنند اما سرور Aggrescan 3D با در نظر گرفتن ساختار پروتئین، نقاطی که مستعد تجمع پذیری هستند را پیش گویی می کند و این محدودیت را ندارد (Zamberano *et al.*, 2015). با استفاده از این سرور می توان آمینو اسیدهایی که مستعد تجمع پذیری می باشند را جهش داد و حلالیت آن ها را افزایش داد. این سرور نوسانات مکانیکی ساختار پروتئین در محلول را که می تواند بر روی تمایل تجمع پذیری پروتئین اثر بگذارد، بررسی

می‌کند. A3D Dynamic Mode از روش CABS Flex و دو روش ساخت نانو مواد در نانو فناوری برای شبیه سازی سریع پروتئین‌های کروی استفاده می‌کند (Zamberano *et al.*, 2015) <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D/>

برای بررسی و ایجاد نانوذره پروتئینی، به دلیل امکان سنجش عملکرد، پروتئینی با خصوصیت آنزیمی انتخاب شد. امتیاز تجمع پذیری آنزیم پراکسیداز با استفاده از سرور A3D ۱/۳۳ به دست آمد و به همین دلیل آنزیم پراکسیداز انتخاب شد زیرا امتیاز آنزیم پراکسیداز بالاتر از ۱ و نشان‌دهنده این است که پروتئین از نظر هیدروفوبیسته توانایی تجمع پذیری مناسب دارد.

اولین ویژگی مورد سنجش آنزیم پراکسیداز فعالیت آن بود، که جذب رنگ ایجاد شده ناشی از فعالیت آنزیم در ۴۲۰ نانومتر در مدت زمان ۳ دقیقه به فاصله هر ۳۰ ثانیه خوانده شد. در این پژوهش ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم پراکسیداز قبل و بعد از نانوذره شدن مورد بررسی قرار گرفتند؛ آنزیم پراکسیداز خالص دارای دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH بهینه ۶ می‌باشد. با توجه به مطالعات پیشین (دماهای ۲۰، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس برای بررسی پایداری دمایی انتخاب شدند) (Koksall *et al.*, 2008). در هنگام بررسی پایداری دمایی برای فعالیت آنزیم پراکسیداز مشخص شد که آنزیم پراکسیداز پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداکثر فعالیت را نسبت به سایر دماها دارد (شکل ۱) در صورتی که آنزیم در دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ دقیقه حدود ۲۴ درصد فعالیت دارد.

به‌منظور بررسی پایداری فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، محلول آنزیمی در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد و سپس در زمان‌های ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت قرارگیری در این دما، هر بار از آنزیم برداشته و بر روی یخ گذاشته شد تا شرایط برای همگی با شرایط آنزیم بدون تیمار دمایی یکسان باشد. پس از بررسی فعالیت باقی‌مانده آنزیم در دماهای مختلف، از آنجا که مشخص شد آنزیم توانسته است پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای ۸۰ درجه سلسیوس نزدیک به ۲۴ درصد فعالیت خود را حفظ کند، پایداری فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس تا ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

در این پژوهش برای بررسی پایداری فعالیت آنزیم در pHهای مختلف، از بافر بریتون-رابینسون استفاده شد که بافری طیف وسیع است و بدین صورت فقط اثر pH بررسی می‌شود و نوع بافر در pHهای مختلف تفاوت نمی‌کند؛ در حالی که در روند معمولی سنجش فعالیت آنزیم از بافر پتاسیم فسفات با pH ۶ استفاده شد. با بررسی که بر روی pHهای مختلف برای فعالیت آنزیم در مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام شد، مشخص گردید که فعالیت باقی‌مانده آنزیم در pH ۴ حدود ۷۵ درصد می‌باشد. در حالی که در pHهای ۲، ۶ و ۸ فعالیت باقی‌مانده آنزیم به ترتیب حدود ۹ درصد، ۲۶ درصد و ۱۰ درصد می‌باشد (شکل ۳).

بعد از بررسی این خصوصیت‌ها، آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Desolvation و با استفاده از گلو تار آلدهید تبدیل به نانوذره شد (Liu *et al.*, 2005) و بررسی‌های FESEM نشان داد؛ نانوذرات قطری حدود ۵۰۰ نانومتر دارند.

سنجش فعالیت آنزیم نانو شده مانند سنجش فعالیت آنزیم مونومر در pH ۶ و دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد. جذب این آنزیم در مدت زمان ۳ دقیقه به فاصله هر ۳۰ ثانیه در این طول موج خوانده و مشاهده شد؛ نانوذره آنزیم جذب کمتری در مقایسه با آنزیم مونومر دارد در صورتیکه انتظار می رفت که آنزیم نانو شده به دلیل جایگاه های فعال بیشتر نسبت به آنزیم مونومر فعالیت بیش تری از خود نشان دهد. البته این کاهش جذب می تواند به دلیل تجمعات پروتئینی نیز باشد.

در این پژوهش بعد از تولید نانو ذره، دمای بهینه فعالیت آن به دست آمد. برای به دست آوردن دمای بهینه با توجه به اینکه محلول سنجش فعالیت آنزیم مونومر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار می گیرد، برای بررسی دمای بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز محلول سنجش فعالیت به ترتیب ۱۰ دقیقه در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد آنزیم فعالیت نسبی بیشتری نسبت به سایر دماها دارد. بررسی فعالیت نانوانزیم در دماهای مختلف نشان داد دمای بهینه فعالیت نانوانزیم ۳۰ درجه سلسیوس است که این دما از دمای آنزیم های مونومر بالاتر بود. دلیل احتمالی این موضوع می تواند به دلیل تاخوردگی بیشتر ساختار نانوانزیم نسبت به آنزیم مونومر باشد و در دمای بالاتر جایگاه فعال بیشتری از نانوانزیم در معرض سوستر قرار می گیرد (Chattopadhey & Mazumdar., 2006).

با بررسی که بر روی pH های بهینه برای فعالیت آنزیم در هر یک از این بافرها انجام گرفت، مشخص شد که فعالیت آنزیم در بافر سنجش با pH ۷ بیش تر از فعالیت در همان بافر با pH ۶ است (شکل ۵). درحالی که آنزیم مونومر در pH بهینه ۶ دارای بیش ترین فعالیت بود. دلیل احتمالی این موضوع تغییر در بار سطحی آنزیم به هنگام نانو شدن می باشد.

بررسی پایداری دمایی فعالیت نانوانزیم پراکسیداز نشان داد نانوانزیم مانند آنزیم مونومر پس از قرار گیری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین فعالیت را نسبت به سایر دماها دارد (شکل ۶).

فعالیت آنزیم در لحظه صفر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، ۱۰۰ درصد است اما وقتی ۳۰ دقیقه در این دما می ماند فعالیت آن به ۱۶۰ درصد افزایش می یابد که این می تواند به خاطر اثر فزاینده دما در سرعت انجام واکنش باشد (Chattopadhey & Mazumdar., 2006). نانوانزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس ۴۷ درصد فعالیت خود را حفظ می کند، در صورتی که آنزیم در این دما ۲۴ درصد فعالیت خود را حفظ می کند که نشان دهنده پایدار شدن نانوانزیم نسبت به مونومر آنزیمی می باشد. دلیل این موضوع می تواند این باشد که نانوانزیم نسبت به آنزیم دارای تاخوردگی بیشتری است و نشان دهنده پایداری بیشتر نانوانزیم است.

بررسی فعالیت نانو آنزیم در اسیدیته های مختلف نشان داد نانوانزیم در pH ۴ دارای پایداری بیشتری نسبت به سایر pHها بود. مقایسه پایداری pH آنزیم نانو شده و آنزیم مونومر نشان می دهد که هر دو در محیط اسیدی پایداری بیشتری نشان دادند.

با بررسی هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM صورت گرفت، مشاهده شد که این نانوذرات اندازه ای حدود ۵۰۰ نانومتر دارند (شکل ۸). برای بررسی قطر هیدرودینامیکی و پراکندگی نانوذرات از آنالیز DLS استفاده شد. نانوذرات دارای قطر هیدرودینامیکی ۵۴۷/۸۷ نانومتر و مقدار شاخص پراکندگی ذرات ۲/۰۷ به دست آمد که نشان دهنده پراکندگی بالای نانوذرات می باشد (شکل ۹).

سنجش فعالیت نانو آنزیم نشان داد که فعالیت آن در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و pH ۷ کم شده است. به علت کم شدن فعالیت آنزیم بررسی های زیست محاسباتی بر روی ایزو آنزیم های پراکسیداز قبل و بعد از نانو شدن انجام گرفت. با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز در آزمایشگاه توسط گلو تار آلدهید به نانو آنزیم تبدیل شد، در بررسی های محاسباتی، داکینگ این آنزیم با گلو تار آلدهید بررسی گردید. در داکینگ به علت تغییر طول پیوند و زاویه پیوند حالت های مختلف وجود دارد که بهترین حالت برای بررسی های بعدی انتخاب شد. نتایج داکینگ مدل های پروتئینی ساخته شده در نرم افزار لیگ پلات نشان داد که در مورد کد P59121 آمینو اسید آمینو اسید های Arg 31، Arg 75 و Arg 174 در پیوند هیدروژنی با گلو تار آلدهید نقش داشتند. آمینو اسید آمینو اسید های Ser 35، Ala 34، Arg 38، Ser 73 و Leu 39 در بر هم کنش هیدروفوبیک دیده می شوند (شکل ۱۱. ب). در مورد کد P80679 آمینو اسید آمینو اسید های در گیر در پیوند هیدروژنی با گلو تار آلدهید Arg 53، Lue 50 و Trp 47 بودند. آمینو اسید آمینو اسید های Ile 210، Thr 48، Ser 35، Gly 213، Met 209، Ala 32 و Val 49 در برهم کنش های هیدروفوبیک نقش دارند (شکل ۱۱. آ). از آنجایی که فعالیت نانو آنزیم کم شده بود با استفاده از سرور کوچ جایگاه فعال آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که نتایج در جدول ۲ و ۳ نشان می دهد گلو تار آلدهید با اتصال به این آمینو اسید آمینو اسید ها در جایگاه فعال آنزیم می تواند سبب کاهش فعالیت نانو آنزیم شود.

در این پژوهش برای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی دو ایزو آنزیم پراکسیداز در دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس و pH ۷ بهینه و پپتید در دما و pH ی که نانوذره پروتئینی سنتز شد، قرار گرفتند. محاسبات RMSD و انرژی پتانسیل به ترتیب در نمودار ۱۲ و ۱۵ نشان دهنده پایداری سیستم در طول شبیه سازی است. محاسبات RMSF (شکل ۱۳) نشان دهنده بخش های انعطاف پذیر در پروتئین در طول زمان است که نمودارها نشان می دهند در مورد آنزیم الگوی رفتاری انعطاف پذیر پروتئین در حالت تنها و در حالت کمپلکس با گلو تار آلدهید شبیه به هم بوده است. محاسبات Rg (شکل ۱۴) نشان دهنده پایداری ساختار سه بعدی در طول شبیه سازی می باشد. آنزیم در حالت اتصال به گلو تار آلدهید بعد از ۱ نانوثانیه کاهش محسوسی در Rg نشان

داد که گویای این موضوع است که سیستم به علت تشکیل نانوانزیم دارای تاخوردگی بیشتری شده و R_g کاهش یافته، که در طول زمان این کاهش ثابت باقی می ماند.

نتیجه گیری

در نانوفناوری برای ساخت نانوذرات پروتئینی از ویژگی تجمع پذیری پروتئین ها استفاده می شود. عوامل ذاتی مانند میانکنش های هیدروفوب بین اتم ها، ساختارهای آمیلوئیدی و Coiled coil هم چنین استفاده از واسطه هایی مانند آپتامرها و کراس لینک ها و غیره می توانند باعث تجمع پذیری پروتئین شوند و با استفاده از ابزارهای زیست محاسباتی می توان این عوامل را بررسی کرد. در این پژوهش تجمع پروتئین ها بر اساس ویژگی آب گریزی آن ها مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از ابزار زیست محاسباتی Aggrescan 3D استفاده شد. با استفاده از این سرور ابتدا پروتئین هایی به عنوان کنترل بررسی شدند. سپس امتیاز آنزیم پراکسیداز با این سرور بررسی شد و با امتیاز پروتئین های کنترل مقایسه گردید. آنزیم پراکسیداز دارای امتیاز قابل قبول و به عنوان کاندیدا انتخاب شد. خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم قبل و بعد نانو شدن مورد بررسی قرار گرفت. سپس پراکسیداز به کمک کراس لینک با گلو تار آلدهید به نانوذره تبدیل شد. نتایج FESEM و DLS این قضیه را تایید کردند. آنزیم پراکسیداز دارای دمای بهینه ۲۰ درجه سانتی گراد و pH ۶ بهینه می باشد. در صورتی که نانوانزیم پراکسیداز در دمای بالاتر (۳۰ درجه سانتی گراد) و pH خنثی فعالیت می کرد. هر دو در محیط اسیدی پایدار بودند و هر دو در ۲۵ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین فعالیت خود را داشتند.

با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی پایداری دو ایزوآنزیم که وزن مولکولی مشابه با پراکسیداز داشتند، در محیط *in silico* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که هم آنزیم مونومر و هم نانوانزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۵ نانوثانیه نسبتا پایدار هستند ولی گلو تار آلدهید با اتصال آمینو اسیدهایی در جایگاه فعال آنزیم می تواند سبب کاهش فعالیت نانو آنزیم شود که عملا نیز ثابت شد.

منابع

- Amdursky, N., Molotskii, M., Gazit, E., & Rosenman, G. (2010). Elementary building blocks of self-assembled peptide nanotubes. *J Am Chem Soc*, 132(44), 15632–15636. <https://doi.org/10.1021/ja104373e>
- Chattopadhey, K and Mazumdar, S. (2006). Structural and conformation stability of horseradish peroxidase effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 39(1), 263–270, <https://doi.org/10.1021/bi990729o>
- Feverati, G., Achoch, M., Zrimi, J., Vuillon, L., & Lesieur, C. (2012). Beta-strand interfaces of non-dimeric protein oligomers are characterized by scattered charged residue patterns. *PLoS ONE*, 7(4), e32558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032558>
- Klaessig, F., Marrapese, M., & Abe, S. (2011). Nanotechnology Standards. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7853-0>

- Liu, G., Lin, Y., Ostatná, V., & Wang, J. (2005). Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor. *Chemical Communications* (Cambridge, England), (27), 3481–3483. <https://doi.org/10.1039/b504943a>
- Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R., & Liu, J. (2016). Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chemical Reviews*, 116(22), 13571–13632. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00228>
- Lenga, Robert E. (1988). The Sigma-Aldrich library of chemical safety data. [Milwaukee, Wis., USA] :Sigma-Aldrich Corp.
- Philo, J., & Arakawa, T. (2009). Mechanisms of Protein Aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4), 348–351. <https://doi.org/10.2174/138920109788488932>
- Qi, K., Ma, Q., Remsen, E. E., Clark, C. G., & Wooley, K. L. (2004). Determination of the bioavailability of biotin conjugated onto shell cross-linked (SCK) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(21), 6599–6607. <https://doi.org/10.1021/ja039647k>
- Selkoe, D. J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426(6968), 900–904. <https://doi.org/10.1038/nature02264>
- Sripriyalakshmi S, Jose P, Ravindran A, et al. Recent trends in drug delivery system using protein nanoparticles. *Cell Biochem Biophys*. (2014); 70:17–26.
- Yan, X., Zhu, P., & Li, J. (2010). Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chemical Society Reviews*, 39(6), 1877-1890. <https://doi.org/10.1039/b915765b>
- Zambrano, R., Jamroz, M., Szczasiuk, A., Pujols, J., Kmiecik, S., & Ventura, S. (2015). AGGRESCAN3D (A3D): Server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W306–W313. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv359>

Characterization and nanoparticle synthesis of peroxidase by computational and experimental methods

Sh. Fooladband¹, P. Ghadam^{2*}, M. Zarrabi³

Received: 2019.7.17

Accepted: 2019.12.7

Abstract

Nano protein structures can be formed by the intrinsic ability of molecular self-assembly or via intermediates which improve their assembly. Hydrophobicity is the most important factor among the other intrinsic self-assembly factors and the other intermediates such as glutaraldehyde may lead to protein-assembly and nanoparticles formation. In this study, Aggrescan 3D software was employed to investigate protein self-assembly properties. Peroxidase enzyme was selected to form protein nanoparticle, and glutaraldehyde changed it to a nano enzyme. FESEM and DLS analysis represented that the average size of nano enzyme is about 500 nanometers. Comparing biochemical properties of peroxidase enzyme before and after changing into nano, showed that the activity of nano enzyme at 20°C, pH 7 has decreased as compared to the monomeric enzyme. Based on homology, the PDB structure of two peroxidase enzyme was identified. Then, the connection between glutaraldehyde and two peroxidase enzymes was detected. Enzyme residues with hydrogen binding connections to glutaraldehyde were also detected by using LigPlot software and the residues in active site of enzyme were determined by COACH server. Glutaraldehyde is connected to residues in active site of the enzyme. Molecular dynamic Simulation was performed in the time duration of 5 nanoseconds and 30°C and it showed that monomer enzyme and nano enzyme are both stable in this time duration and temperature.

Keywords: Biocomputational methods, Aggregation, Nano peroxidase enzyme.

1- M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

*(corresponding author: pghadam@alzahra.ac.ir)

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

بررسی دوریختی جنسی در شکل پاهای انبرکی اول و دوم و پای دمی سوم گونه *Parhyale*
***darvishi* (Momtazi and Maghsoudlou, 2016) بر اساس تکنیک‌های ریخت‌سنجی هندسی**
یگانه لایقی^۱، علی اکبر باقریان یزدی^{۲*}، فرزانه ممتازی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

در این پژوهش دوریختی جنسی در شکل پیش‌پنجه پاهای انبرکی اول و دوم و انشعاب خارجی پای دمی سوم گونه *Parhyale* (Momtazi & Maghsoudlou, 2016) بر اساس تکنیک‌های ریخت‌سنجی هندسی بررسی شد. ۱۰۰ نمونه نر و ۵۰ نمونه ماده مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپی از اندام‌های مورد مطالعه تهیه شد و داده‌های کارت‌زین هم‌ساخت (در مفهوم ریاضی آن) بر اساس نیم‌لندمارک‌های حاشیه‌های اندام‌ها استخراج شد و با لغزش نیم‌لندمارک‌ها بر اساس کم‌ترین انرژی خمش تراز گردید. معنی‌داری جدایی جنسیت‌ها با آزمون آنالیز واریانس چندمتغیره (MANOVA)، تحلیل ممیزی خطی (LDA) همراه با روش اعتبار سنجی متقابل و تحلیل خوشه‌ای با استفاده از روش Ward مورد آزمون قرار گرفت. برای به تصویر درآوردن تغییرات وابسته به جنسیت در شکل (ریخت‌شناسی) اندام‌های مورد مطالعه در قالب چهارچوب‌های تغییر شکل، آزمون رگرسیون چندمتغیره (Multivariate Regression) روی مولفه‌های شکلی (Partial Warps & The Uniform Components) انجام شد. جدایی جنسیت‌ها با هر سه آزمون برای سه اندام مورد مطالعه معنی‌دار بود ($F > 17.15$, $p < 0.0001$). چهارچوب‌های رگرسیون تغییر شکل در جنس‌های نر و ماده برای پای انبرکی اول نشان داد؛ پای انبرکی جنس ماده نسبت طول به عرض کمتری دارد. پای انبرکی دوم در افراد ماده کشیده‌تر و در افراد نر دایره‌مانندتر است. شکل پای دمی سوم در افراد نر کشیده‌تر و انتهای جلویی دارای گوشه‌های گرد شده است. پاهای انبرکی اول و دوم به همراه پای دمی سوم در گونه *P. darvishi* دارای دوریختی جنسی هستند. توصیف دقیق این دوریختی با توجه به اهمیت این ساختارها در تاکسونومی این گونه امکان بررسی دقیق‌تر گونه و همچنین شناسایی گونه بر اساس افراد ماده را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: دوریختی جنسی، *Parhyale darvishi*، ریخت‌سنجی هندسی، *Hyalidae*، نیم‌لندمارک.

۱- دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، استان گلستان

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، استان گلستان

* نویسنده مسئول: alibagherianyazdi@gmail.com, a.bagherian@gu.ac.ir

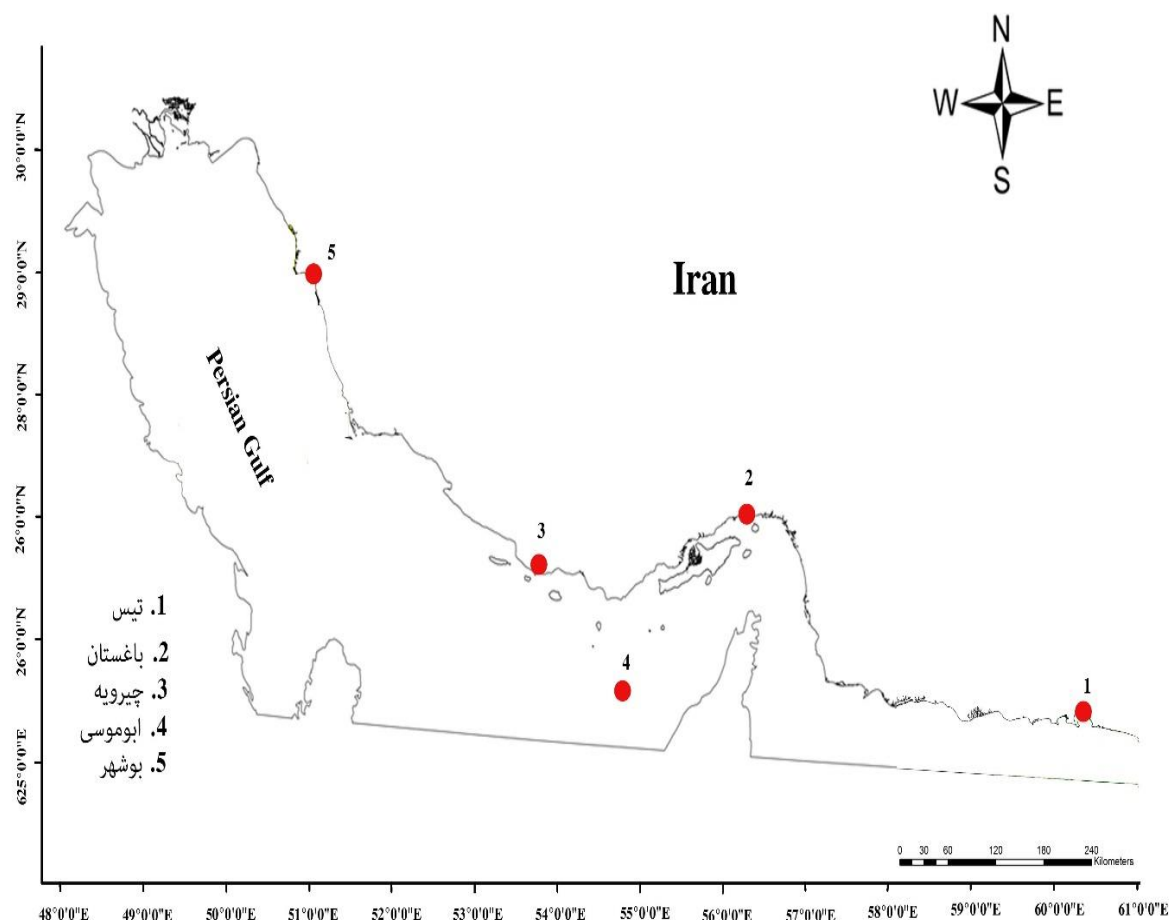
۳- استادیار پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی، تهران

مقدمه

دوجورپایان سخت‌پوستانی کوچک هستند که به دلیل تنوع بالای گونه‌ای و زیست‌بوم (زیستن در نواحی ساحلی، بخش‌های مختلف ستون آب، برخی زیست‌گاه‌های خشک و آب‌های شیرین)، و همچنین تنوع در روش تغذیه (فیلتری، شکارچی، گیاه‌خوار و ...) و زی‌توده (Biomass) بالا، نقش مهمی در زنجیره غذایی دارند (Olaso, 1999). به علاوه، از دوجورپایان به عنوان نشانگرهای زیست‌محیطی (Bioindicator) استفاده می‌شود، چرا که در کنار دارا بودن فراوانی و تنوع، حساسیت زیادی به آلودگی‌ها و سموم محیط نشان می‌دهند (Hay و همکاران، 1987). دوجورپایان در صنعت شیلات نیز از اهمیت بالایی برخوردار هستند، چرا که غذای اصلی ساردین و ماهی آزاد و غیره می‌باشند (Grosse و همکاران، 1986).

سرده *Parhyale* از اعضای تیره Hyalidae (یکی از ۲۲۸ تیره در راسته دوجورپایان) است. تاکنون ۱۹ گونه از این سرده در جهان گزارش شده است (Horton و همکاران، 2019). گونه *P. hawaiiensis* بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته و مطالعات بسیاری از جمله مطالعات تکوینی و ملکولی بر روی آن صورت می‌پذیرد و به عنوان "مدل تکوینی بندپایان" شناخته می‌شود (Rehm و همکاران، 2009؛ Kao و همکاران، ۲۰۱۶). گونه *P. darvishi*، تنها گونه از این سرده است که در بخش بالای جزرومدی سواحل خلیج فارس و دریای عمان توصیف، و به عنوان گونه غالب دوجورپایان در بخش ساحلی ایران معرفی شده است (Momtazi & Maghsoudlou, 2016).

دوریختی جنسی در دوجورپایان اغلب بسیار بارز است (Barnard, 1975). سرده‌های مختلف دوجورپایان را می‌توان به واسطه تفاوت در صفات جنسی ثانوی از جمله اندازه بدن، ساختار پاهای انبرکی (Moor & Wong, 1996)، و شاخک‌ها (Barnard, 1971) تشخیص داد. تکوین این صفات جنسی ثانوی، بیانگر تمایز جنسی و بلوغ افراد است (Hartnoll, 1982)؛ توصیف دقیق صفات جنسی ثانوی امکان تشخیص دقیق گونه، به خصوص در مواردی که فرد نر وجود ندارد، را فراهم می‌کند. ریخت‌سنجی هندسی، از راه‌های مطالعه صفات ریختی جانداران، با استفاده از تحلیل‌های دقیق آماری و ریاضی است (صناعی، ۱۳۹۴). استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی در راسته دوجورپایان بسیار اندک انجام شده و تنها به دو پژوهش محدود می‌شود: Riedlecker و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی، تنوع ریختی را در شکل پای انبرکی دوم گونه *Caprella mutica* آشکار کرد (Curatolo و همکاران (۲۰۱۳) نیز با کمک روش ریخت‌سنجی هندسی تنوع درون‌گونه‌ای در صفحه شکمی سوم گونه *Bathyporeia guilliamsoniana* را نشان داد. در پژوهش حاضر به بررسی دوریختی جنسی در *P. darvishi* در پیش‌پنجه پاهای انبرکی اول و دوم و انشعاب خارجی پای دمی سوم با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی پرداخته‌ایم تا تفاوت‌های ریختی جنسی در این سه بخش آناتومیک که ارزش تاکسونومیک بالایی نیز دارند مشخص شود.



شکل ۱: مشخصات ایستگاه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر

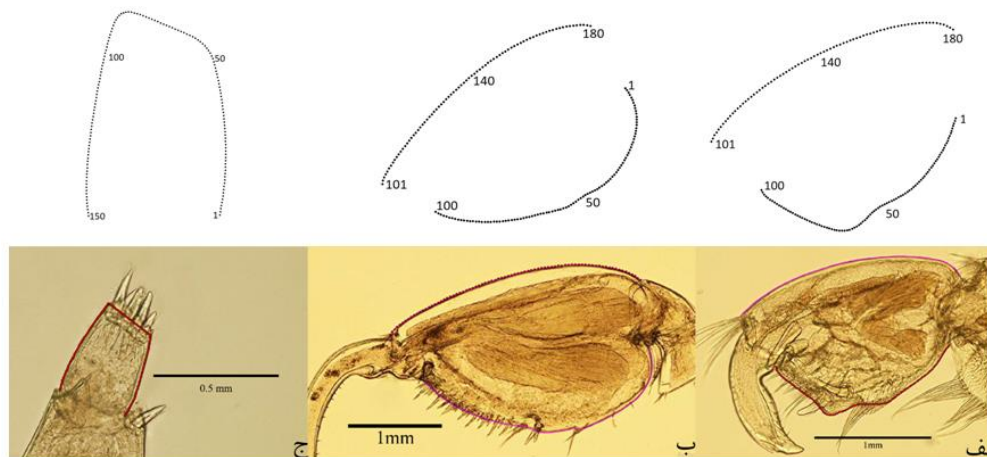
در این پژوهش، از نمونه‌های نگهداری شده در مجموعه پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی استفاده شد که در الکل ۹۶ تثبیت و نگهداری شده بودند. پنج ایستگاه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ و جدول ۱). در مجموع ۵۰ نمونه نر و ۵۰ نمونه ماده مطالعه شد. برای تشریح، نمونه‌ها روی اسلاید، درون گلیسرین - جهت نرم شدن بافت بدن - قرار داده شدند و سپس اجزای تشریح شده (پاهای انبرکی اول، دوم و پای دمی سوم) با لام تثبیت شدند.

تصاویر بخش‌های مورد بررسی توسط میکروسکوپ Nikon Eclipse 80i (ساخت کشور ژاپن) مجهز به دوربین گرفته شد. به منظور افزایش دقت در پیدا کردن حاشیه اجزای تشریح شده، از هر کدام، چندین عکس با وضوح متفاوت گرفته شد و توسط نرم‌افزار CombineZP به صورت یک عکس درآمد.

جدول ۱: تعداد افراد بررسی شده از هر ایستگاه به تفکیک جنسیت

شماره	نام ایستگاه	مختصات جغرافیایی	تعداد افراد نر	تعداد افراد ماده
۱	تیس	25°21'21"N 60°36'15"E	۱۰	۱۰
۲	باغستان	27°09'01"N 56°07'38"E	۱۰	۱۰
۳	چیرویه	26°42'42"N 53°43'57"E	۱۰	۱۰
۴	ابوموسی	25°52'7.52"N 55°1'6.38"E	۱۰	۱۰
۵	بوشهر	28°59'51.01"N 50°50'15.31"E	۱۰	۱۰

از آنجا که اندام‌های مورد مطالعه فاقد نقاط همساخت قابل اعتماد برای نشانه‌گذاری به عنوان لندمارک‌ها بودند از حاشیه‌های (Outlines) آن‌ها برای استخراج نیم‌لندمارک‌ها (Semilandmarks) استفاده شد. برای پیش‌پنجه پای انبرکی اول (G1) ۱۸۰ (شکل ۲، الف)، پای انبرکی دوم (G2) ۱۸۰ (شکل ۲، ب) و انشعاب خارجی پای دمی سوم (U3) ۱۵۰ (شکل ۲، ج) تعیین و داده‌های کارتزین (Cartesian Coordinate) با استفاده از نرم‌افزار tpsDig version 2.16 (Rohlf, 2010a) استخراج گردید (Digitized).



شکل ۲: تصاویر دیجیتال ساختار آناٹومیکی پیش‌پنجه پای انبرکی اول (الف)، پیش‌پنجه پای انبرکی دوم (ب) و انشعاب خارجی پای دمی سوم (ج) به همراه نیم‌لندمارک‌های تعریف شده در گونه *P. darvishi*

به منظور تراز کردن (Generalized Procrustes Analysis)، نیم‌لندمارک‌ها بر سطح منحنی فرضی محاسبه شده از میانگین شکل‌ها (Median Shape) لغزانده (Semilandmark Sliding) شدند تا کمترین انرژی خمش برای هر نیم‌لندمارک به‌دست آید (Bookstein و همکاران، ۲۰۰۲). دو روش برای لغزاندن نیم‌لندمارک‌ها روی منحنی محاسبه شده از حاشیه‌نگارها (Outlines) پیشنهاد شده است: نخست، روش کمترین انرژی خمش (Bookstein و همکاران، ۲۰۰۲) و دیگری کمترین فاصله پروکراست (یا برازش عمود بر محور Sheets و همکاران، ۲۰۰۴). به‌واسطه‌ی اینکه روش نخست نتایج بهتری در کارهای پیشین

نشان داده است و نتایج کمترین انرژی خمش با تفسیرهای زیست‌شناسی جانداران مورد مطالعه همخوانی بیشتری داشت (BagherianYazdi و همکاران، 2012؛ Seifert و همکاران، 2014؛ BagherianYazdi، 2014)، در این پژوهش از روش کمترین انرژی خمش استفاده شد. تراز داده‌ها و لغزاندن نیم لندمارک‌ها با نرم‌افزار tpsRelw version 1.49 (Rohlf, 2010b) انجام شد. همبستگی داده‌های تراز شده (Procrusted) با فاصله‌های متناظر در فضای شکلی حاصل از سایه تانژانتی نمونه‌ها (Tangent Shape Distances) به وسیله نرم‌افزار tpsSmall version 1.20 (Rohlf, 2003) آزمون گردید. معنی‌داری جدایی جنسیت‌ها با آزمون آنالیز واریانس چند متغیره (MANOVA) روی داده‌های تراز شده توسط نرم‌افزار tpsRegr version 1.37 (Rohlf, 2009) بررسی گردید. برای اطمینان بیشتر از معنی‌داری جدایی جنسیت‌ها، از تحلیل ممیزی خطی (LDA: Yu & Yang, 2001) همراه با روش اعتبار سنجی متقابل (Cross validation: Arlot & Celisse, 2010) با نرم‌افزار SPSS version 22 و تحلیل خوشه‌ای با استفاده از روش Ward توسط نرم‌افزار (Hammer و همکاران، 2001) PAST version 2.02 نیز انجام گردید. برای به تصویر درآوردن تغییرات وابسته به جنسیت در شکل (ریخت‌شناسی) اندام‌های مورد مطالعه در قالب چهارچوب‌های تغییر شکل، آزمون رگرسیون چندمتغیره (Multivariate Regression) روی مولفه‌های شکلی (Partial Warps & The Uniform Components) توسط نرم‌افزار tpsRegr version 1.37 انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز همبستگی، تغییرات شکلی پیش‌پنجه پای انبرکی اول و دوم، و همچنین انشعاب خارجی پای دمی سوم، همبستگی زیادی بین فضای شکلی (Shape Space) و فضای سایه تانژانتی (Tangent Space) وجود دارد ($p < 0.000$). بنابراین می‌توان از تحلیل‌های آماری خطی در آزمون‌های بعدی استفاده نمود. بر همین اساس، برای تشخیص جدایی شکلی سه بخش آناتومیک مورد بررسی در این تحقیق در بین دو جنس از آنالیز واریانس چند متغیره (MANOVA) استفاده شد. نتایج آزمون آنالیز واریانس چند متغیره نشان می‌دهد که ساختار شکلی در پیش‌پنجه پای انبرکی اول با مقدار $F = 165/4$ و $P < 0/000$ ، با مقدار $F = 76/62$ و $P < 0/000$ برای پیش‌پنجه پای انبرکی دوم و مقدار $F = 17/15$ و $P < 0/000$ برای انشعاب خارجی پای دمی سوم بین دو جنس متفاوت است (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج آزمون آنالیز واریانس چند متغیره (MANOVA) برای سه ساختار آناتومیکی بررسی شده

اندام مورد بررسی	درصد واریانس برای جنسیت‌ها	Goodall's F-test (F-value) ارزش	معنی داری (P-value)
پیش‌پنجه پای انبرکی اول	۵۲/۹۲	۱۶۵/۴	۰/۰۰۰
پیش‌پنجه پای انبرکی دوم	۳۴/۸	۷۶/۶۲	۰/۰۰۰
انشعاب خارجی پای دمی سوم	۱۰/۴۵	۱۷/۱۵	۰/۰۰۰

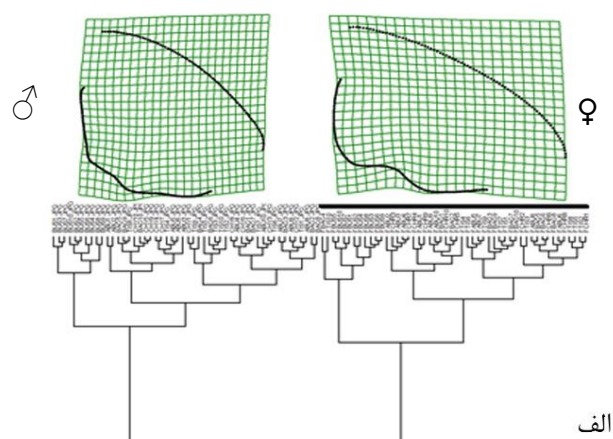
نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای تغییرات شکلی پای انبرکی دوم، به‌طور کامل و دقیق جنسیت‌ها را مجزا نمود (شکل ۳. الف). نتایج این آزمون برای پای انبرکی اول نیز تمامی ماده‌ها را در یک خوشه دسته‌بندی کرد اما دو نمونه نر از جزیره قشم را نتوانست به درستی دسته‌بندی کند و آنها را در خوشه‌ی ماده‌ها قرار داد (شکل ۳. ب). خطای دسته‌بندی در این آزمون ۱/۳ درصد بود که خوشه‌بندی بسیار موفق است. با این وجود خوشه‌بندی نمونه‌ها برای پای دمی سوم جداکنندگی پایینی نشان داد. هر چند یک خوشه منحصر از نرها تشکیل گردید (شکل ۳. Error! Reference source not found. ج). بررسی صحت دسته‌بندی انجام شده توسط تحلیل ممیزی خطی در آزمون اعتبارسنجی متقابل (Cross validation) توانست ۱۰۰ درصد نمونه‌ها برای پای انبرکی دوم، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها را برای پای انبرکی اول و ۷۳ درصد نمونه‌ها برای پای دمی سوم را در گروه درست آن دسته‌بندی کند (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حاصل از تحلیل ممیزی همراه با Cross validation

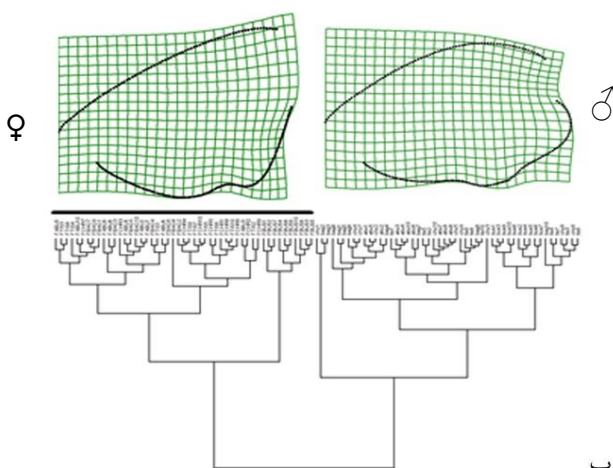
اندام مورد بررسی	Eigenvalue	Canonical correlation	Wilks Lambda	درصد گروه‌بندی صحیح جنس‌ها
پیش‌پنجه پای انبرکی اول	۱۱/۲۳	۰/۹۵۸	۰/۰۸۲	۱۰۰
پیش‌پنجه پای انبرکی دوم	۸۵/۳۶۸	۰/۹۹۴	۰/۰۱۲	۱۰۰
انشعاب خارجی پای دمی	۰/۵۳۹	۰/۵۹۲	۰/۶۵۰	۷۳

سوم

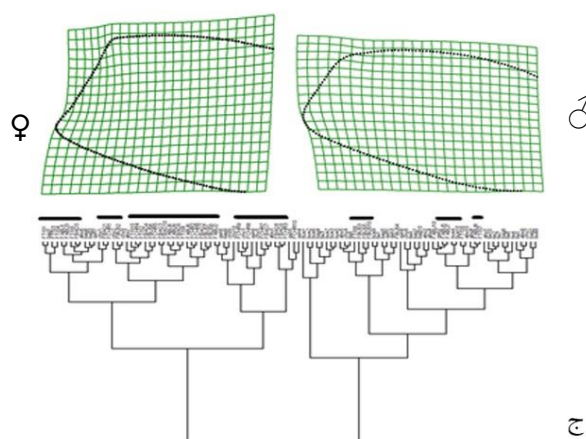
بررسی ساختاری تنوعات شکلی سه بخش آناتومیک مطالعه شده در تحقیق حاضر از طریق چهارچوب‌های رگرسیون تغییر شکلی امکان‌پذیر شد. نتایج چهارچوب‌های رگرسیونی تغییر شکلی در جنس‌های نر و ماده برای پای انبرکی اول نشان داد (شکل ۳. Error! Reference source not found. الف) پیش‌پنجه در جنس ماده نسبت طول به عرض کمتری داشته و بخش پالم (جلویی-شکمی) در افراد ماده دارای زاویه کمتری بوده و در افراد نر به شکل دایره نزدیک‌تر است. در مقابل، بخش عقبی-شکمی در افراد نر دارای تحدب کمتری است. نتایج رگرسیون چندمتغیره برای این اندام، همبستگی بالایی بین جنسیت با نیم‌لندمارک‌های ۱۷۱، ۱۷۲، ۱۷۴ و تغییرات یونیفرم در محور Y نشان داد ($R^2 > 0.56$; $p < 0.0001$). همچنین، پیش‌پنجه پای انبرکی دوم (شکل ۳. ب) در افراد ماده کشیده‌تر و در افراد نر دایره ماندتر است. بخش میانی-شکمی پیش‌پنجه پای انبرکی دوم در ماده‌ها دارای بیرون‌زدگی و در نرها فرورفته است. برای پای دوم این همبستگی با نیم‌لندمارک‌های X_{166} ، Y_{172} و Y_{173} بود ($R^2 > 0.7$; $p < 0.0001$) شکل انشعاب خارجی پای دمی سوم (شکل ۳. Error! Reference source not found. ج) در افراد نر کشیده‌تر و انتهای جلویی دارای گوشه‌های گرد شده است و به‌طور کل می‌توان شکل بیضی‌تری را به آن نسبت داد. در حالی که در افراد ماده این شکل به مستطیل نزدیک‌تر بوده و دارای گوشه‌های جلویی مشخص است. رگرسیون جنسیت با پای سوم برای نیم‌لندمارک‌های ۱۳۲، ۱۴۳ و ۱۴۵ ضریب همبستگی متوسطی را نشان داد، هرچند معنی‌داری بالایی را داشت ($R^2 > 0.18$; $p < 0.0001$).



الف



ب



ج

شکل ۳: نتایج آنالیز خوشه‌ای برای جنس نر و ماده در گونه *P. darvishi*. شکل بالای هر خوشه چهارچوب‌های تغییر شکل برای آن خوشه نسبت به میانگین شکلی را نشان می‌دهد. الف) نتایج تحلیل‌های مربوط به پای انبرکی اول. ب) نتایج تحلیل‌های مربوط به پای انبرکی دوم. ج) نتایج تحلیل‌های پای دم‌ی سوم. (تغییر شکل‌ها (و نه اندازه‌ها) دوبار بزرگ‌نمایی شده‌اند تا راحت‌تر دیده شوند. نمونه‌های ماده در دندروگرامها با خط ضخیم سیاه نشان داده شده‌اند.)

همان‌طور که در بخش مقدمه ذکر شد، جنسیت در دوجورپایان براساس تفاوت در صفات اولیه و ثانویه جنسی مشخص می‌شود؛ از جمله طول شاخک دوم (Bousfield, 1989)، حضور یا عدم حضور Calceoli در شاخک دوم (Bousfield, 1989; Sutcliffe, 1992) وجود برجستگی شکمی پنیس (Penial Papillae) در بند هفتم سینه‌ای فرد نر و یا صفحات تخمی (Oostegites) در پایه‌ی پیش‌ران‌های دوم تا پنجم در فرد ماده (Sutcliffe, 1992) و شکل و اندازه پاهای انبرکی اول و دوم (Borowsky, 1984; Conlan, 1991; Clark 1997; Wellborn, 2000). قابل اعتمادترین روش برای تعیین جنسیت در دوجورپایان به طور معمول بر اساس حضور یا عدم حضور برجستگی پنیس یا صفحات تخمی است که نیازمند تشریح دقیق نمونه و در مواردی همراه با از دست دادن سایر خصوصیات تاکسونومیک است (Iyengar & Starks, 2008). از همین روی در بیشتر موارد به سایر صفات استناد می‌شود. از آنجا که در تاکسونومی دوجورپایان به‌خصوص در تیره Hyalidae تعیین گونه بر اساس توصیفات فرد نر می‌باشد؛ تشخیص جنسیت و تعیین تغییرات شکلی وابسته به جنس به‌خصوص در بخش‌های آناتومیکی که در شناسایی مهم هستند؛ بسیار تعیین‌کننده می‌باشد. نتایج آزمون‌های MANOVA و آزمون خوشه‌ای در مطالعه حاضر نشان داد که شکل پیش‌پنجه پای انبرکی اول و دوم در گونه *P. darvishi* دارای دوریختی جنسی است و بطور کامل دو جنس از یکدیگر متفاوت هستند. نتایج مشابهی در یکی دیگر از گونه‌های این سرده، گونه *Parhyale hawaiiensis* که یک مدل در مطالعات تکوینی و ژنتیکی می‌باشد؛ به‌دست آمده که بیانگر دوریختی جنسی در شکل پاهای انبرکی اول و دوم است (Kao و همکاران، 2006). با توجه به آنکه در توصیف گونه *P. darvishi* توسط Momtazi & Maghsoudlou (2016) به تفاوت شکلی پیش‌پنجه انبرکی پای اول در فرد نر و در توصیف گونه *Parhyale piloi* توسط Myers و همکاران (۲۰۱۷) از آب‌های مجاور (شبه جزیره هند) به ساختار پیش‌پنجه انبرکی پای دوم فرد نر وزن زیادی داده شده است، باید در شناسایی و گزارش این جانور به تعیین جنسیت آن توجه دقیقی شود. همچنین، عدم دسته‌بندی دو فرد نر در ساختار پیش‌پنجه انبرکی پای دوم به احتمال زیاد با توجه به طول کل بدنی کوچک‌تر آنها بیانگر آن است که این تغییرات در طی مراحل رشدی ایجاد می‌شود و در بررسی‌های تاکسونومیک باید افراد کاملاً بالغ مورد بررسی قرار گیرند.

ارزش‌سازی دوریختی جنسی در پای انبرکی اول و دوم مورد بررسی‌های متعددی قرار گرفته است. بر اساس نحوه‌ی جفت‌گیری در دوجورپایان، شیوه جفت‌گیری در اعضای تیره Hyalidae از نوع Mate-guarding است که در آن فرد نر، فرد ماده را در برمی‌گیرد و چند مرحله آخر پوست‌اندازی را با هم طی می‌نمایند و در این مدت فرد نر برای حفظ فرد ماده با دیگر افراد نر نزاع می‌کند (Conlan, 1991). بر اساس نظریه Darwin (۱۸۷۱) ارزش عملکردی پای انبرکی دوم در فرایند جفت‌گیری دوجورپایان، نگهداری فرد ماده در طول دوره دربرگیری است. مطالعه Hume و همکاران (۲۰۰۵) ضمن رد این نظریه، معتقد است نقش پای انبرکی دوم بیشتر در تقابل نر-نر موثر است. وجود دوریختی جنسی در پاهای انبرکی اول و دوم در دوجورپایانی

که از روش Mate-guarding استفاده می‌کنند، قابل انتظارتر است از دوجورپایانی که از روش non-mate-guarding استفاده می‌کنند. در این گروه دوریختی جنسی بیشتر در شکل شاخک‌ها و چشم‌ها گزارش شده است (Tamaki و همکاران، ۲۰۱۸). در بخش دیگری از نتایج به‌دست آمده در این مطالعه در شکل پای دمی سوم دوریختی جنسی دیده می‌شود که یک یافته نو ظهور در مطالعات دوجورپایان بوده که دریچه‌ایی نوین در مطالعات تاکسونومیک دوجورپایان باز می‌کند. تا به امروز در هیچ مطالعه انجام شده در تاکسونومی دوجورپایان به دوریختی جنسی در این بخش از بدن دوجورپایان اشاره نشده بود. این موضوع با توجه به آنکه شکل پای دمی سوم و خصوصیات آن در شناسایی و تبارزایی دوجورپایان اهمیت زیادی دارد، نشان می‌دهد؛ که تعیین جنسیت فرد در مطالعات تاکسونومیک تا چه حد تعیین کننده است. این تفاوت شکلی در ساختار پای دمی سوم همچنین، در توصیف گونه *P. darvishi* (Momtazi & Maghsoudlou, 2016) مورد توجه قرار نگرفته بوده است.

نتیجه‌گیری کلی

پاهای انبرکی اول و دوم به همراه پای دمی سوم در گونه *P. darvishi* دارای دوریختی جنسی هستند. توصیف دقیق این دوریختی با توجه به اهمیت این ساختارها در تاکسونومی این گونه امکان بررسی دقیق‌تر گونه و همچنین شناسایی گونه بر اساس افراد ماده را فراهم می‌کند.

منابع

- صناعی، ا. (۱۳۹۴). بررسی تنوع بین جمعیتی سوسک سرخرطومی یونجه *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) به روش ریخت سنجی هندسی. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیوسیستماتیک جانوری. دانشگاه تهران.
- ممتازی، ف. (۱۳۹۲). تاکسونومی و بررسی تغییرات بین جمعیتی دوجورپایان بین جزر و مدی سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان. رساله دکترا در رشته بیوسیستماتیک جانوری. دانشگاه تهران.
- Arlot, S. and Celisse, A. (2010). A survey of cross-validation procedures for model selection. *Statistics Surveys*. 4: 40–79.
- BagherianYazdi, A., Münch, W. and Seifert, B. (2012). A first demonstration of interspecific hybridization in *Myrmica* ants by geometric morphometrics (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*. 17. 121-131.
- BagherianYazdi, A. (2014). Application of geometric morphometrics to analyze allometry in two species of the genus *Myrmica* (Hymenoptera: Formicidae). *Soil Organisms*. 86(1):77-84.
- Barnard, J. L. (1971). Keys to the Hawaiian marine Gammaridea, 0-30 meters. *Smithson. Contrib. Zool*. 58:1-135.
- Barnard, J. L. (1975). Identification of gammaridean amphipods. In RI Smith, JT Carlton, eds. *Light's manual: intertidal invertebrates of central California coast*, 3rd ed. London: Univ. of California Press, pp. 313-376.
- Bookstein, F. L., Streissguth, A. P., Sampson P. D., Connor P.D. and Barr, H. M. (2002). Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. *NeuroImage* 15: 233–251.

- Borowsky, B. (1984). The use of the males' gnathopods during precopulation in some gammaridean amphipods. *Crustaceana*. 47:245-250.
- Bousfield, E. L. (1989). Revised morphological relationships within the amphipod genera *Pontoporeia* and *Gammaracanthus* and the "Glacial relict" significance of their post glacial distributions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46: 1714-1725.
- Clark, R. A. (1997). Dimorphic males display alternative reproductive strategies in the marine amphipod *Jassa marmorata* Holmes (Corophioidae: Ischyroceridae). *Ethology*. 103: 531-553.
- Conlan, K. E. (1991). Precopulatory mating behavior and sexual dimorphism in the amphipod Crustacea. *Hydrobiologia*, 223, 255-282.
- Curatolo, T., Calvaruso, C., Galil, B. and Lo Brutto, S. (2013). Geometric morphometry supports a taxonomic revision of the Mediterranean *Bathyporeia guilliamsoniana* (Spence Bate, 1857) (Amphipoda, Bathyporeiidae). *Crustaceana*. 86. 820-828.
- Darwin, C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray, London, 960Pp
- Grosse, D. J., Pauley, G. B. and Moran, D. (1986). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) Amphipods. United states Fish and Wildlife Service Biological Report, 82, 11-69.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Hartnoll, R.G. (1982). Growth. In: Bliss, D. E. eds. *The biology of Crustacea: embriology, morphology and genetics*. New York, Academic. p. 11-196.
- Hay, M. E., Fenical, W. and Gustafson, K. (1987). Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents? *Ecology*. 68(6), 1567- 1580.
- Horton, T., Lowry, J., De Broyer, C., Bellan-Santini, D., Coleman, C.O., Corbari, L., Costello, M.J., Daneliya, M., Dauvin, J.-C., Fišer, C., Gasca, R., Grabowski, M., Guerra-García, J.M., Hendrycks, E., Hughes, L., Jaume, D., Jazdzewski, K., Kim, Y.-H., King, R., Krapp-Schickel, T., LeCroy, S., Lörz, A.-N., Mamos, T., Senna, A.R., Serejo, C., Sket, B., Souza-Filho, J.F., Tandberg, A.H., Thomas, J.D., Thurston, M., Vader, W., Väinölä, R., Vonk, R., White, K. and Zeidler, W. (2019). World Amphipoda Database. Parhyale (Stebbing, 1897). Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=101549> on 2019-05-14
- Hume, K., Elwood, R., Dick, J. and Morrison, Jenny. (2005). Sexual dimorphism in amphipods: The role of male posterior gnathopods revealed in *Gammarus pulex*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 58. 264-269.
- Iyengar, V. and Starks, B. (2008). Sexual selection in harems: Male competition plays a larger role than female choice in an amphipod. *Behavioral Ecology*. 19. 642-649.
- Kao D., Lai A. G., Stamataki, E., Rosic, S., Konstantinides, N., Jarvis, E., Donfrancesco, A. D., Pouchkina-Stancheva, N., Sémon, M., Grillo, M., Bruce, H., Kumar, S., Siwanowicz, I., Le, A., Lemire, A., Eisen, M. B., Extavour, C., Browne, W. E., Wolff, C., Averof, M., Patel, N. H., Sarkies, P., Pavlopoulos, A. and Aboobaker A. (2006). The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. *eLIFE*. 5. 10.7554/eLife.20062.
- Momtazi, F., Maghsoudlou, A. (2016). *Parhyale darvishi*, a new widely distributed amphipod species, in the Persian Gulf and the Gulf of Oman (Crustacea, Amphipoda, Hyalidae). *Zootaxa*. 4132(3): 364-372.

- Myers, A. A., Trivedi, J. N., Gosavi, S., & Vachhrajani, K. D. (2017). A new species of genus *Parhyale* Stebbing, 1897 (Crustacea, Amphipoda, Hyalidae) from Gujarat State, India. *Zootaxa*, 4294(5), 593-599.
- Moore, P.G. and Wong, Y.M. 1996. Observations on the life history of *Orchomene nanus* (Kryer) (Amphipoda: Lysianassoidea) at Millport, Scotland as deduced from baited trapping. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 195: 53-70.
- Olasso, I. (1999). The pelagic fish food web. *Ber Polarforsch (Bremerhaven)* 301, 110-118.
- Rehm, E. J., Hannibal, R. L., Chaw, R. C., Vargas-Vila, M. A. and Patel, N. H. (2009). The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: a new model for arthropod development. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009 (1).
- Riedlecker, E., Ashton, G. and Ruiz, G. (2009). Geometric morphometric analysis discriminates native and non-native species of Caprellidae in western North America. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 89(3), 535-542.
- Rohlf, F. J. (2003): tpsSmall: Calculation of shape variation, Version 1.20. – Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook [<http://life.bio.sunysb.edu/morph>].
- Rohlf, F. J. (2009): tpsRegr: shape regression, version 1.37. – Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York [<http://life.bio.sunysb.edu/morph>].
- Rohlf, F.J., (2010a): tpsDig-Thin Plate Spline Digitizer Version 2.16. – Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York [[http:// life.bio.sunysb.edu/morph](http://life.bio.sunysb.edu/morph)].
- Rohlf, F. J. (2010b): tpsRelw: Relative warps analysis, version 1.49. – Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York [[http:// life.bio.sunysb.edu/morph](http://life.bio.sunysb.edu/morph)].
- Seifert, B., BagherianYazdi, A. and Schultz, R. (2014). *Myrmica martini* sp. n. - a cryptic species of the *Myrmica scabrinodis* species complex (Hymenoptera: Formicidae) revealed by geometric morphometrics and nest-centroid clustering. *Myrmecological News*. 19:171-183.
- Sheets, H. D., Kim, K. and Mitchell C.E. (2004). A combined landmark and outline-based approach to ontogenetic shape change in the Ordovician Trilobite *Triarthrus becki*. *Applications of Morphometrics in Paleontology and Biology*. Springer, New York: 67–81.
- Sutcliffe, D. W. (1992). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) basic processes. *Freshwater Forum* 2: 102-128.
- Tamaki, A., Kagesawa, T., Takeuchi, S., and Sassa, S. (2018). Sexual dimorphism in the gammaridean amphipod, *Urothoe carda* Imbach, 1967, from an intertidal sandflat in southern Japan. *Acta Zoologica*. 1–6
- Tsoi, K. H. and Chu, K. H. (2005). Sexual dimorphism and reproduction of the amphipod *Hyale crassicornis* Haswell (Gammaridea: Hyalidae). *Zoological Studies*, 44(3), 382.
- Wellborn, G. A. (2000). *Selection on a sexually dimorphic trait in ecotypes within the Hyalella azteca species complex (Amphipoda: Hyalellidae)*. *American Midland Naturalist* 143: 212-225.
- Yu, H. and Yang, J. (2001). A direct LDA algorithm for high-dimensional data with application to face recognition. *Pattern Recognition*. 34 (10): 2067–2069.

Sexual dimorphism of gnathopods 1 and 2 and uropod 3' shapes in *Parhyale darvishi* (Momtazi and Maghsoudlou, 2016) based on geometric morphometric methods

Y. Layeghi¹, A. Bagherian Yazdi^{2*}, F. Momtazi³

Received: 2019.7.9

Accepted: 2019.12.7

Abstract

Sexual dimorphism of gnathopods 1 and 2 and uropod 3' shapes in *Parhyale darvishi* (Momtazi and Maghsoudlou, 2016) were investigated by geometric morphometrics. A total 50 males and 50 females were experimented. Anatomical aspects of gnathopods and uropods were photographed and cartesian coordinate (semilandmarks of organs' margin) aligned by semilandmark sliding based on minimum bending energy. Statistical significance of sexual dimorphism was tested by multivariate analysis of variances; linear discriminant analysis and clustering analysis (ward method). Multivariate regression analysis based on partial warps and uniform components was used to depicting shape variations related to sex in studied anatomical parts in the form of deformation frames. The results show all three anatomical parts was significantly different shape in male and females ($F > 17.15$, $p < 0.0001$). The deformation regression frameworks of first gnathopod show that the ratio of length to width in females are less than males. The second gnathopod has an oval shape in females instead of circular form in males. The shape of third uropod in males is more extended and bearing subacute angles. Based on present studies, the accurate description of sexual dimorphism specially in taxonomic characters provide ability for identification based on females and detail study of species .

Keywords: Sexual dimorphism, *Parhyale darvishi*, Hyalidae, Semilandmark, Geometric morphometrics.

1- Graduate student, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran

*(Corresponding Author: alibagherianyazdi@gmail.com · a.bagherian@gu.ac.ir)

3- Assistant Professor, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

ترسیب کربن با کربنیک آنهیدراز نوترکیب در باکتری *Ralstonia eutropha*

محدثه محسن پور^۱، نور امیرمظفری^{۲*}، زهرا نورمحمدی^۳، شیوا ایرانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

انتشار گازهای گلخانه‌ای و پلاستیک‌ها از مهمترین معضلات زیست محیطی هستند. هدف، بررسی باکتری *Ralstonia eutropha* به عنوان میزبان آنزیم کربنیک آنهیدراز برای تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) است. توالی ژن آنزیم کربنیک آنهیدراز (CA) در وکتور بیانی کلون سازی و به *R. eutropha* منتقل شد. تولید PHB در باکتری‌ها با روش‌های FT-IR و GC-MS بررسی شد. میزان PHB در باکتری نوترکیب در حضور CO₂ نسبت به باکتری نوترکیب در غیاب CO₂، ۳۱/۴۹ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در حضور و عدم حضور CO₂ به ترتیب ۱۸/۴۴ و ۳۴/۴۴ درصد افزایش داشت. تولید PHB در باکتری نوترکیب در محیط محدود در حضور CO₂ نسبت به باکتری نوترکیب در غیاب CO₂، ۲۶/۵۷ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در حضور و عدم حضور CO₂ به ترتیب ۱۸/۳۰ و ۳۰/۶۳ درصد افزایش داشت. نتایج سنجش PHB نشان دهنده مؤثر بودن بیان CA در افزایش PHB در *R. eutropha* بود. همچنین باکتری حاصل می‌تواند در حضور CO₂ در یک محیط ساده، علاوه بر ترسیب کربن، PHB نیز تولید نماید.

واژه‌های کلیدی: ترسیب کربن، کربنیک آنهیدراز، *Ralstonia eutropha*.

مقدمه

کربن دی اکسید (CO₂)، کربنیک اسید (H₂CO₃) و بی‌کربنات (HCO₃⁻) از متابولیت‌های کلیدی سیستم‌های زنده محسوب می‌شوند. تعادل این متابولیت‌ها در سلول‌های زنده برای عملکرد فیزیولوژیکی سلول حائز اهمیت است. آنزیم کربنیک آنهیدراز (CA) با تبدیل کربن دی‌اکسید به بی‌کربنات در متابولیسم سلول، انتقال CO₂، تبادل یون‌ها و تنظیم pH درون سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند. شش گروه از آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز (α، β، γ، δ، ε، ζ، η) در جانداران مختلف شناسایی شده‌اند. هیچ

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول: amirmozafari@iums.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شباهت ساختاری قابل توجهی بین گروه‌های مختلف CA وجود ندارد و هر گروه به طور جداگانه و متنوع تکامل یافته‌اند. مهم‌ترین گروه‌های آنزیم CA از نظر ساختار و عملکرد، آنزیم‌های گروه α -CA (تک زیرواحدی و با آیزوایم‌های چندگانه و بیان متنوع)، آنزیم‌های گروه β -CA (حاوی دو تا شش زیرواحد متفاوت) و آنزیم‌های گروه γ -CA (دارای سه زیرواحد یکسان) هستند (Zhang et al., 2011 و Jo, 2016 و Bose & Satyanarayana, 2017).

باکتری *R. eutropha* متعلق به رده β -proteobacteria، باسیل گرم منفی، غیر بیماری‌زا، خاک‌زی، بدون اسپور، مزوفیل (دمای بهینه $28-30^{\circ}\text{C}$) با متابولیسم کمولیتواتوتروفی اختیاری (Facultative chemolithotroph) و به عنوان میکروارگانیزم مدل تولید کننده پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها (Poly Hydroxy Alkanates) (PHAs) به صورت گرانول‌های ذخیره‌ای درون سلولی است. اندازه ژنوم این باکتری ۷۴۱۶۶۷۸ bp و دارای دو کروموزوم و یک مگاپلاسمید (pHG1) به ترتیب با اندازه‌های ۴۰۵۲۰۳۲ bp، ۲۹۱۲۴۹۰ bp و ۴۵۲۱۵۶ bp است. کاربرد PHA به عنوان بیوپلاستیک‌های تجزیه‌پذیر، قابلیت بالای *R. eutropha* برای تولید تجاری انواع بیوپلیمرها و سازگاری با طیف متنوعی از سوبستراها در شرایط متابولیسمی مختلف باعث جذابیت فوق‌العاده این باکتری در تحقیقات زیست‌فناوری شده است. مهم‌ترین نوع PHA، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) است که تولید آن از طریق اپران *phaCAB* صورت می‌گیرد. به این ترتیب که ابتدا دو مولکول استیل CoA توسط آنزیم β - کتوتیولازی که توسط *phaA* رمزدهی می‌شود، به استواستیل CoA تبدیل می‌شود. سپس استواستیل CoA توسط استواستیل CoA ردوکتاز رمز شونده توسط *phaB* (*phaB1*, *phaB2*, *phaB3*) به هیدروکسی بوتیریل CoA احیا می‌شود و سرانجام پلی هیدروکسی بوتیرات در نتیجه پلیمریزه شدن هیدروکسی بوتیریل CoA توسط آنزیم PHB سنتاز کد شونده توسط ژن *phaC1* حاصل می‌شود. باکتری *R. eutropha* می‌تواند از طریق چرخه CBB (Benson Basham Calvin) طی رشد اتوتروفی CO_2 را جذب و از آن برای تولید PHB استفاده کند (Juengert et al., 2018 و Raberg et al., 2017).

انتشار روزافزون CO_2 ناشی از فعالیت‌های شهرنشینی انسانی و صنعتی و ادامه روند استفاده بیش از حد از سوخت‌های فسیلی برای تولید پلاستیک‌های مشتق شده از مواد نفتی، منجر به افزایش گرمایش جهانی و تهدیدات زیست محیطی ناشی از تغییرات آب و هوایی (اثر گلخانه‌ای) خواهد شد. یکی از مهمترین راهکارهای مدیریت کاهش کربن، تجمع کربن با روش ترسیب کردن است. تجمع و ذخیره کربن در سیستم‌های زیستی منجر به کاهش و تعدیل کربن دی اکسید اتمسفر می‌شود. تحقیقات انجام شده در این زمینه بیشتر روی ترسیب کربن با استفاده از گیاهان متمرکز بوده است و استفاده از میکروارگانیزم‌ها به منظور ترسیب کربن و تولید PHA نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (Kumar et al., 2018). مطالعه در زمینه ارایه راهکار برای جذب و ترسیب کربن در جهت تولید محصولات با ارزشی مثل بیوپلیمرهای تجزیه پذیر توسط چرخه‌های بیولوژیکی باکتری،

هدف از این پژوهش بوده که می تواند در کاهش انتشار CO₂ و از سوی دیگر تولید بیوپلاستیک تجزیه پذیر سازگار با محیط زیست، موثر باشد.

مواد و روش ها

کلون سازی ژن CA در وکتور بیانی

در این پژوهش از توالی ژن کربنیک آنهیدراز (CA) مربوط به باکتری *Caminibacter mediatlanticus* استفاده شد. این توالی در پژوهش قبلی توسط نویسندگان و همکاران بهینه سازی کدونی شده و با تغییر اسیدهای آمینه (جهت مقاومت بیشتر و فعالیت کاتالیزوری بهتر) و قرار دادن جایگاه های آنزیمی برشی مناسب در دو سوی این ژن (به منظور الحاق در وکتورهای مورد نظر)، مهندسی و سنتز شده بود (Mohsenpour et al., 2019). برای بیان ژن CA، به منظور افزودن پیشبر و پایانبر به دو سوی این ژن، وکتور بیانی pBI121 مورد استفاده قرار گرفت تا با توجه به جایگاه های آنزیمی *BamHI* و *SacI* تعبیه شده در دو انتهای ژن CA، این قطعه در وکتور تحت پیشبر دائمی *CaMV35S* و پایانبر *nos* قرار گیرد (Mohsenpour et al., 2015). به این منظور واکنش هضم آنزیمی دوگانه وکتور بیانی pBI121 با آنزیم های *BamHI* و *SacI* انجام شد و پس از الکتروپورز (مدل: EH1515، ساخت ایران) روی ژل آگارز یک درصد، باند مربوط به وکتور هضم شده pBI121 از روی ژل آگارز برش و با استفاده از کیت خالص سازی DNA از روی ژل (شرکت Bioneer) خالص سازی شد. سپس واکنش اتصال (Ligation) با نسبت سه به یک قطعه الحاقی و وکتور صورت پذیرفت.

تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک کانامایسین برای باکتری *R. eutropha* نو ترکیب

با توجه به نشانگر انتخابی (ژن مقاومت به کانامایسین) موجود در وکتور pBI121، حساسیت باکتری (PTCC: 1615) *R. eutropha* H16 به غلظت های مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا یک کلونی از باکتری *R. eutropha* در محیط کشت MHB (Muller-Hinton Broth) تلقیح و در دمای ۳۰ °C ۳۰ گرمگذاری شد تا به کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند (CFU- Colony Forming Units) $10^8 \times 1/5$ رسید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله های حاوی محیط کشت MHB استریل حاوی مقادیر مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین (50 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1} ، 200 mg.L^{-1} ، 250 mg.L^{-1} ، 300 mg.L^{-1}) منتقل شد. یک لوله حاوی محیط کشت MHB استریل به عنوان کنترل منفی و یک لوله حاوی محیط کشت MHB فاقد آنتی بیوتیک و تلقیح شده با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین از هر کدام از لوله ها در پلیت قسمت بندی شده حاوی محیط کشت Muller-Hinton Agar (MHA)، کشت خطی انجام شد. علاوه بر این ۱۰۰ میکرولیتر از لوله حاوی باکتری *R. eutropha*، با کدورت نیم مک فارلند به محیط های کشت

جامد LB agar حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک تلقیح و پخش شد. پس از یک شب گرماگذاری در دمای 30°C حساسیت باکتری نسبت به غلظت‌های مختلف کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه سازی برای تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha*

با توجه به این که روش‌های معمول آماده‌سازی باکتری‌ها برای انتقال ژن، در مورد باکتری *R. eutropha* مؤثر نبود، بنابراین به منظور دستیابی به یک روش مناسب برای انتقال وکتور پلاسمیدی به این باکتری، بهینه‌سازی روش تهیه باکتری مستعد (Competent Cells) با تغییر متغیرهای غلظت CaCl_2 و OD رشد باکتری انجام شد. به این ترتیب که ابتدا یک کلونی از باکتری *R. eutropha* به پنج میلی لیتر محیط کشت LB broth منتقل و پس از یک شب گرماگذاری در انکوباتور شیکردار با دمای 30°C و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه، در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استریل LB broth رقیق‌سازی شد و مجدداً در انکوباتور شیکردار با دمای 30°C و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در طول مراحل رشد، OD باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در OD های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ از کشت مایع باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ g، پنج دقیقه) رسوب داده شد. سپس محلول رویی در شرایط سترون زیر هود، کاملاً خالی شد و در سه تکرار، یک میلی لیتر محلول سرد CaCl_2 (سترون اتوکلاو شده) با غلظت‌های ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار به رسوب باکتری اضافه و به آرامی با باکتری سوسپانسیون شد (در این مرحله لوله حاوی باکتری‌ها روی یخ قرار داشتند). سپس سوسپانسیون باکتری با مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌ها توزیع شد.

انتقال پلاسمید pBI121-CA به باکتری *R. eutropha*

ابتدا یک میکروگرم پلاسمید به باکتری آماده سازی شده در مرحله قبل، اضافه شد و پس از پیپت کردن، به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در فریزر -20°C و سپس در بن‌ماری 37°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس به هر کدام از نمونه‌ها یک میلی لیتر محیط LB broth استریل (که به مدت ۲۰ دقیقه در 30°C قرار داده شده بود) اضافه و در انکوباتور شیکردار 30°C با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت سه ساعت قرار داده شد. پس از اسپین کردن میکروتیوب‌ها، مایع رویی دور ریخته شد و به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط LB broth استریل اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به آرامی پیپت شد و به پلیت‌های حاوی محیط کشت LB agar حاوی 100 mg.L^{-1} آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل و پخش شد (Sambrook, & Rusell, 2001 و Mohsenpour et al., 2008). پلیت‌ها در انکوباتور 30°C قرار داده شدند و پس از دو شب گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های به دست آمده با روش Colony PCR (مدل دستگاه ترموسایکلر: TC-312 ساخت انگلستان) به منظور تأیید حضور pBI121-CA در باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن CA، مورد بررسی قرار گرفتند

(جدول ۲). تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۷۷ bp مورد انتظار بود. در واکنش کنترل مثبت از پلاسمید pBI121-CA و در واکنش کنترل منفی PCR از کلونی باکتری *R. eutropha* غیر نوترکیب به عنوان DNA الگو استفاده شد.

کشت و آماده‌سازی *R. eutropha* نوترکیب برای سنجش PHB

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *R. eutropha* با کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به غلظت‌های محیط کشت LB broth (LB، نیم LB) در دو گروه شاهد و نوترکیب با سه تکرار تلقیح شد. یک گروه از باکتری‌های شاهد و نوترکیب در دمای ۳۰ °C و گروه دیگر در ۳۰ °C همراه با پنج درصد گاز CO₂ به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. پس از سانتریفیوژ (g ۵۰۰۰، ۱۵ دقیقه) و خالی کردن مایع رویی، رسوب باکتری‌ها دو بار با آب مقطر شستشو و در ۵۰ °C به مدت ۷۲ ساعت خشک شد. در مرحله بعد تولید PHB در نمونه‌ها توسط کروماتوگرافی گازی (GC-MS) و FT-IR مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش PHB با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC-MS)

به ۱۰ میلی‌گرم از رسوب خشک باکتری‌ها، دو میلی لیتر متانول اسیدی (۹۷ درصد متانول و سه درصد اسید سولفوریک) و دو میلی لیتر کلروفرم در لوله‌های شیشه‌ای کیماکس در پیچ‌دار (150 mm × 20 mm screw-cap Kimax tubes) اضافه و پس از محکم بستن درب لوله‌ها، محتویات آن‌ها به شدت مخلوط شد. لوله‌ها به مدت سه ساعت در حمام آب گرم ۹۵ °C و پنج دقیقه روی یخ قرار داده شدند. پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه، لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه به شدت مخلوط شدند (Juengert et al., 2018). بعد از یک دقیقه، سه فاز در لوله‌ها قابل مشاهده بود که فاز بالایی حاوی متانول اسیدی، فاز میانی شامل بقایای میکروبی و فاز پایینی، فاز آلی حاوی بیوپلیمر محلول در کلروفرم بود که یک میکرولیتر از فاز پایینی برای تزریق در دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل B۷۸۹۰، شرکت Agilent آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات ستون و عملکرد دستگاه عبارت بود از: ستون موئین HP-5MS (بیست و پنج صدم میلی متر قطر داخلی، طول ۳۰ متر)، دمای حسگر: ۲۸۰ درجه سلسیوس؛ دمای تزریق: ۲۳۰ درجه سلسیوس؛ دمای اولیه: ۸۰ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، سرعت افزایش دما: هشت درجه در دقیقه و بالاترین دما: ۱۶۰ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه. همچنین ۱۰ میلی گرم از پودر PHB استاندارد با روش فوق آماده سازی و سنجش شد.

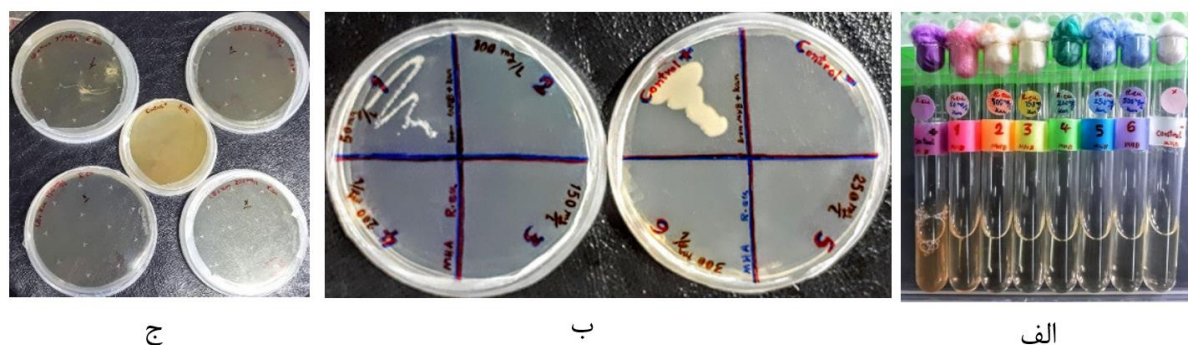
سنجش PHB با استفاده از FT-IR (Fourier-Transform Infrared spectroscopy)

به منظور ارزیابی محتوای بیوشیمیایی بیوپلیمر و گروه‌های عاملی متفاوت موجود در آن‌ها، طیف چند نمونه از بیوپلیمرهای استخراج شده با روش بالا از باکتری‌های شاهد و نوترکیب رشد یافته در محیط عادی و محیط حاوی CO₂، پس از تبخیر کلروفرم، خشک شدن کامل بیوپلیمر و مخلوط کردن حدود یک میلی گرم از آن با ۳۰۰ میلی‌گرم برمید پتاسیم و تهیه قرص در دستگاه پرس با استفاده از FT-IR (Spectrum65 PerkinElmer، ساخت آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت (Hassan

(et al., 2016). سپس با استفاده از کتابخانه موجود در نرم افزار IRPal نسخه 2010- V2.0 داده پردازی اطلاعات و شناسایی طیف‌های جذبی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج کشت خطی و مقایسه آن با کنترل مثبت برای تعیین میزان تحمل آنتی‌بیوتیک کانامایسین توسط باکتری *R. eutropha*، رشد محدود باکتری در غلظت 50 mg.L^{-1} کانامایسین را نشان داد ولی در سایر غلظت‌ها رشد باکتری کاملاً مهار شده بود (شکل ۱، الف) که این نتیجه با کشت خطی در پلیت‌های حاوی محیط کشت MHA و عدم رشد باکتری از غلظت 100 mg.L^{-1} تأیید شد (شکل ۱، ب). همچنین نتایج رشد باکتری در محیط‌های کشت LB حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین، عدم رشد باکتری از غلظت 100 mg.L^{-1} کانامایسین و حساسیت باکتری به کانامایسین را در این غلظت تأیید نمود (شکل ۱-ج). در بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha*، تعداد کلونی‌های نو ترکیب به‌دست آمده در محیط کشت انتخابی LB حاوی 100 mg.L^{-1} کانامایسین که در $\text{OD}_{600\text{nm}}$ برابر $0/8$ و غلظت 20 میلی مولار CaCl_2 آماده سازی شده بودند، بیشتر بود (جدول ۱).



شکل ۱: الف) بررسی حساسیت باکتری *R. eutropha* به غلظت‌های کانامایسین: کنترل مثبت، محیط کشت LB broth حاوی غلظت‌های 50 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1} ، 200 mg.L^{-1} ، 250 mg.L^{-1} ، 300 mg.L^{-1} کانامایسین و کنترل منفی (به ترتیب از چپ به راست). ب) کشت خطی از لوله‌های محیط کشت MHB حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین تلقیح شده با باکتری *R. eutropha* روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MHA و مشاهده رشد فقط در نمونه کشت داده شده از لوله شماره یک (غلظت 50 mg.L^{-1}) و کنترل مثبت. ج) کشت باکتری *R. eutropha* در محیط‌های کشت LB agar حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین (75 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1} و 200 mg.L^{-1}) و کشت باکتری در محیط LB agar فاقد آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت (پلیت میانی) و مشاهده رشد باکتری فقط در کنترل مثبت.

جدول ۱: اثر غلظت CaCl_2 و OD رشد باکتری در کارایی انتقال ژن به باکتری *R. eutropha*

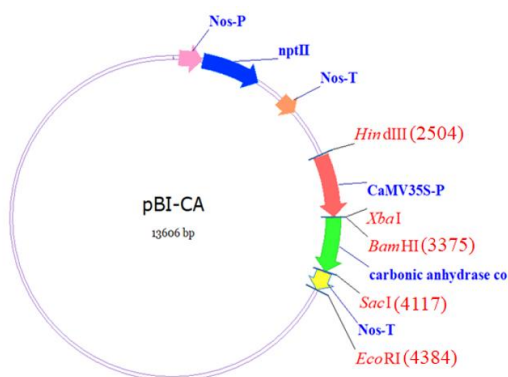
	Variable agents											
	0.2			0.4			0.6			0.8		
OD	0.2			0.4			0.6			0.8		
Vector (pBI121)	1 μg			1 μg			1 μg			1 μg		
Heat shock	37 °C, 10'			37 °C, 10'			37 °C, 10'			37 °C, 10'		
Time	72 h			72 h			72 h			48 h		
CaCl_2 (mM)	20	50	100	20	50	100	20	50	100	20	50	100
Number of colonies	-	-	-	-	-	-	2	1	-	13*	5	3

* تعداد کلونی‌های نوترکیب در OD برابر هشت دهم و غلظت CaCl_2 ۲۰ mM بیشتر بود.

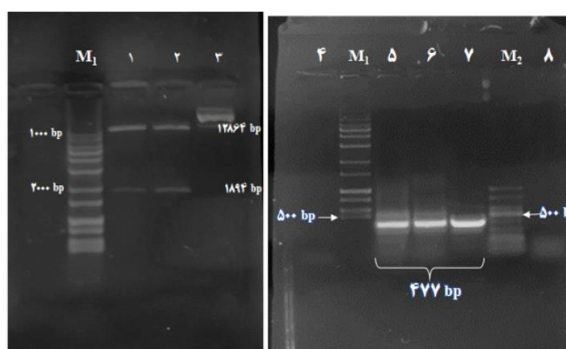
صحت کلون‌سازی ژن CA در وکتور بیانی و انتقال آن به باکتری‌های مستعد *R. eutropha*، با استفاده از Colony PCR و تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۷۷ bp و مقایسه با کنترل مثبت و منفی پس از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از نشانگر اندازه وزن مولکولی (High range DNA Ladder (Jina Bioscience تأیید شد (شکل ۲).

جدول ۲: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه داخلی ژن CA

Primers	Sequence	PCR product
CA-F	CCAGAGCCCCGATTGATATTAGC	477 bp
CA-R	TTCAGCACAAACCAACGCAC	



ج

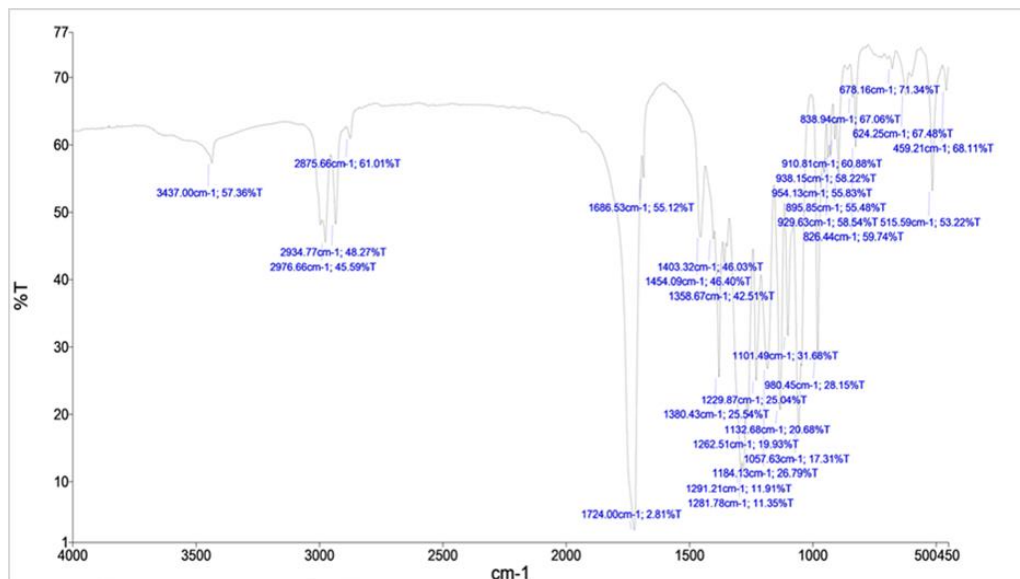


ب

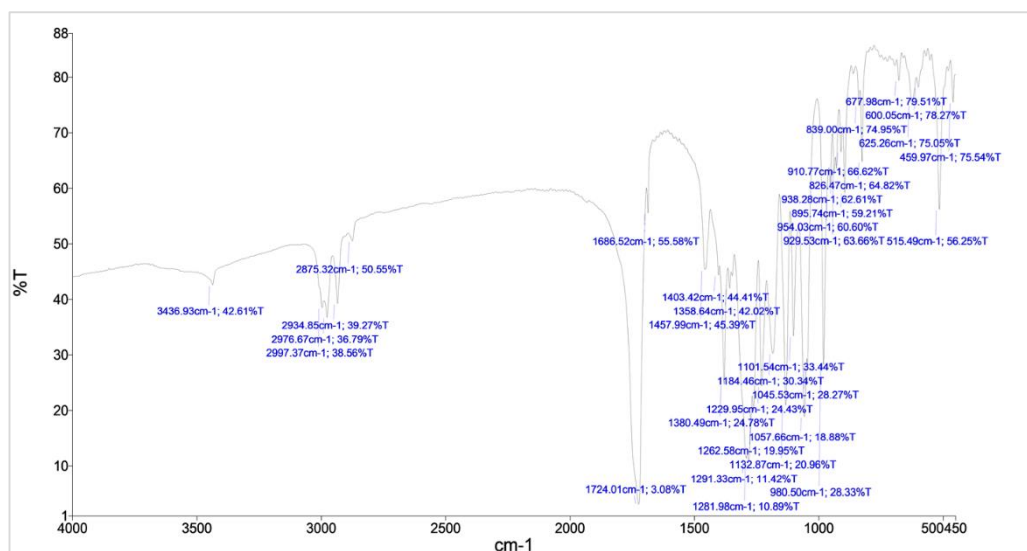
الف

شکل ۲: الف) الکتروفورز ژل آگارز یک درصد، M1: نشانگر اندازه وزن مولکولی High Range DNA Ladder، M2: نشانگر اندازه وزن مولکولی Low Range DNA Ladder، ۱ و ۲: هضم وکتور PBI121 با آنزیم‌های *BamHI* و *SacI*، ۳: پلاسمید *uncut*، ۴: کنترل منفی PCR (بدون DNA الگو)، ۵ و ۶ و ۷: باند ۴۷۷ bp حاصل از Colony PCR با پرایمرهای ژن CA و کلونی باکتری *R. eutropha* به عنوان الگو، ۸: کنترل منفی (Colony PCR) با باکتری غیرنوترکیب *R. eutropha* به عنوان شاهد. ب) نقشه وکتور بیانی نوترکیب pBI121-CA با طول ۱۳۶۰۶ bp.

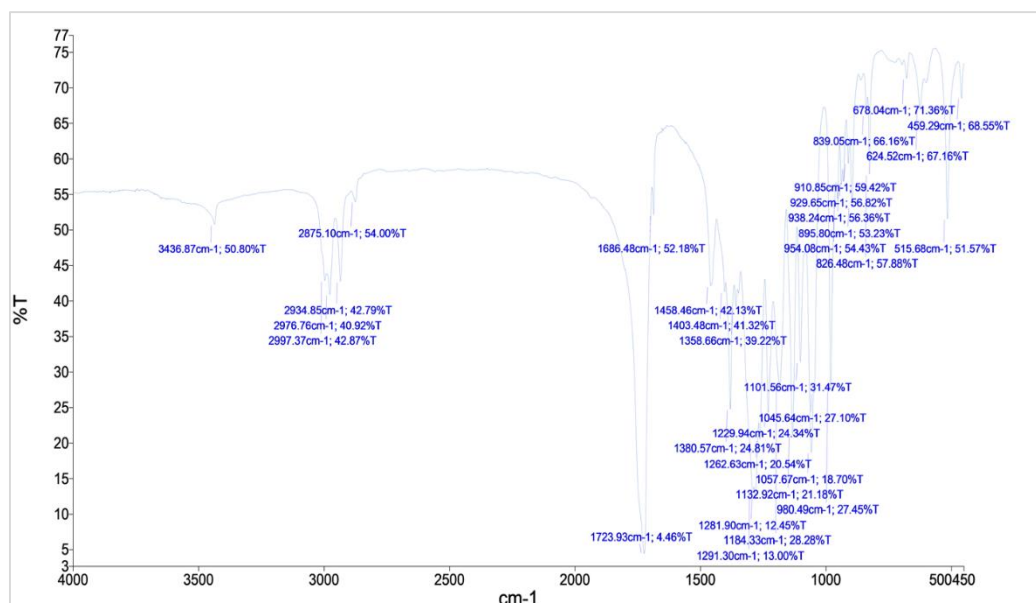
گروه‌های عاملی مهم تشکیل دهنده ساختمان PHB (C=O, -CH, -CH₂, -CH₃, -OH, -C-O و ...) بر اساس طیف جذبی حاصل از FT-IR در جدول شماره ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج FT-IR با بررسی پیک‌ها با استفاده از کتابخانه نرم افزار IRPal و مقایسه طیف بیوپلیمر استخراج شده با طیف PHB استاندارد، نشان دهنده تطابق بیوپلیمر استخراج شده با PHB بود (جدول ۳، شکل‌های ۳ و ۴ و ۵).



شکل ۳: نتایج FT-IR مربوط به PHB استاندارد



شکل ۴: نتایج FT-IR مربوط به بیوپلیمر استخراج شده از *R. eutropha* ی نو ترکیب



شکل ۵: نتایج FT-IR مربوط به بیوپلیمر استخراج شده از *R. eutropha* ی غیر نوترکیب

جدول ۳: ساختار PHB و طیف FT-IR مربوط به PHB استخراج شده از *R. eutropha*

Wave number (cm ⁻¹)	Type of bond	PHB structure
1050-1096-1128-1180	C-O	
1128-1163-1278-1289-1259-1302	C-O-C	
1378-1449	CH ₃	
1458	CH ₂	
*1723-1724-1727-1740-3436	C=O	
2875	CH ₂ -CH, CH-CH ₃	
2933	CH ₂ asymmetric stretch	
2967-2974-2983-2995-3009	CH ₃ asymmetric stretch	

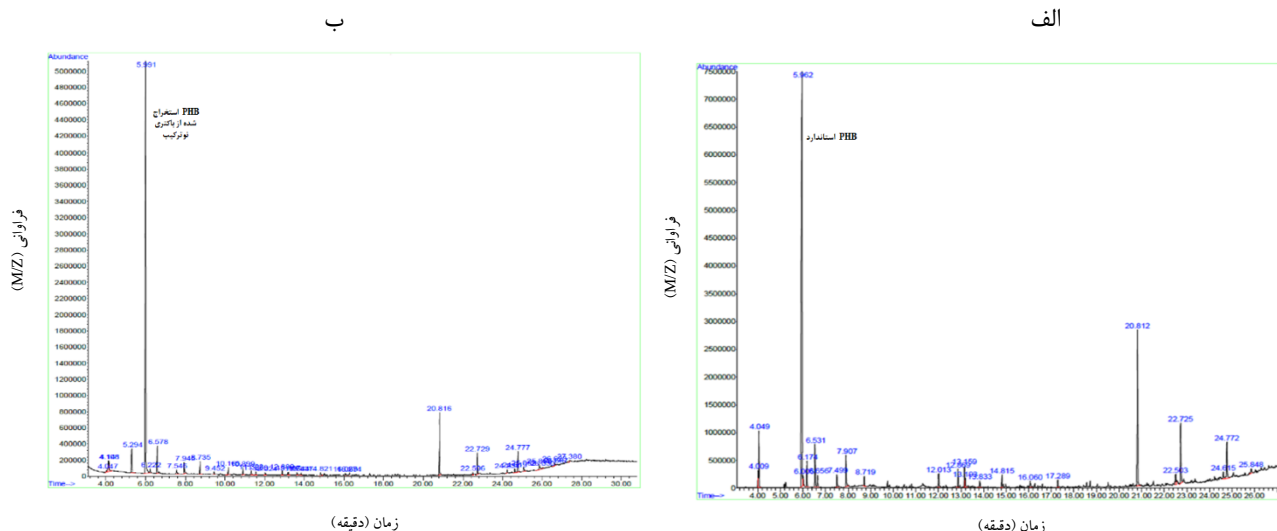
* پیک در محدوده ۱۷۲۰ تا ۱۷۳۰ cm⁻¹ مربوط به گروه کربنیل و پیک شاخص شناسایی PHB است.

نتایج GC-MS برای بررسی درصد PHB تولید شده در میزان مساوی از باکتری‌های آماده‌سازی شده (CDW=۱۰ mg)

با مشاهده پیک PHB در دقیقه ۵/۹ (شکل ۶)، بیشترین درصد PHB تولید شده را در *R. eutropha* نوترکیب حاوی ژن *CA* رشد یافته در محیط‌های کشت LB و نیم LB در حضور CO₂ نشان داد. میزان تولید PHB در باکتری نوترکیب رشد یافته در محیط کشت LB و انکوباتور CO₂ دار نسبت به باکتری نوترکیب در انکوباتور معمولی، ۳۱/۴۹ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در انکوباتور CO₂ دار و معمولی به ترتیب ۱۸/۴۴ درصد و ۳۴/۴۴ درصد افزایش نشان داد. میزان تولید PHB در باکتری نوترکیب رشد یافته در محیط کشت نیم LB و انکوباتور CO₂ دار نسبت به باکتری نوترکیب در انکوباتور معمولی، ۲۶/۵۷ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در انکوباتور CO₂ دار و معمولی به ترتیب ۱۸/۳۰ درصد و ۳۰/۶۳ درصد افزایش نشان داد. (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج سنجش PHB تولید شده در باکتری‌های شاهد و نو ترکیب رشد یافته در محیط معمولی و حاوی CO₂ با روش

GC-MS				
PHB percent				
Medium	0.5 LB	0.5 LB	LB	LB
Incubator	-	CO ₂	-	CO ₂
<i>R. eutropha</i>	26.03	38.36	25.1	41.1
Recombinant <i>R. eutropha</i>	30.09	56.66	28.05	59.54



شکل ۶: قسمتی از نتایج GC-MS. مشاهده پیک مربوط به PHB در دقیقه ۵/۹. الف) PHB استاندارد. ب) PHB استخراج شده از باکتری‌های نو ترکیب

باکتری *R. eutropha* H16 در این پژوهش برای مطالعه تولید PHB مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید PHAها است (Raberg *et al.*, 2017). در تحقیقات متعددی بهینه‌سازی شرایط کشت این باکتری برای تولید PHAها و انتقال ژن‌های مسئول بیوسنتز PHA به سویه‌های نو ترکیب *Escherichia coli* به دلیل نرخ سریع رشد این باکتری برای تولید صنعتی این بیوپلیمرها مورد مطالعه قرار گرفته و پس از بهینه‌سازی شرایط کشت تجمع بالای ۸۰ درصد P(3HB) در سلول‌ها به دست آمد (Raberg *et al.*, 2017). همچنین از این باکتری برای تولید سیانوفازین CGP (Cyanophacin Granule Polypeptide) (Voss & Steinbuichel, 2006)، هیدروکسی ایزوبوتیرات (Rohwerder *et al.*, 2010)، متیل سیتریک اسید (Ewering *et al.*, 2006)، فرولیک اسید (Overhage *et al.*, 2002)، متیل کتون‌ها (Mueller *et al.*, 2013)، الکل‌ها (Lu *et al.*, 2012 و Schirmer *et al.*, 2010)، آلکن‌ها و آلکن‌ها (Raberg *et al.*, 2017)، اسیدهای چرب با زنجیره متوسط (Mueller *et al.*, 2013) که در صنعت و داروسازی کاربرد دارند، استفاده شده است.

روش معمول برای انتقال ژن به این باکتری روش الکتروپوریشن است (Aneja et al., 2009). با توجه به اهمیت *R. eutropha* در زیست‌فناوری، بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد برای انتقال ژن بدون واسطه به این باکتری، در مطالعه حاضر ارائه شده است که می‌تواند برای انتقال وکتورهای پلاسمیدی مورد استفاده قرار گیرد. دمای بهینه برای رشد باکتری حدود ۲۸-۳۰°C است. بنابراین دمای ۳۷°C برای شوک حرارتی در بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha*، در نظر گرفته شد. تعداد کلونی‌های نو ترکیب به دست آمده در محیط کشت انتخابی LB حاوی ۱۰۰ mg.L⁻¹ کانامایسین که در OD_{600nm} برابر ۰/۸ و غلظت ۲۰ میلی مولار CaCl₂ آماده سازی شده بودند، بیشتر بود. این غلظت از CaCl₂ کمترین غلظت استفاده شده در آزمایش بود و در غلظت‌های بالاتر از آن، تعداد باکتری‌های نو ترکیب به دست آمده به طور واضح کمتر بودند (جدول ۱). با توجه به این که CaCl₂ باعث افزایش نفوذپذیری باکتری برای ورود DNA خارجی می‌شود؛ بنابراین کم شدن تعداد کلونی‌ها پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی مولار و شوک حرارتی می‌تواند به دلیل آسیب به غشای باکتری و از بین رفتن آن باشد.

وکتور پلاسمیدی pBBR1 دارای پیشبر القایی *pBAD* با طیف وسیع میزبانی به عنوان یک وکتور بیانی برای انتقال به باکتری *R. eutropha* معرفی و استفاده شده است. در مورد این وکتور بی‌ثباتی و ناپایداری پلاسمید در سلول‌ها در چندین مطالعه گزارش شده است (Kumar et al., 2016 و Kumar et al., 2018). با توجه به این که این وکتور، دارای پیشبر القایی می‌باشد و علاوه بر مساله گزارش ناپایداری آن در سلول‌ها، رایج و در دسترس نیز نیست، در این پژوهش از وکتور بیانی pBI121 به دلیل وجود پیشبر قوی و دائمی *CaMV35S* استفاده شد تا ژن *CA* بدون نیاز به ماده القا کننده، با روشی ارزان‌تر و سریع‌تر نسبت به وکتورهای دارای پیشبرهای القایی، بیان شود. در این مطالعه غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای غربالگری باکتری‌های نو ترکیب *R. eutropha* به میزان ۱۰۰ mg.L⁻¹ تعیین شد. ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی بسیاری از وکتورهای رایج می‌باشد (Tohidfar et al., 2014) و تعیین غلظت این آنتی‌بیوتیک برای غربالگری می‌تواند برای انتقال سایر وکتورها به *R. eutropha* مورد استفاده قرار گیرد.

محققان توانایی برخی از میکروارگانیسم‌ها برای تولید *CA* به منظور استفاده در CCS (CO₂ Capture Storage) را شناسایی کرده‌اند (Mitchell et al., 2010). با این حال سطح تولید *CA* بسیار پایین است و روش‌های تولید *CA* باید بهینه‌سازی شوند (Kumar et al., 2014 و Mesbah & Wiegel, 2012). در میکروارگانیسم‌های طبیعی، تولید *CA* به پارامترهای رشد مربوط است و بهینه‌سازی این شرایط باعث بهبود میزان تولید آنزیم خواهد شد. اما با توجه به این که میکروارگانیسم‌های مقاوم به حرارت و قلیا دارای آنزیم‌های مناسب‌تری از نظر کارایی و پایداری هستند (Kumar et al., 2018 و Kumar et al., 2014)، بنابراین انتقال ژن رمز ساز آنزیم *CA* مربوط به این باکتری‌ها به سویه‌های مورد نظر در افزایش بیان آنزیم، مؤثر خواهد بود. در این مطالعه از توالی بهینه‌سازی کدونی شده ژن *CA* ی مربوط به باکتری *Caminibacter mediatlanticus* (باسیل گرم منفی،

بی‌هوازی با متابولیسم کمولیتوتروفی) که از نظر مقاومت، سرعت واکنش و نیمه عمر طولانی یکی از مناسب ترین انواع CA است، استفاده شد (Mohsenpour et al., 2019). توالی این ژن با تغییرات اسیدهای آمینه، بر اساس مطالعات انجام شده با روش طراحی منطقی (Rational Design) (Bi & Mueller, 2013 و Borchert & Saunders, 2013 و Bose & Satyanarayana, 2017)، برای افزایش پایداری و عملکرد آنزیم، مهندسی و سنتز شده بود. همچنین اکثر جایگاه‌های آنزیمی معمول در وکتورهای رایج مورد استفاده در مهندسی ژنتیک، در این توالی کور شده‌اند و این مزیت استفاده از این ژن را به منظور کلون‌سازی‌های مجدد جهت اهداف مختلف، تسهیل می‌کند (Mohsenpour et al., 2019). بهینه سازی کدونی علاوه بر اینکه باعث افزایش بیان ژن در شرایط طبیعی می‌شود، در شرایط تنش نیز در پایداری و افزایش بیان ژن نسبت به شرایط طبیعی مؤثر است (Chamani et al., 2020).

در طیف FT-IR بیوپلیمر استخراج شده از باکتری‌های شاهد و نو ترکیب، گروه کربونیل (C=O) در عدد موج cm^{-1} ۱۷۲۰ تا cm^{-1} ۱۷۳۰ به عنوان پیک شاخص پلی هیدروکسی بوتیرات است. علاوه بر این در ناحیه cm^{-1} ۵۰۰ تا cm^{-1} ۱۳۰۰ حدود ده پیک قابل مشاهده است (ناحیه اثر انگشت PHB نامیده می‌شود) که همراه با پیک شاخص، نوع بیوپلیمر PHB را تأیید می‌کند. پیک‌هایی که با طیف‌های cm^{-1} ۸۰۰ تا cm^{-1} ۱۰۰۰ مشاهده می‌شوند، مربوط به پیوندهای کششی C-C در ساختمان PHB هستند. پیک‌های جذبی با عدد موج حدود cm^{-1} ۱۳۰۲-۱۲۵۹-۱۲۸۹-۱۲۷۸-۱۱۶۳-۱۱۲۸ مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و ارتعاشات کششی متقارن C-O-C است. پیک‌هایی با عدد موج cm^{-1} ۱۴۴۹-۱۳۷۸ مربوط به گروه متیل CH₃ است. پیک‌های مربوط به گروه‌های هیدروکسیل انتهایی در عدد موج بین cm^{-1} ۳۱۰۰ تا cm^{-1} ۳۶۸۰ مشاهده می‌شوند (Hassan et al., 2016) (جدول ۳، شکل‌های ۳ و ۴ و ۵). نتایج رشد باکتری و سنجش PHB با روش GC-MS و مقایسه آن در باکتری وحشی و نو ترکیب رشد یافته در شرایط مختلف نشان دهنده مؤثر بودن بیان ژن CA در افزایش تولید PHB در *R. eutropha* نو ترکیب حاوی این ژن بود. در همه آزمایش‌ها میزان برابری از وزن خشک باکتری‌های شاهد و نو ترکیب برای سنجش PHB توسط GC-MS استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت کامل و محدود LB برای رشد باکتری استفاده شد و به دلیل عدم امکان استفاده از شیکر در انکوباتور CO₂ دار به منظور یکسان بودن شرایط، همه نمونه‌ها بدون استفاده از شیکر کشت شدند که انتظار می‌رود میزان رشد باکتری و تولید PHB پس از استفاده از بیوراکتور و بهینه‌سازی محیط کشت افزایش یابد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه از میکروارگانیسم‌ها برای جذب و ترسیب کربن و از سوی دیگر تولید محصولات با ارزشی مثل بیوپلیمرهای تجزیه پذیر توسط چرخه‌های بیولوژیکی باکتری استفاده شده است. با توجه به اینکه باکتری *R. eutropha* غیر بیماریزا و قادر به رشد در دمای محیط (بدون نیاز به انکوباتور) و محیط کشت پیچیده است، نتایج این مطالعه اثبات می‌کند که

باکتری نوترکیب حاصل حتی در محیط کشت نیم LB قادر است به میزان مؤثری رشد کرده و بیوپلیمر تولید کند. بنابراین انتظار می‌رود که این باکتری بتواند در محیط‌های کشت حداقل و دارای کربن دی اکسید بالا رشد کرده و PHB تولید کند. علاوه بر ترسیب و کاهش CO₂ محیط زیست توسط باکتری، بیوپلیمرهای تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌توانند کاربردهای بسیاری در زمینه جایگزینی با پلاستیک‌های مرسوم داشته باشند. با توجه به اینکه این کاربردها به دلیل هزینه‌های بالای بازیافت بیوپلیمر محدود می‌شوند؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود که از بیوپلیمرهای میکروبی در صنایع دارویی و پزشکی به عنوان حامل دارو، نخ بخیه، بیوپلیمر جایگزین استخوان و در تحقیقات به عنوان مواد سازنده داربست سلولی و ساخت چیپ‌های میکروفلوئیدیک برای کشت چند بعدی سلول‌ها در جهت دستیابی به نتایج نزدیک به آزمایش‌های در زیوه (in vivo) استفاده گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی برای همکاری و در اختیار قرار دادن تجهیزات انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Aneja, K.K., Ashby, R.D. and Solaiman, D.K. (2009). Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalkanoate) through expression of PHA synthase from *Allochromatium vinosum* ATCC 35206. *Biotechnology Letters*, 31: 1601–1612.
- Bi, C., Su, P. and Muuller, J. (2013). Development of a broad host synthetic biology toolbox for *Ralstonia eutropha* and its application to engineering hydrocarbon biofuel production. *Microbial Cell Factories*, 12: 107-116.
- Borchert, M. and Saunders, P. (2013). Heat-stable carbonic anhydrases and their use. Patent US 8697428 B2.
- Bose, H. and Satyanarayana, T. (2017). Microbial carbonic anhydrases in biomimetic carbon sequestration for mitigating global warming: prospects and perspectives, *Frontiers in Microbiology*, 8: 1615-1635.
- Chamani Mohasses, F., Solouki, M., Ghareyazie, B., Fahmideh, L., Mohsenpour, M. (2020). Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *PLoS ONE*, 15: 1-21.
- Crepin, L., Lombard, E. and Guillouet, S.E. (2016). Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metabolic Engineering*, 37: 92–101.
- Ewering, C., Heuser, F. and Benuolken, J.K. (2006). Metabolic engineering of strains of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas putida* for biotechnological production of 2-methylcitric acid. *Metabolic Engineering*, 8: 587–602.
- Hassan, M.A., Bakhiet, E.K., Ali, S.G. and Hussien, H.R. (2016). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6: 046-051.

- Jo, B. H. (2016). Engineering de novo disulfide bond in bacterial α -type carbonic anhydrase for thermostable carbon sequestration. *Scientific Reports*, 6: 29322-29330.
- Juengert, J.R., Bresan, S. and Jendrossek, D. (2018). Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining. *BioProtocol*, 8: 2748-2762.
- Kumar, M., Gupta, A. and Thakur, I.S. (2016). Carbon dioxide sequestration by chemolithotrophic oleaginous bacteria for production and optimization of polyhydroxyalkanoate. *Bioresource Technology*, 213: 249–256.
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C. and Thakur, I.S. (2018). Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review, *Bioresource Technology*, 247: 1059-1068.
- Kumar, V., and Satyanarayana, T. (2014). Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. *Bioprocess. Biosystems Engineering*, 37: 1043–1053.
- Lu, J., Brigham, C.J. and Gai, C.S. (2012). Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 283–297.
- Mesbah, N. M., and Wiegel, J. (2012). Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Appl. Environmental Microbiology*, 78: 4074–4082.
- Mitchell, A. C., Dideriksen, K., Spangler, L. H., Cunningham, A. B. and Gerlach, R. (2010). Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubility-trapping. *Environmental Science and Technology*, 44: 5270–5276.
- Mohsenpour, M., Babaeian, J.N., Touhidfar, M. and Habashi A.A. (2008). Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and BT genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15: 69-80
- Mohsenpour, M., Noormohammadi, Z., Irani, S. and Amirmozafari, N. (2019). Expression of an environmentally friendly enzyme, engineered carbonic anhydrase, in *Escherichia coli*. *International Journal of Environmental Research*, 3: 295-301.
- Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N.B. and Jouzani G.S. (2015). Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24: 433-440.
- Mueller, J., MacEachran, D. and Burd, H. (2013). Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 4433–4439.
- Overhage, J., Steinbüchel, A. and Priefert, H. (2002). Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4315–4321.
- Raberg, M., Volodina, E., Lin, K. and Steinbüchel, A. (2017). *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38: 494-510.
- Rohwerder, T and Mueller. R.H. (2010). Biosynthesis of 2-hydroxyisobutyric acid (2-HIBA) from renewable carbon. *Microbial Cell Factories*, 9: 13-22.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3th Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schirmer, A., Rude, M.A. and Li, X. (2010). Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 329: 559–562.

- Voss, I. and Steinbuuchel, A. (2006). Application of a KDPG-aldolase gene-dependent addiction system for enhanced production of cyanophycin in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Metabolic Engineering*, 8: 66–78.
- Tohidfar, M., Ghoreyshi, E., Fakheri, B. and Mohsenpour, M. (2014). Design and construction of specific chloroplast vectors for rice plants containing betaine aldehyde dehydrogenase (badh) and flavodoxin (fld) genes for resistance to abiotic stress. *Crop Biotechnology*, 4: 47-59.
- Zhang, Z., Lian, B., Hou, W., Chen, M., Li, X. and Shen, W. (2011). Optimization of nutritional constituents for carbonic anhydrase production by *Bacillus mucilaginosus* K02. *African Journal of Biotechnology*. 10: 8403–8413.

Carbon sequestration by recombinant carbonic anhydrase in *Ralstonia eutropha*

M. Mohsenpour¹, N. Amirmozafari^{2*}, Z. Noormohammadi³, Sh. Irani⁴

Received: 2019.4.26

Accepted: 2019.12.7

Abstract

Emission of greenhouse gases and plastic wastes are one of the most important environmental problems in the world. The purpose of this study was to use the bacterium *Ralstonia eutropha* as the host for recombinant carbonic anhydrase enzyme which is used for carbon sequestration and poly hydroxyl butyrate (PHB) production. The carbonic anhydrase gene (CA) was inserted in the expression vector and transformed into *Ralstonia eutropha*. Then PHB production was assayed by FT-IR and GC-MS methods in recombinant and non-recombinant bacteria in different concentrations of LB medium in the presence and absence of CO₂. Production of PHB in LB medium increased 31.49 percent in recombinant bacteria in the presence of CO₂. These increases were 18.44 and 34.44 percent compared to non-recombinant bacteria in presence and absence of CO₂, respectively. In 0.5 LB medium, the recombinant bacterium produced 26.57 percent PHB in presence of CO₂ more than in its absence. Non-recombinant bacterium in this medium produced 18.30 and 30.63 percent PHB less than the recombinant cell in the presence and absence of CO₂, respectively. The quantity of PHB production using GC-MS revealed that CA gene expression was effective for increasing PHB production in recombinant *R. eutropha*. In the presence of CO₂ and by using a simple medium, the recombinant bacterium is able to produce PHB. This bacterium can also be effective in carbon sequestration.

Keywords: Carbonic anhydrase, Carbon sequestration, *Ralstonia eutropha*.

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

2- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science and Health Services, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: amirmozafari@iums.ac.ir)

3- Associate professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4 Associate professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

بررسی مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و خواص بیولوژیکی قارچ طاقچه‌ای *Cerrena unicolor*

جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران

سعید ملائی^۱، مصطفی عبادی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

قارچ‌های طاقچه‌ای یکی از مهمترین قارچ‌های ماکروسکوپی هستند که نقش بسزایی را در اکوسیستم ایفا می‌کنند. در این تحقیق، ابتدا ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ *Cerrena unicolor* مطالعه شد و سپس، تاثیر حلال‌های مختلف (n-هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل استات و متانول) در استخراج ترکیبات فنولی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنول و فلاونوئید کل، آنالیز فنولیک‌اسیدها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سمیت سلولی بر علیه رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) به ترتیب با روش‌های اسپتروفتومتری، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، مهار رادیکال آزاد (DPPH)، و آزمون رنگ سنجی MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بازیدیوکارپ شکل نیم‌دایره و موج‌دار داشته و سطح بالایی آن پوشیده از کرک‌های سفید تا قهوه‌ای روشن بود. بازیدیوم‌ها به طول ۲۵ میکرومتر، چماغی شکل و حامل چهار استریگما با بازیدیوسپورهای بیضی بودند. همچنین، نتایج نشان داد که در مقایسه با دیگر عصاره‌ها، عصاره متانولی بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل را داشت. بعلاوه، بنزوئیک‌اسید، پروتوکاتکوئیک‌اسید، پاراکوماریک‌اسید، گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید عمده‌ترین فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره متانولی و اتیل استاتی بودند. علاوه بر این، عصاره متانولی بیشترین خاصیت آنتی-اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی بیشترین خاصیت سمیت سلولی بر علیه رده سلولی MCF-7 را داشتند. بنابراین، عصاره متانولی بدلیل داشتن ترکیبات فنولی، می‌تواند بعنوان منبع جدید آنتی‌اکسیدان طبیعی با خاصیت سمیت سلولی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بازیدیوکارپ، بازیدیومیست، ترکیبات فنولی، سمیت سلولی، عصاره متانولی.

۱- تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

۲- تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

* (نویسنده مسئول: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)

مقدمه

در طب شرقی، قارچ‌های دارویی کاربردهای بسیار گسترده‌ای داشته و برای درمان انواع اختلالات از جمله بدخیمی‌ها استفاده می‌شده‌اند (Patel & Goyal, 2012). مطالعات گسترده‌ای در بسیاری از کشورهای مختلف دنیا در جهت استفاده از قارچ‌ها و کشف متابولیت‌های آنها برای درمان انواعی از بیماری‌ها انجام گرفته است. در همین راستا، ترکیبات دارویی مهمی نظیر پنی‌سیلین، گریفولین، سیکلوسپورین، آکالوئیدهای ارگوت، کریستن، لنتینان و ... از قارچ‌ها استخراج شده‌اند (Das, 2010; Anjum et al., 2012; Mizuno & Nishitani, 2013). علاوه بر این، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی زیادی همچون Interfungins A از قارچ‌های دارویی بدست آمده‌اند (Lee & Yun, 2007). بنابراین، با توجه به تاثیر بالا، هزینه پایین و سهولت تهیه، قارچ‌ها می‌توانند منبع مناسبی برای تهیه داروها برای مصارف پزشکی باشند.

قارچ‌های طاقچه‌ای بطور عمده از شاخه بازیدیومیست‌ها بوده و از چوب به عنوان منبع تغذیه و یا بستر رشد استفاده می‌کنند. این قارچ‌ها نقش حیاتی در اکوسیستم بویژه در چرخه مواد آلی ایفا می‌کنند و با دارا بودن سیستم آنزیمی منحصر به فرد قادر به تجزیه چوب به اجزای سازنده آن هستند. در عین حال، بسیاری از این قارچ‌ها دارای منابع عظیم درمانی و عناصر مفید و فعال به لحاظ بیولوژیک بوده و از دیرباز کاربردهای وسیعی در طب سنتی داشته‌اند (Christopher, 1988; Wasser & Weis, 1999). در تحقیقات انجام گرفته خواص دارویی برخی قارچ‌های طاقچه‌ای نظیر *Fomes*, *Phellinus*, *Ganoderma* و *Trametes* بررسی شده است. عصاره این قارچ‌ها، شامل ترکیبات فعالی همچون پروتئین‌ها، پلی‌ساکارید، گلیکوزید، چربی‌ها، اسانس، آکالوئید، فنول، توکوفرول، کارتنوئید، فلاونوئید و اسیدهای آلی بوده و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Unyayar et al., 2006; Rashid et al., 2011; Patel & Goyal, 2012).

قارچ *Cerrena unicolor* (bull.) murril نوعی قارچ طاقچه‌ای غیر خوراکی است و پراکندگی وسیعی در دنیا بویژه در مناطق جنگلی آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکای جنوبی دارد (Roody, 2003). *C. unicolor* بعنوان یک قارچ تجزیه کننده چوب مطرح است و باعث ایجاد پوسیدگی سفید بر روی چوب می‌شود. این قارچ هم بصورت پارازیت در بافت زنده و هم بصورت ساپروفیت بر روی بخش آسیب دیده درختانی نظیر افرا، زبان گنجشک، راش، غان، و بلوط یافت می‌شوند. از جدایه‌های مختلف این قارچ جهت تولید آنزیم‌های صنعتی مختلف نظیر لاکاز، منگنز پراکسیداز، سلویزدهیدروژناز، گزلیناز و سلولاز استفاده می‌کنند (Sulej et al., 2015; Zhang et al., 2017). همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که این قارچ منبع مناسبی از ترکیبات فعال زیستی با اهمیت دارویی و پزشکی است. در تحقیقی که بر روی مولکول‌های سبک وزن جدا شده از قارچ *C. unicolor* انجام شده است فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و آنتی‌باکتریایی آنها مورد بررسی قرار گرفته و معلوم شده است که این ترکیبات خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی دارند (Mizerska-Dudka et al., 2015).

در استخراج متابولیت‌های ثانویه، عوامل مختلفی همچون نوع و قطبیت حلال‌ها می‌توانند نقش مهمی در بازده و خواص بیولوژیکی آنها داشته باشند (Ngo et al., 2017; Thouri et al., 2017). بطور مثال، حلالیت ترکیبات قندی در حلال آبی بیشتر است و این حلال قابلیت استخراج ترکیبات قندی با بازده بالا را دارد. درحالیکه، برای استخراج متابولیت‌های غیرقطبی نیاز به حلال غیرقطبی همچون هگزان می‌باشد. افزایش تعداد مراحل استخراج نیز عامل دیگری است که می‌تواند نقش اساسی را در افزایش بازده ایفا کند. بعلاوه، از لحاظ تجاری، در بررسی روش یا حلال استخراج، بازده استخراج و پارامترهای اقتصادی همچون قیمت حلال حائز اهمیت هستند. بنابراین، استخراج متابولیت‌های ثانویه با استفاده از حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف و بررسی خواص بیولوژیکی حاصل از آنها می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که قارچ *C. unicolor* بعنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی با اهمیت دارویی و پزشکی است. اما، بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای، تاکنون تحقیقی بر روی ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی مورفولوژیکی قارچ *C. unicolor* جمع‌آوری شده از زیستگاه طبیعی آن در جنگل‌های ارسباران و تحقیق بر روی ترکیبات فیتوشیمیایی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سمیت‌سلولی عصاره‌های n-هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری قارچ

جمع‌آوری اندام بارده قارچ *C. unicolor* در پاییز سال ۱۳۹۶ از باقیمانده تنه درختان در جنگل‌های ارسباران (واقع در استان آذربایجان شرقی، شهرستان کلیبر با عرض جغرافیایی ۳۸° ۵۰' ۲۴"، طول جغرافیایی ۵۹° ۴۹' ۴۶" و ارتفاع ۱۷۰۸ متر از سطح دریا) انجام گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در داخل کیسه‌های پلی‌اتیلینی تمیز قرار داده شدند و برای بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل شدند. شناسایی قارچ با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی بازیدیوکارپ و همچنین خصوصیات میکروسکوپی نظیر بازیدیوم و شکل بازیدیوسپور با استفاده از کلیدهای معتبر صورت گرفت (Zhishu et al., 1993; Ginns, 2017). جهت مشاهده بازیدیوم و بازیدیوسپور، برش‌های بسیار نازک از قسمت زیرین بازیدیوکارپ تهیه شد و بعد از رنگ آمیزی با محلول لاکتوفنل - کاتن بلو، با میکروسکوپ نوری (مدل Olympus BH2) و بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره‌گیری به روش التراسونیک

برای انجام عمل استخراج، به ۲ گرم از قارچ پودر شده، ۲۰ میلی لیتر از حلال‌های مختلف (n-هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل استات و متانول) به طور جداگانه اضافه شد و در دستگاه التراسونیک با قدرت ۱۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰

دقیقه عصاره‌گیری گردید. با استفاده از کاغذ صافی عصاره‌های بدست آمده صاف شدند و سپس با استفاده از دستگاه تبخیرکننده مدور خشک گردیده و برای آنالیزهای بعدی در داخل یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی

برای اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها، مقدار ۱۰ میلی گرم از عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* با ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول حل گردید و در بالن ۱۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از محلول‌های بدست آمده، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فولین سیوکالتو (۱۰٪ حجمی/حجمی) ریخته و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات ۷ درصد نیز به آن‌ها اضافه شد. محلول شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شد، با این تفاوت که به جای محلول عصاره‌ها از محلول اتانول-آب استفاده گردید. نمونه‌ها در فضای تاریک به مدت ۲ ساعت باقی ماندند. سپس جذب نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ناحیه ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و بر اساس نمودار کالیبراسیون بدست آمده از گالیک اسید، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها محاسبه گردید (Hazrati et al., 2019).

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر متانول) با ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۱ مولار مخلوط گردید. نمونه‌ی شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شده منتهی با این تفاوت که به جای عصاره از حلال متانول استفاده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، جذب محلول‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ناحیه‌ی ۴۲۶ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس نمودار کالیبراسیون بدست آمده از ماده استاندارد کوئرستین، میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها محاسبه گردید (Hazrati et al., 2019).

فعالیت آنتی اکسیدانی

برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها از روش DPPH و ماده استاندارد اسید آسکوربیک استفاده شد (Mollaei et al., 2019). ابتدا ۲ میلی گرم از عصاره‌ها را در ۱ میلی لیتر متانول حل کرده و سپس غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تهیه شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده به ۵۵۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داد شد. سپس، جذب تمام محلول‌ها و نمونه‌های شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهارکنندگی از معادله‌ی زیر محاسبه گردید:

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

آزمون سمیت سلولی

برای اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* بر ضد رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) از آزمون رنگ‌سنجی MTT استفاده شد (Asnaashari et al., 2019). سلول‌های MCF-7 از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ به همراه آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنسیلین کشت و پاساژ داده شدند تا از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند (پس از ۳-۴ پاساژ). سلول‌های چسبیده از سطح فلاسک توسط تریپسین-EDTA (Gibco BRL, Scotland) جدا شدند و بعد از شمارش سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (دارای 1×10^4 سلول) به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی انتقال داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، CO₂ ۵٪ و رطوبت ۱۰۰٪ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و بعد از گذشت مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه، در چاهک‌های ۹۶ تایی، جذب نمونه‌ها در طیف جذب ۵۷۰ نانومتر خوانده شدند و بر حسب فرمول مربوطه میزان زنده‌مانی محاسبه شد.

آنالیز فنولیک‌اسیدها

از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (شرکت waters، ایالات متحده آمریکا) برای جداسازی و شناسایی فنولیک‌اسیدها استفاده گردید. ستون کروماتوگرافی بکار برده شده از نوع تجزیه‌ای با فاز معکوس Eurospher 100-5 C18 و ابعاد ۲۵ سانتی‌متر طول و ۴/۶ میلی‌متر قطر داخلی و ۵ میکرومتر اندازه ذرات بود. سرعت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و جداسازی در دمای اتاق و با روش شویش گرادیانی با استفاده از حلال‌های متانول (حلال نوع A) و آب گرید HPLC (حلال B) انجام گرفت. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود و پیک‌ها در طول موج ۲۸۲ نانومتر مشاهده شدند.

آنالیز آماری

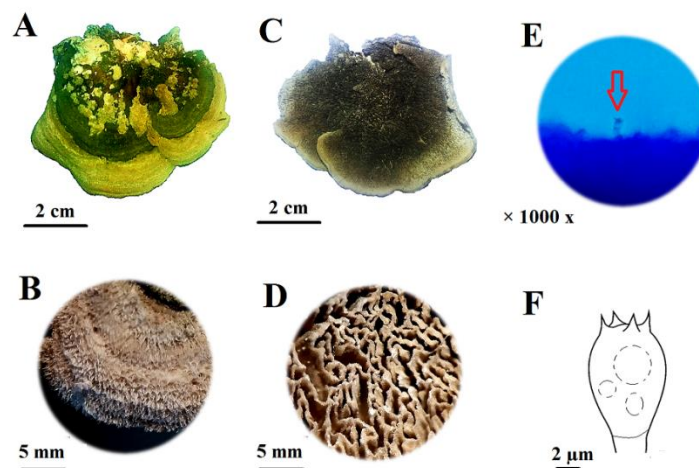
جهت تجزیه و تحلیل آماری اعداد و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار SPSS (ver. 17) و روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون پس تجربی Tukey استفاده شد.

نتایج

بررسی مورفولوژیکی

با توجه به کلیدهای معتبر، تشخیص قارچ *C. unicolor* مورد تأیید قرار گرفت. این قارچ مربوط به شاخه Basidiomycota، راسته Polyporales و تیره Polyporaceae است. شکل بازیدوکارپ نیم دایره و موجدار بوده و اندازه آن بین

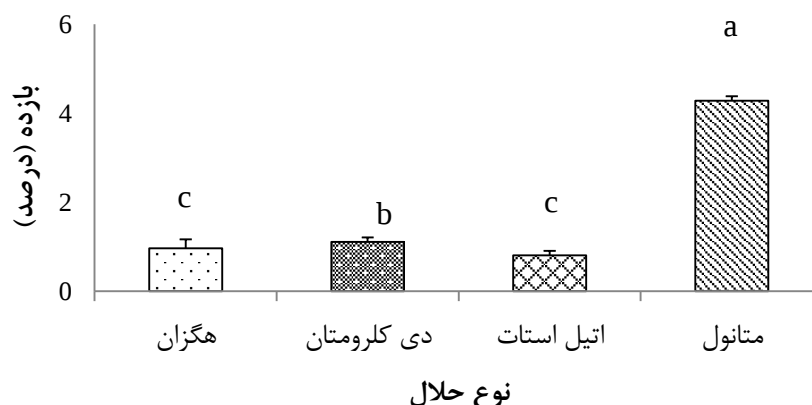
۳ تا ۱۰ سانتی متر متغیر است. بازیدیوکارپ بافتی سخت، چوبی و کرکدار داشته و رنگ قسمت زیرین آن سفید تا قهوه‌ای است ولی به علت رشد جلبک، سطح رویی سبز رنگ دیده می‌شود (شکل ۱A و ۱B). قسمت زیرین قارچ خاکستری رنگ با منافذ لوله‌ای متعدد است (شکل ۱C و ۱D). بازیدوم به ابعاد $4-6 \times 20-25$ میکرومتر، چماقی شکل و حامل چهار استریگما بود که بر روی آن بازیدسپوره‌های بیضوی شکل با سطح صاف تشکیل می‌گردد (شکل ۱E و ۱F).



شکل ۱: خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *C. unicolor*. A و B: سطح رویی بازیدیوکارپ، C و D: سطح زیرین بازیدیوکارپ، E: بازیدیوم با بزرگنمایی $\times 1000$ ، F: شکل شماتیک بازیدیوم با چهار استریگما

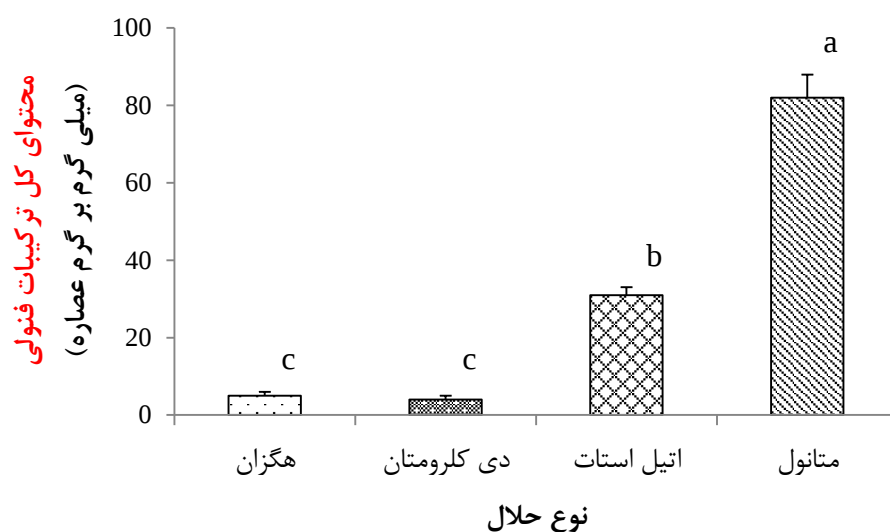
مطالعات فیتوشیمیایی

نتایج میانگین بازده استخراج عصاره‌های n-هگزانی، دی‌کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی قارچ مورد بررسی در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره متانولی (۴/۲۸ درصد) بود و تفاوت معنی‌داری بین بازده عصاره‌های هگزانی و اتیل استاتی وجود نداشت.



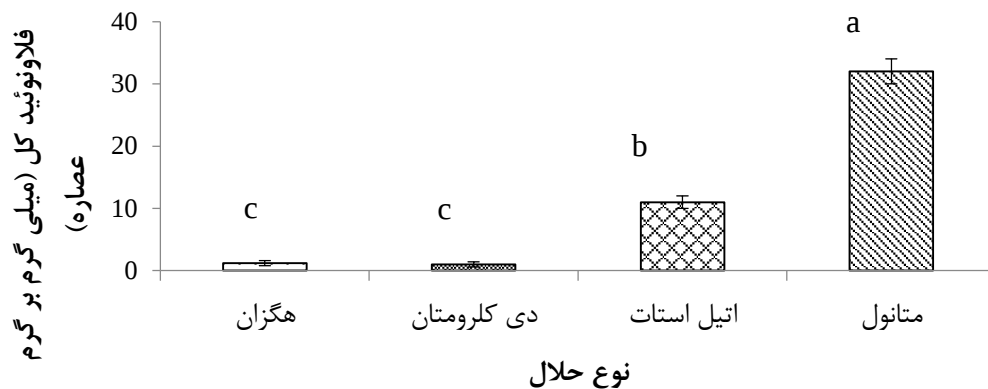
شکل ۲: بازده عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک‌اسید و معادله بدست آمده از آن، $Y=0.0029X + 0.38$; $R^2=0.99$ محاسبه گردید. شکل ۳ میزان کل ترکیبات فنولی موجود در یک گرم از عصاره‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره متانولی با مقدار ۸۲ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود و عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی نیز کمترین میزان ترکیبات فنولی را داشتند. عصاره اتیل‌استاتی نیز دارای میزان متوسطی از ترکیبات فنولی با مقادیر ۳۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود.



شکل ۳: میزان کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

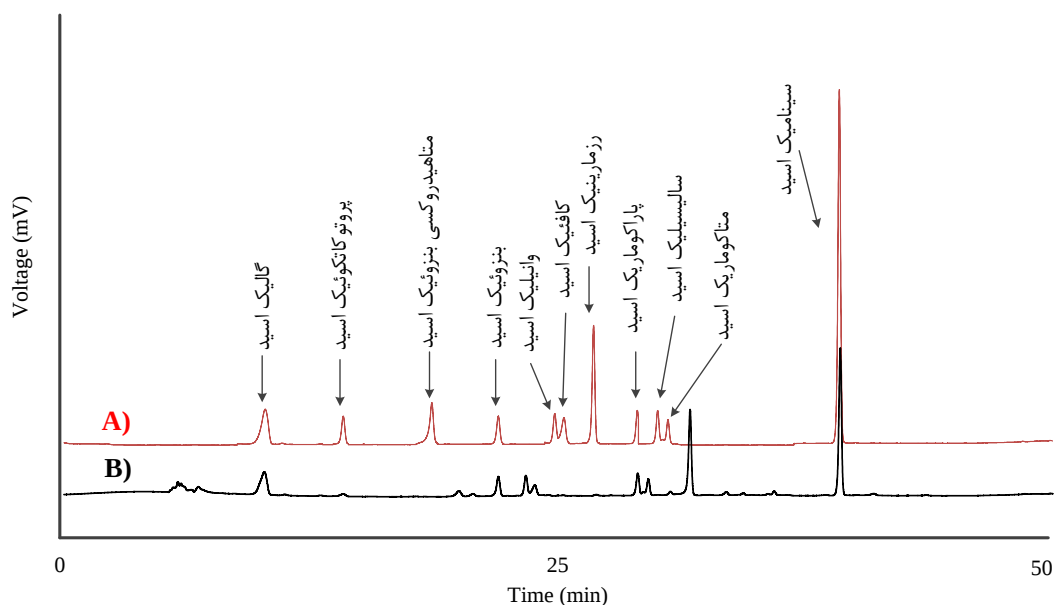
شکل ۴ نتایج حاصل از میزان کل فلاونوئید موجود در یک گرم از عصاره‌های n-هگزانی، دی‌کلرومتانی؛ اتیل‌استاتی و متانولی را نشان می‌دهد. برای محاسبه میزان کل فلاونوئید از منحنی استاندارد کوئرستین و معادله بدست‌آمده از آن یعنی $Y=0.0037X - 0.03$; $R^2=0.99$ استفاده گردید. نتایج نشان داد که عصاره متانولی بیشترین میزان فلاونوئید (۳۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره) و عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی دارای کمترین میزان فلاونوئید بودند.



شکل ۴: میزان فلاونوئید کل عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

بررسی فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌ها

فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* با روش HPLC و با کمک استاندارد، جداسازی و شناسایی شدند (شکل ۵) و در ادامه مقدار کمی آنها اندازه‌گیری گردید. از مجموع ۱۱ فنولیک‌اسید مورد آنالیز، ۵ فنولیک‌اسید در عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی شناسایی شدند (جدول ۱). بر اساس نتایج بدست‌آمده، بیشترین میزان فنولیک‌اسیدها مربوط به گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید بود و عصاره متانولی نیز مقدار قابل‌توجهی از بنزوئیک‌اسید داشت. همچنین، عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی فاقد فنولیک‌اسیدهای مورد آنالیز بودند.



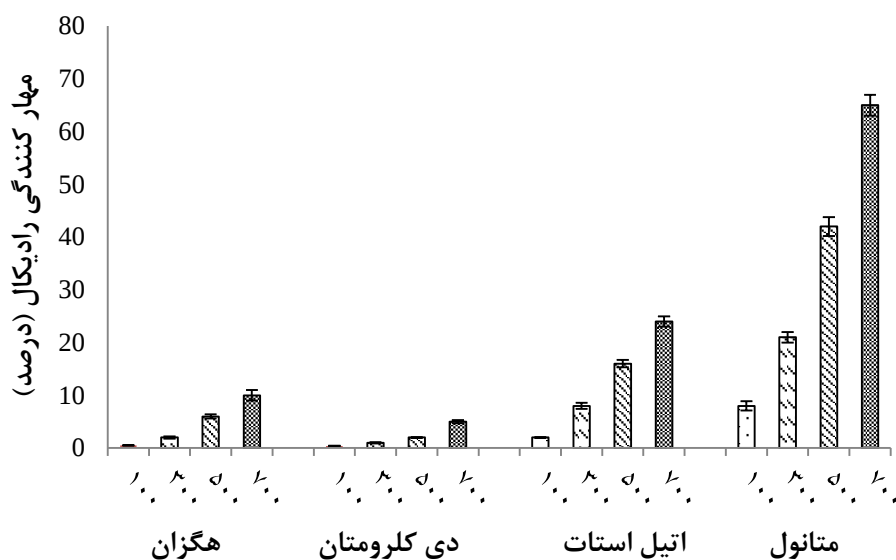
شکل ۵: کروماتوگرام HPLC مربوط به (A) استاندارد فنولیک‌اسیدها (B) عصاره متانولی قارچ *C. unicolor*.

جدول ۱: میزان فنولیک اسیدهای (mg/10g extract) موجود در عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor*

بنزوئیک اسید	پروتوکاتکوئیک اسید	پاراکوماریک اسید	گالیک اسید	سینامیک اسید	
-	-	-	-	-	n-هگزان
-	-	-	-	-	دی کلرومتان
۱/۰ ± ۱۲/۲۱	۰/۰ ± ۶۱/۰۶	۲/۰ ± ۰۸/۳۸	۵/۰ ± ۵۲/۵۴	۹/۱ ± ۴۹/۷۴	اتیل استات
۴/۰ ± ۵۱/۷۸	۱/۰ ± ۴۳/۱۲	۲/۰ ± ۴۲/۲۶	۹/۰ ± ۱۹/۶۸	۲۲/۱ ± ۶۱/۹۲	متانول

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی

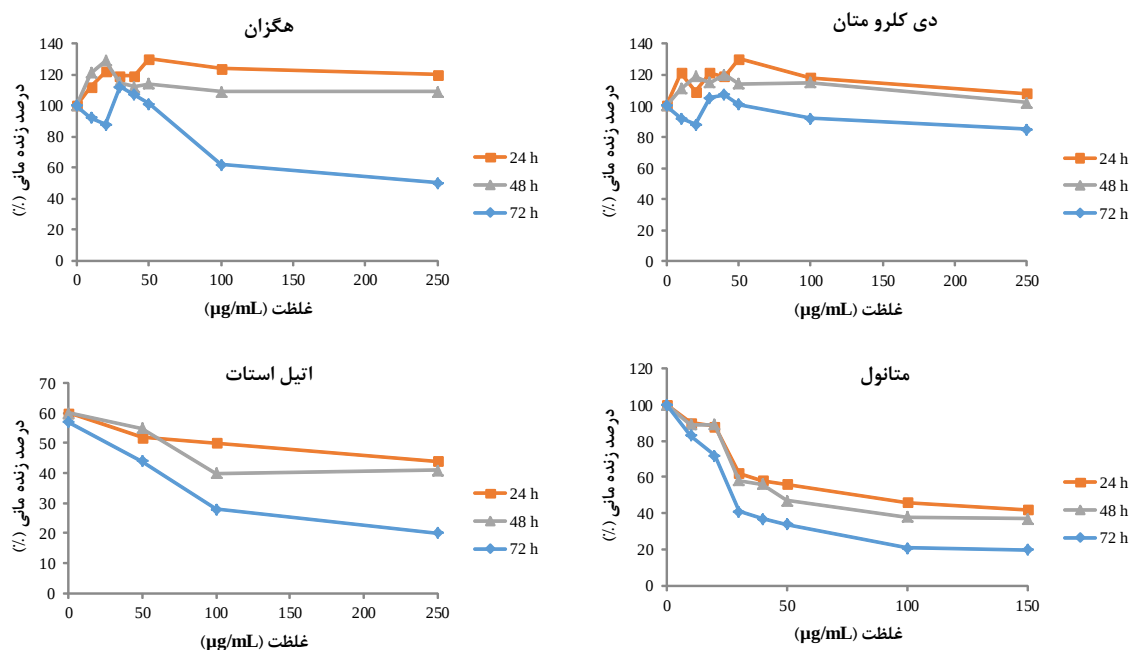
نتایج آنالیز واریانس خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ نشان داد که فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی افزایش می‌یابد (شکل ۶). در محدوده غلظتی، آنتی اکسیدان سنتزی فعالیت ضد رادیکالی بالایی نسبت به تمام عصاره‌ها از خود نشان داد و از این نظر هیچ یک از عصاره‌ها قابل رقابت با آنتی اکسیدان سنتزی نبودند. مقدار IC_{50} عصاره‌های n-هگزانی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی به ترتیب ۳۱۸۲، ۷۲۶۵، ۱۴۱۳ و ۵۶۶ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. بر اساس نتایج، عصاره متانولی دارای کمترین مقدار IC_{50} است و بیشترین خاصیت آنتی-اکسیدانی را نسبت به بقیه عصاره‌ها دارد.



شکل ۶: درصد مهارکنندگی رادیکالی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (میکروگرم بر میلی لیتر)

بررسی سمیت سلولی

جهت بررسی فعالیت سمیت سلولی عصاره‌های مختلف در *In vitro* از آزمون MTT استفاده شد. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۷ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی است. در صورتیکه درصد سلول‌های زنده رده سلولی MCF-7 در مجاورت عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی در مقایسه با کنترل (نمونه حاوی سلول‌های MCF-7 و فاقد عصاره) اختلاف معنی‌داری نداشت. این یافته‌ها بیانگر این است که درصد سلول‌های MCF-7 زنده، با افزایش غلظت عصاره‌های اتیل‌استات و متانولی قارچ *C. unicolor* کاهش داشته و از قابلیت پرولیفراسیون سلول‌ها جلوگیری شده است. همچنین، با گذشت زمان، میزان سلول‌های زنده به طور معنی‌داری کاهش یافته است که نشان‌دهنده وابستگی درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی به زمان تیماردهی با عصاره‌های اتیل‌استات و متانول است. IC_{50} عصاره‌ها بر روی رده سلولی MCF-7 محاسبه گردید و بر اساس نتایج، سمیت سلولی در بین عصاره‌های مورد مطالعه با توالی متانولی < اتیل‌استاتی < هگزانی < کلروفرمی کاهش نشان می‌دهد.



شکل ۷: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) در اثر تیمار با عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor*

مباحث

قارچ *C. unicolor* بصورت ساپروفیت موجب پوسیدگی در تنه باقیمانده درختان می‌شود. بروز هر گونه آسیب در اندام درختان خصوصاً آسیب فیزیکی نظیر قطع درختان سبب ظهور این قارچ می‌گردد. دامنه انتشار این قارچ در ایران جنگل‌های

هیرکانی، ارسباران و زاگرس است. در این مطالعه، میزبان قارچ *C. unicolor* درخت بلوط و افرا تشخیص داده شد که مطابق با این نتیجه در سایر مطالعات نیز این گونه از روی میزبان بلوط، افرا، راش و آزاد گزارش شده است (صابر، ۱۳۷۹؛ قبادنژاد، ۲۰۱۴). از لحاظ قطبیت، متانول مابین حلال‌های قطبی و غیرقطبی قرار دارد و قابلیت استخراج طیف وسیعی از ترکیبات را دارد. در این پژوهش، تاثیر چهار حلال با قطبیت مختلف (n-هگزانی، دی‌کلرومتانی، اتیل‌استاتی و متانولی) بر بازده استخراج مورد بررسی قرار گرفت و معلوم شد که بیشترین بازده استخراج مربوط به متانول است. بنابراین، انتخاب مناسب حلال می‌تواند بر بازده استخراج و غلظت آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در عصاره‌ها تاثیر بگذارد.

رادیکال‌های آزاد موجود در بافت‌های بیولوژیکی از طریق واکنش با اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و DNA، باعث تخریب سلول‌ها شده و بیماری‌های قلبی-عروقی ایجاد می‌کنند. بنابراین، پیشگیری از چنین واکنش‌های تخریبی، در سلامت انسان‌ها اهمیت بسیاری دارد (Nimse & Pal, 2015). نتایج آزمون DPPH نشان داد که مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت عصاره‌های متانول و اتیل‌استاتی==بوده و با افزایش غلظت آنها، فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌ها افزایش می‌یابد؛ به عبارت دیگر، در غلظت‌های بالاتر، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در عصاره‌ها، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد کاهش یافته و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی قارچ *C. unicolor* مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن است و میزان فنول و فلاونوئید کل در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره متانولی قارچ را توجیه نماید.

در مطالعه کشت سلولی، اثر سمیت عصاره‌های مختلف قارچ بر رده سلولی سرطان سینه بررسی گردید. با مشاهده نتایج به دست آمده می‌توان گفت که بیشترین میزان IC_{50} ، مربوط به عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی و کمترین میزان آن مربوط به عصاره متانولی است و این نتایج، اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت سلولی عصاره متانولی حاوی متابولیت‌های قارچ *C. unicolor* بر روی روده سلولی MCF-7 را نشان می‌دهد. از طرفی، نتایج آزمایش سمیت سلولی نشان داد که کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت و زمان عصاره، تعداد سلول‌ها به تدریج کاهش بیشتری می‌یابد. بر طبق نتایج بدست آمده، می‌توان پیشنهاد کرد که این عصاره‌ها می‌توانند اثر سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی MCF-7 داشته و به صورت وابسته به غلظت و زمان بر روند تکثیر سلول‌ها تاثیر می‌گذارند. جهت ارزیابی میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های مختلف قارچ، از روش فولین سیوکالتو و روش رنگ‌سنجی استفاده شد. نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نشان داد که بیشترین مقدار این ترکیبات به ترتیب مربوط به عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی با مقدار فنول و فلاونوئید موجود در عصاره‌ها وجود دارد (Tamuly et al., 2013; Li et al., 2018). ترکیبات فنولی موجود در عصاره متانولی قارچ *C. unicolor* ممکن است به عنوان عامل کاهنده عمل کرده و با دادن

الکترون، با ترکیبات رادیکالی واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدار تبدیل کنند که در نهایت باعث خنثی شدن زنجیره رادیکال آزاد می‌شود (Leopoldini et al., 2004). بنابراین، می‌توان انتظار داشت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتیل استاتی باشد. همچنین، همانطور که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌شود پس از عصاره متانولی، عصاره اتیل استاتی دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود که می‌تواند دلیل افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره اتیل استاتی نسبت به دی‌کلرومتانی باشد.

ترکیبات فنولی گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه موجود در موجودات زنده همچون گیاهان و قارچ‌ها هستند که بدلیل داشتن خواص ضدسرطان توجه محققین را به خود جلب کرده‌اند. اثرات ضدسرطانی ترکیبات فنولی به طور عمده به دلیل توانایی در ایجاد توقف در چرخه سلولی، مدولسیون سطوح ROS، مهار کانال‌های سیگنال انکوژنیک کنترل کننده تکثیر سلولی، آنژیوژنز و آپوپتوز، تقویت پروتئین‌های سرکوب‌کننده تومور و افزایش تمایز و تغییر شکل در سلول‌های طبیعی است (Fresco et al., 2010). همچنین، این ترکیبات بخاطر داشتن گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک، بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تبدیل هیدروکسیدها به رادیکال آزاد که عامل اساسی برای ایجاد سرطان در انسان می‌باشد را دارند (Lin et al., 2016). علاوه بر این، مکانیسم عمل ترکیبات فنولی برای دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اثر جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد همچون پراکسیدهای چربی، آنیون‌ها، سوپراکسیدها و رادیکال‌های هیدروکسیل است (Nimse & Pal, 2015).

نتایج حاصل از آنالیز فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌های قارچ *C. unicolor* نشان داد که بنزوئیک‌اسید، پروتوکاتکوئیک‌اسید، پاراکوماریک‌اسید، گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید، از اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی و اتیل استاتی قارچ *C. unicolor* بوده و مقدار این ترکیبات در عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتیل استاتی است. همچنین، عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی فاقد فنولیک‌اسیدهای مذکور هستند. این ترکیبات شناخته شده معمولا در طبیعت به وفور یافت می‌شوند و به دلیل خواص بیولوژیکی فراوان، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Saibabu et al., 2015). بر اساس مطالعات انجام گرفته، پروتوکاتکوئیک‌اسید با مکانیسم‌های مختلفی همچون ایجاد آپوپتوز، افزایش فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و تخریب DNA باعث سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی می‌گردد (Yin et al., 2009; Kassi et al., 2014). همچنین، بر اساس مطالعه انجام گرفته، پاراکوماریک‌اسید بقای سلول‌های HCT-15 و HT-29 را کاهش می‌دهد (Jaganathan et al., 2013). گالیک‌اسید با تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و توقف سلول‌ها در مرحله G2/M، مانع تکثیر سلول‌های سرطان می‌شود (Shahrzad et al., 2001). علاوه بر آن، هم سینامیک‌اسید و هم بنزوئیک‌اسید با القای ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، چرخه سلولی را متوقف کرده و از این طریق مانع تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد (Shin et al., 2013). بنابراین، احتمالا

خواص آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره های متانولی و اتیل استاتی قارچ بدلیل وجود ترکیبات فنولیک اسید موجود در آنهاست.

به طور اجمالی، از آنجائی که رادیکال های آزاد، محصولات فرعی اجتناب ناپذیر واکنش های اکسیداسیون و احیاء هستند، لذا مصرف بیشتر آنتی اکسیدان ها و ترکیبات ضدسرطانی می تواند راهکاری برای حذف رادیکال های آزاد مضر از بدن باشد. از طرفی، مصرف آنتی اکسیدان های طبیعی، سالم تر و ایمن تر است. لذا، با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و شناسایی خواص آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره متانولی قارچ *C. unicolor*، استفاده از این منبع طبیعی به عنوان جایگزین مواد سنتتیک پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بدلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می آید.

منابع

- صابر، م. (۱۳۷۹). معرفی دو گونه جدید از قارچ های پلی پور در ایران. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۳۷۴.
- قبادنژاد، م. (۲۰۱۴). مروری بر قارچ های چوبزی بازیدیومیست بر روی بلوط در ایران. اولین همایش ملی جنگل های بلوط در ایران. ۲۴۱-۲۳۴.
- Anjum, T., Azam, A. and Irum, W. (2012). Production of Cyclosporine A by Submerged Fermentation from a Local Isolate of *Penicillium fellutanum*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(4): 372-374.
- Asnaashari, S., Delazar, A., Safarzadeh, E., Tabibi, H., Mollaei, S., Rajabi, A. and Asgharian, P. (2019). Phytochemical analysis and various biological activities of the aerial parts of *Scrophularia atropatana* growing in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(3): 1543-1555.
- Christopher, H. (1988). *Medicinal mushrooms, An Exploration of Tradition Healing and Culture*. Herbs and Health Series), 1: 27-33.
- Das, K. (2010). Diversity and conservation of wild mushrooms in Sikkim with special reference to Barsey Rhododendron Sanctuary. *NeBio*, 1(2): 1-13.
- Fresco, P., Borges, F., Marques, M.P., and Diniz, C. (2010). The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1): 114-34.
- Ginns, J. (2017). *Polypores of British Columbia*. 1th edn. Province of British Columbia, 260 Pp. British.
- Hazrati, S., Ebadi, M.T., Mollaei, S. and Khurizadeh, S. (2019). Evaluation of volatile and phenolic compounds, and antioxidant activity of different parts of *Ferulago angulata* (schlecht.) Boiss. *Industrial Crops and Products*, 140: 111589.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. and Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43): 7726-34.

- Kassi, E., Chinou, I., Spilioti, E., Tsiapara, A., Graikou, K., Karabournioti, S., Manoussakis, M. and Moutsatsou, P. (2014). A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF- κ B activity and IL-6 secretion. *Phytomedicine*, 21(11): 1483-9.
- Lee, I.K. and Yun, B.S. (2007). Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(10): 3309-3314.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. and Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(22): 4916-4922.
- Li, Z., Lee, H.W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D. and Ong, C.N. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules*, 23(5): 1139.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10): 1374.
- Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Błachowicz, A., Rejczak, T.P., Matuszewska, A., Osińska-Jaroszuk, M., Stefaniuk, D., Janusz, G., Sulej, J. and Kandefer-Szerszeń, M. (2015). Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 459-468.
- Mizuno, M. and Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(3): 202-207.
- Mollaei, S., Sedighi, F., Habibi, B., Hazrati, S. and Asgharian, P. (2019). Extraction of essential oils of *Ferulago angulata* with microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 137: 43-51.
- Ngo, T.V., Scarlett, C.J., Bowyer, M.C., Ngo, P.D. and Vuong, Q.V. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, 1: 1-8.
- Nimse, S.B. and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35): 27986-28006.
- Patel, S. and Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. *3 Biotech*, 2: 1-15.
- Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M.A., McKeown, S.R., Banat, I.M. and Worthington, J. (2011). A study of anti-cancer effects of *Funalia troglia* in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1477-1483.
- Roody, W.C. (2003). *Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians*, 1th edn. University Press of Kentucky 536 Pp. Lexington.
- Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L.A. and Hameed, S. (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015; 2015: 823539.
- Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A. and Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 131(4): 1207-10.
- Shin, S.Y., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D.W., Bae, D.H., Koh, D., Lee, Y.H. and Lim, Y. (2013). Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at g1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8): 16970-85.

- Sulej, J., Janusz, G., Osińska-Jaroszuk, M., Rachubik, P., Mazur, A., Komaniecka, I., Choma, A. and Rogalski, J. (2015). Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important **Cerrena unicolor** strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 1638–1658.
- Tamuly, C., Saikia, B., Hazarika, M., Bora, J., Bordoloi, M.J. and Sahu, O.P. (2013). Correlation between phenolic, flavonoid, and mineral contents with antioxidant activity of underutilized vegetables. *International Journal of Vegetable Science*, 19(1): 34-44.
- Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Hichri, A.O., Hassin, R.B. and Achour, L. (2017). Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 248.
- Unyayar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A., Unyayar, S., Cekic, O. and Atacag, H. (2006). Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 29: 69-83.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 31-62.
- Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M. and Hsu, C.K. (2009). Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 57(14): 6468-73.
- Zhang, H., Zhang, J., Zhang, X. and Geng, A. (2017). Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus **Cerrena unicolor** BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. *Process Biochemistry*, 66: 222–229.
- Zhishu, B., Guoyang, Z. and Li, T. (1993). *The Macrofungus Flora of China's Guangdong Province*. 1th edn. Chinese University Press, 734 Pp. Hong Kong.

Evaluation of morphological, phytochemical and biological activity of bracket fungi *Cerrena unicolor* collected from Arasbaran forests

S. Mollaei¹, M. Ebadi^{2*}

Received: 2020.3.4

Accepted: 2020.4.22

Abstract

Bracket fungi are the most important macroscopic fungi that play a main role in the ecosystem. In this study, the morphological characters of *Cerrena unicolor* were evaluated and then, the effect of different solvents (n-Hexan, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol) on the extraction of phenolic compounds, antioxidant properties, and cytotoxic activities of the extracts were investigated. Total phenol and flavonoid content, phenolic acid analysis, antioxidant properties, and cytotoxic activities on MCF-7 cells were evaluated by spectrophotometry, HPLC, DPPH, and MTT methods, respectively. The obtained results showed the basidiocarp was semicircular and wavy, and the upper surface was covered with small white to grayish brown hairs. Basidia were 25 µm in length, calvate and including 4 sterigmata with ellipsoid basidiospores. The results also indicated that the Methanolic extract had the highest total phenol and flavonoid contents compared with other extracts. Moreover, Benzoic acid, Protocatechuic acid, Gallic acid, and Cinnamic acid were the main phenolic acids of the Methanolic and Ethyl acetate extracts. In addition, the Methanolic extract showed the highest antioxidant activity in inhibiting DPPH radicals, while the Methanolic and Ethyl acetate extracts indicated the highest cytotoxic activity on MCF-7 cells. Therefore the Methanolic extract due to phenolic compounds could be proposed as a new *source* of *natural* antioxidants with cytotoxic activity.

Keywords: Antioxidant, Basidiocarp, Basidiomycetes, Cytotoxic activity, Phenolic compounds, Methanolic extract.

1-Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of chemistry

2-Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of Biology

*(Corresponding author Email: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)

Content

The effect of the antibiotic, sucrose and activated charcoal on bacterial contamination, browning and organogenesis of date palm (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) meristem culture	
M. Eskandari, P. Pour Mohammadi, K. Alami Saeid.....	19
Ex vivo expansion of micro capsulated U937 cells in an external stirred bioreactor	
Y. Beygi Khosrowshahi, M. Hosseini.....	32
Antimicrobial effects of <i>Leptogium saturninum</i>, <i>Ramalina peruviana</i> and <i>Punctelia borreri</i>	
F.Hamzekhani, P. Mohammadi, A. Saboora	45
Ecological, Anatomical, Morphological, and Micro-Morphological Characteristics of <i>Gypsophila mucronifolia</i> (Caryophyllaceae) endemic to gypsic soils of Semnan, Iran	
F. Rabizade.....	61
Effect of silicon nanoparticles on some physiological parameters of saffron corm (<i>Crocus sativus</i>)	
B. Zareyi, K. Kiarostami , M. Hosseinzadeh Namin, M. Sorahinobar.....	77
Effect of Betaine on memory dysfunction and Activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme in Alzheimer's model induced by intra-hippocampal Beta-Amyloid Protein Injection	
F.Alipourfard, H. Shajiee, f. nazari-serenjah, v. hojati, M.alirezaie	89
Characterization and nanoparticle synthesis of peroxidase by computational and experimental methods	
S. Fooladband, P. Ghadam, M.Zarrabi	110
Sexual dimorphism of gnathopods 1 and 2 and uropod 3' shapes in <i>Parhyale darvishi</i> (Momtazi and Maghsoudlou, 2016) based on geometric morphometric methods	
Y. Layeghi , A. Bagherian Yazdi , F. Momtazi	122
<i>Carbon sequestration by recombinant carbonic anhydrase in <i>Ralstonia eutropha</i></i>	
M. Mohsenpour, N. Amirmozafari, Z.Noormohammadi, S.Irani	138
Evaluation of morphological, phytochemical and biological activity of bracket fungi <i>Cerrena unicolor</i> collected from Arasbaran forests	
S. Mollaei, M. Ebadi	154

Journal of Applied Biology
Summer 2019

AlZahra University - Vice Chancellery for Research

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

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

Editorial Boards

F. Eftekhari, Associate Professor of Shahid Beheshti University

M. Pakravan, Associate Professor of Alzahra University

Z. Minochehr, Associate Professor of Tehran University

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

P. Ghadam, Associate Professor of Al-Zahra University

M. Seyyedi, Associate Professor of Tehran University

T. Falsafi Momughani, Professor of Alzahra University

A. Saboori, Associate Professor of Alzahra University

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Al-Zahra 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