



## مجله زیست شناسی کاربردی

زمستان ۱۳۹۹

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

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

سر دبیر: دکتر محمد رضا صعودی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دبیر تخصصی: دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه

دکتر فرشته افتخار، دانشیار دانشگاه شهید بهشتی

دکتر مهناز اقدسی، دانشیار دانشگاه گلستان

دکتر منیژه پاکروان، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

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

دکتر فرشاد درویشی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر عذرا صبور، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات ژنتیک

دکتر تورج ولی نسب پوری، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

اعضای هیأت تحریریه بین المللی

دکتر حسین رجایی، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کوپینگ آلمان

دکتر شهرام شهابی، استاد، مدیر پژوهش کمپانی دارو سازی هایلند و عضو هیات علمی وابسته کالج پزشکی نچروپاتی

ساوت وست

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار فارسی و انگلیسی: بنفشه محمدی

چاپ و صحافی: انتشارات دانش نگاران اوج

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

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

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست شناسی ایران منتشر می شود.

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

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کدپستی ۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

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

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

# راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

## هدف

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

## موضوعات مرتبط با مجله

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

## قوانین نشر

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

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

- مقاله به زبان فارسی پذیرفته خواهد شد.
- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله (<http://jab.alzahra.ac.ir>) به دبیرخانه ارسال شود. مقالاتی که از طریق به جز سایت ارسال شوند، در جلسه هیئت تحریریه بررسی نخواهند شد. تمامی مراحل داوری نیز از طریق سایت مجله قابل پیگیری است.
- نگارندگان همزمان با ارسال مقاله، فرم تعهدنامه را در سایت مجله، تکمیل و پس از امضای تمام نگارندگان و اسکن فرم، آن را به همراه مقاله از طریق سایت مجله ارسال نمایند.
- در مقاله‌های ارسالی باید تمامی نکات مربوط به شیوه صحیح نگارش از جمله اصول نقطه‌گذاری، رسم جدول، شکل، نوشتن منابع و ... به دقت رعایت شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی باشد، این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد (استادان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
- به دانشجویان محترم توصیه می‌شود پیش از ارسال مقاله، از استاد راهنمای خود تقاضا نمایند که آن را مطالعه و کاستی‌های آن را رفع نمایند.
- در متن مقاله، اعداد صفر تا نه به حروف و اعداد ۱۰ به بالا به عدد نوشته شوند (به استثنای اعداد جداول، شکل‌ها، شماره منابع و شماره‌گذاری فرمول‌ها).
- در متن مقاله، علامت % با کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جداول و شکل‌ها که علامت % در سمت چپ اعداد قرار گیرد).
- در متن مقاله (به جز جداول، شکل‌ها و چکیده‌ی انگلیسی که بر اساس سال میلادی بیان می‌شوند)، 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 نام گذار (author) درج شوند، اما در متن، آنجا که برای اولین بار ذکر می شود، همراه ذکر مخفف نام گذار (به عنوان مثال. L به معنی Linnaeus) و به صورت غیر ایتالیک نوشته شوند و در صورت تکرار در متن، دیگر به نام گذار اشاره نشود. اسم نام گذار باید طبق استانداردهای مربوطه نوشته شود.

- میان کلمه و نقطه (.)، کاما (،)، علامت سوال (؟) و پرانتز ( ) فاصله نباشد و بعد از این علامت ها یک فاصله (Space) منظور شود.

- در نگارش مقاله تا حد امکان، از واژه های 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 می توان 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 همکارا (Shimi et al., 2005).

- et al. واژه ای 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 ۲۱ × ۲۹/۷ سانتی متر (A4) با حاشیه ۲/۵ سانتی متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل ها 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 می باشد. شماره هر صفحه در وسط و پایین صفحه و با قلم نازنین معمولی و فونت ۱۲ باشد.

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

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

- ابتدای هر پاراگراف به صورت تورفته (Indent) به اندازه ۱/۲۷ سانتی متر 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 می شوند.

- 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 روش ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری

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

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

۲- نام نگارندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ توپر، با ویرگول از هم جدا شوند. شماره هر نگارنده، ۱۱ توپر در سمت چپ و بالای

نام خانوادگی (به صورت superscript)، درج علامت ستاره (\*) در سمت راست و بالای (superscript) نام نگارنده مسئول

مکاتبه، انگلیسی: ۹ توپر با ویرگول از هم جدا شوند. قبل از آخرین نگارنده از حرف ربط and استفاده شود. شماره هر نگارنده در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)،

۳- آدرس نویسندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ نازک، انگلیسی: وسط چین، ۹ نازک در 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، به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.

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

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

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

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

- نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها

- استفاده از جدول و شکل تنها هنگامی مجاز است که نتوان اطلاعات به دست آمده (نتیجه) را به راحتی بیان کرد. عنوان جدول و شکل باید گویا باشد به نحوی که نیاز به مراجعه به متن مقاله نباشد. علائم اختصاری یا زیرنویس‌ها در پایین جدول یا شکل معرفی شوند.

- داده‌ها یا بصورت جدول و یا شکل نمایش داده شوند، یعنی داده‌هایی نباشند که به هر دو صورت شکل و جدول ارائه شوند. - شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند، بصورت سیاه و سفید، با بافت ساده طراحی و شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند، بدون سایه و با کیفیت بالا، ارسال شوند.

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

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

- جدول 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 صفحات مقاله، عنوان کتاب. ناشر

(کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ).

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

- خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور.

Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005) Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – peroxidase activity of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia.

-گزارش علمی مستخرج از طرح تحقیقاتی: نام خانوادگی، نام، سال انتشار، عنوان پروژه تحقیقاتی. ذکر سالیانه یا نهایی بودن گزارش، نام موسسه تحقیقاتی، تعداد صفحات.

Shimi, P. (2003) Management of *Cynanchum acutum* in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institute of Plant Protection 25 Pp.

-منابع 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/micheltmore/projectssummary.htm>. Accessed August 23, 2001.

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

تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

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

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

اثر بازدارندگی و مکانیسم نانو ذرات نقره در کنترل رشد اگروباکتریوم رایزوژنز پس از همکشتی و انتقال ژن به توتون  
مصطفی خوشحال سرمست، حسن صالحی ..... ۹

تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بادرنجبویه بهشهر  
سید علی رضایی جمنانی، علی میرابی ..... ۲۶

ارزیابی تنش آلوپاتیک بقایای اویارسلام (*Cyperus esculentus*) بر برخی از علف‌های هرز مهاجم  
ابوذر سعیدی پور، ابراهیم غلامعلی پور علمداری، عباس بیابانی، زینب اورسجی، علی نخزری مقدم ..... ۴۲

بررسی ریخت شناسی و ریزریخت شناسی برگ گونه های *Anemone L.* و *Pulsatilla Mill.* (Ranunculaceae) در ایران  
محدثه شجاعی، فریبا شریف نیا، مصطفی اسدی، ایرج مهرگان ..... ۶۱

بررسی تغییرات ساختار و تجمع پذیری هموگلوبین انسان در حضور سم کارتاپ  
مهديه عمادی، پروانه مقامی، خاطره خرسندی، رضا حسین زاده ..... ۸۰

تاثیر تنظیم کننده های رشد بر عمر گلجایی، برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گل شاخه بریده رز  
(*Rosa hybrida L. cv. Royal Bacara*)  
مژده فرازمندی، عباس میرزاخانی، نورعلی ساجدی، مسعود گماریان، محمد نصری ..... ۹۶

تاثیر پیش تیمار کربنات کلسیم در دماهای مختلف بر کاهش سمیت سولفات مس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus*  
*carpio* Linnaeus, 1758)  
اکرم قاسم زاده، معصومه بحر کاظمی ..... ۱۱۳

بررسی فلور، شکل زیستی، پراکنش جغرافیایی و دانش بومی گیاهان دارویی تفت  
امیرعباس مینایی فر، سعیده دهقانپور فراشاه، سعیده سادات میرزاده واقفی ..... ۱۳۱

تأثیر تیمار نانو ذرات نقره بر برخی پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گلرنگ

عارفه محمدی سنجانی، منیر حسین زاده نمین، منا صراحی نوبر..... ۱۴۹

الگوی انتشار گلابی وحشی (*Pyrus spp.*) در جنگل های استان کرمانشاه

علی اصغر زهره وندی، خسرو ثاقب طالبی..... ۱۶۵

## اثر بازدارندگی و مکانیسم نانوذرات نقره در کنترل رشد اگروباکتریوم رایزوژنز پس از همکشتی و انتقال ژن به توتون

مصطفی خوشحال سرمست<sup>۱</sup>، حسن صالحی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

### چکیده

هنوز تأثیر احتمالی نانوذرات نقره در کمک به فرایند انتقال ژن در گیاه از طریق اگروباکتریوم مورد توجه قرار نگرفته است. در تحقیق حاضر نشان داده می‌شود که رشد اگروباکتریوم در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره هم در شرایط رشد دینامیک و هم محیط کشت جامد LB سرکوب می‌شود اما پس از همکشتی قطعات برگ توتون با *A. rhizogenes* کنترل رشد مجدد این باکتری به طور موثری نیازمند غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره است. استفاده از غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره و بالاتر باعث آسیب به بافت برگ می‌گردد و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در کنترل کامل باکتری پس از همکشتی موثر عمل نمی‌کند. بدین منظور مصرف همزمان نانوذرات نقره و سفوتاکسیم با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که استفاده از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره به همراه ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث کمترین آسیب به برگ و بیشترین درصد باززایی گردید و این روش کاربرد نه تنها باعث کاهش سمیت عناصر سنگین می‌شود بلکه باعث می‌شود از مصرف غلظت‌های بالای آنتی بیوتیک طی انتقال ژن اجتناب نماییم. نتایج میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که نانوذرات نقره می‌تواند رشد اگروباکتریوم را با چسبیدن به دیواره باکتری و نفوذ به درون سلول باکتری و اختلال در کار اندامک‌های مختلف متوقف نماید. نتایج بدست آمده از این آزمایش می‌تواند راه را برای استفاده از نانوذرات نقره با قطر کمتر برای توقف رشد مجدد باکتری طی انتقال ژن در گیاهان مختلف هموار نماید.

**واژه‌های کلیدی:** اگروباکتریوم رایزوژنز، توتون، مهندسی ژنتیک، میکروسکوپ الکترونی.

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

\* (نویسنده مسئول: mkhsarmast@gau.ac.ir)

۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

## مقدمه

واژه‌ی فناوری "نانو" اولین بار در یک سخنرانی با عنوان "وجود فضاهای زیادی در پایین دست" به وسیله یک فیزیکدان به نام ریچارد فینمن (Richard Phillips Feynman) در گردهمایی جامع فیزیک آمریکا در انیستیتو فناوری کالیفرنیا در ۲۹ دسامبر سال ۱۹۵۹ مطرح شد که به معنی فناوری با مواد در اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. نانو برگرفته از یک واژه‌ی یونانی به معنای پاکوتاه یا بسیار کوچک است. امروزه نانوزیست فناوری (Nanobiotechnology) یا زیست‌نانو فناوری (Bionanotechnology) به ترتیب اشاره به کاربرد فناوری نانو در رشته زیست فناوری و کاربرد زیست فناوری در حوزه فناوری نانو دارد (سرمدست و صالحی، ۲۰۱۶). فناوری نانو به جزء جدایی ناپذیری از صنایع پزشکی، کشاورزی، الکترونیک، پوشاک، صنایع بسته‌بندی و غیره تبدیل شده است و یکی از فناوری‌های بسیار پیشرفته‌ای است که به وسیله بشر به وجود آمده است.

(Kmari et al., 2008, Arora et al., 2008) نانومواد و نانوماشین‌ها به شدت در حال استفاده و رشدند. تولید نانوذرات طلا و نقره به کمک گیاه به یک گزینه منطقی برای کنترل مالاریا به عنوان یک ابزار دوستدار طبیعت مطرح شده است (Benelli, 2016). در طبیعت نقره به فرم مونووالنت همراه با سولفید، بیکربنات یا سولفات یا به صورت پیچیده‌تر با کلریدها و سولفات‌های جذب شده بر روی مواد ویژه در حالت مایع دیده می‌شود. پس از تولید پنسیلین در سال ۱۹۴۰ کاربرد ضد میکروبی نقره کاهش یافت، اما مجدداً در سال ۱۹۶۰ به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم به پنسیلین مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات دارای نمک نقره برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله اعتیاد به نیکوتین، صرع، بیماری‌های عفونی شامل سفلیس و سوزاک استفاده می‌شد (Marshall & Schneider, 1977). استفاده از سولفادیازین نقره در ناحیه‌ی سوخته شده برای جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی کاربرد دارد (Klasen, 2000). در زمینه‌ی کشاورزی بیشترین کاربرد نانوذرات نقره مربوط به ترکیبات ضد میکروبی و کاربرد تغذیه‌ای می‌شود. قارچ‌ها و باکتری‌های درونی از جمله موانعی هستند که استقرار گونه‌های گیاهی به خصوص گونه‌های چوبی را با مشکل مواجه می‌سازند (سرمدست و همکاران، ۲۰۱۱). کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های متداول و مواد شیمیایی با اثر سمی منجر به توقف رشد گیاه می‌شوند (Dodds & Roberts, 1981). علاوه بر این موارد، قرار گرفتن طولانی مدت بافت گیاه در معرض این ترکیبات، خطر تولید باکتری‌های مقاوم را افزایش می‌دهد (Falkiner, 1990). به عنوان مثال ویژگی سمیت آنتی بیوتیک‌های ریفامپسین، کربنسین، استرپتومایسین در گل‌های کلماتیس، دلفنیوم، هوستا، زنبق و همچنان فوتینیا آشکار شده است (Leifert et al., 1992). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها ممکن است در کنترل آلودگی میکروبی و به عنوان عامل گزینش در مطالعات گزینش سلول‌های تراریخت موثر باشد اما ممکن است اثرات منفی در محدودیت باززایی ریز نمونه‌ها و پایداری ژنتیکی آنها ایجاد نماید (Teixeira da Silva et al., 2003). پرآوری و ریشه‌زایی گیاهان دلفنیوم به وسیله‌ی آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت شاخساره متاثر شده است (Leifert et al., 1992). بنابراین استفاده از نانومواد به ویژه آنهایی که دارای فعالیت ضد میکروبی، پایداری دمایی

بالا و قابلیت تبخیر پایین باشند برای گندزدایی و استقرار ریز نمونه‌های گیاهی قابل کاربرد خواهند بود. اولین گزارش استفاده از نانوذرات نقره در کنترل آلودگی میکروبی بر روی گیاه علفی سنبل‌الطیب به وسیله ابدی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد.

انتقال ژن با واسطه‌گری آگروباکتریوم به‌طور معمول با رشد دوباره باکتری‌های مایه‌زنی شده با ریز نمونه پس از هم‌کشتی مواجه است. عدم حذف این باکتری‌های اضافی و جلوگیری از رشد مجدد آنها که می‌تواند منجر به مرگ ریز نمونه گردد، یکی از موانع مهم انتقال ژن با واسطه‌گری آگروباکتریوم محسوب می‌شود. استفاده از آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، کربنسلین، تاپمنتین، مروپنین و غیره برای کنترل رشد دوباره باکتری مرسوم است. اما با این حال برخی از پیامدهای منفی ناشی از استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اثر سمیت، کاهش رشد گیاه و ممانعت از باززایی در کنار قیمت بالای بسیاری از آنها نیز گزارش شده است و قرار گرفتن طولانی مدت ریز نمونه با این مواد، خطر تولید باکتری‌های مقاوم را نیز بالا می‌برد. یک عقیده کلی در رابطه با آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد که آنها بایستی پایدار و به‌راحتی قابل حل باشند، بایستی تحت تاثیر pH و نوع محیط کشت قرار نگیرند و بر روی گستره‌ی وسیعی از باکتری‌ها خاصیت کشندگی داشته باشند. یک آنتی بیوتیک خوب بایستی قابلیت آمیخته شدن با دیگر ترکیبات را داشته و برای انسان سمیت نداشته و ارزان باشد و منجر به القاء مقاومت به باکتری نگردد. اگرچه که آنتی بیوتیک‌هایی با تمام این ویژگی‌ها شاید در دسترس نباشد. اشاره شده است که آنتی بیوتیک‌های با پایه بتا لاکتام مانند سفوتاکسیم قادر به توقف سنتز دیواره‌ی سلولی از طریق اتصال به پپتیدوگلیکان ترانسپپتیداز و لیز نمودن سلول است.

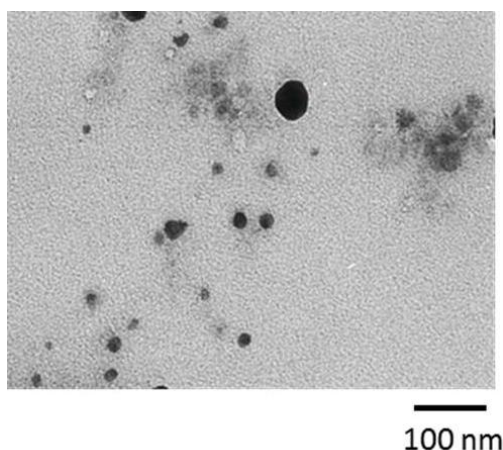
(Selwyn et al., 1980). تعداد قابل توجهی از گزارشات در رابطه با اثر بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های کربنسلین و سفوتاکسیم (از دسته بتا لاکتام) بر رشد سلول‌های گیاهی، رویان‌زایی و اندام‌زایی برخی گیاهان علفی و چوبی مانند پرتقال موجود است (Ogawa & Mii, 2005). در رابطه با گیاهان چوبی، اثر آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام در رشد و مورفوزن ریز نمونه به‌طور گسترده مورد بررسی قرار نگرفته است. da Silva و همکاران (2003) گزارش نمودند که سفوتاکسیم طی انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم رشد شاخساره پرتقال را در شرایط درون شیشه‌ای کاهش می‌دهد. تماس طولانی مدت آنتی بیوتیک با ریز نمونه نه تنها احتمال خطر سوختگی ریز نمونه را بالا می‌برد بلکه در طولانی مدت، خطر تولید باکتری‌های مقاوم افزایش خواهد یافت. این ایجاد مقاومت به احتمال زیاد با سازوکار منفرد توقف سنتز دیواره سلولی باکتری مربوط خواهد بود. این مقاومت باکتریایی طی سال‌های اخیر به دلیل گسترش سویه‌های مقاوم افزایش یافته است (Thomas & Broadbridge, 1972). درجه‌ی بالایی از مقاومت به کربنسلین در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* مشاهده شده است. کاربرد نانوذرات نقره به دلیل سازوکار عمل متفاوت آنها یکی از گزینه‌ها است. علاوه بر اثر ضد میکروبی این ترکیبات، اثر مثبت نقره در رشد و نمو گیاه نیز پیش‌تر گزارش شده است (Parimalan et al., 2011, Wang et al., 2013b, Gupta et al., 2018). افزایش فعالیت شیمیایی نانوذرات تا حد زیادی مربوط به ساختار سطحی کریستالوگرافی و داشتن سطوح بالاتر نسبت به حجم است که اجازه می‌دهد

مقادیر بیشتری از اتم با محیط اطرافش در تماس باشد (Wijnhoven *et al.*, 2009). یون‌های نقره با گروه‌های سولفیدریل (-SH) پروتئین‌ها برهمکنش و رشد باکتری را از طرفی با توقف فعالیت آنزیم‌های تنفسی و اجزاء زنجیره‌ی انتقال الکترون متوقف و عمل DNA را دچار اختلال می‌کند (Bragg & Rannie, 1974, Batarseh, 2004, Wang *et al.*, 2013b)، همچنین برهمکنش آنها با باندهای هیدروژنی آشکار شده است. هدف این پژوهش بررسی مقدماتی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در دو محیط مایع و جامد بر توقف رشد آگروباکتریوم رایزوزنز و تومافشینس و استفاده از نانوذرات نقره و سفوتاکسیم برای کنترل رشد دوباره‌ی آگروباکتریوم رایزوزنز پس از همکشتی آن با توتون طی انتقال ژن می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### ویژگی‌های نانوذرات نقره

متوسط اندازه نانوذرات استفاده شده در این مطالعه ۱۸/۵ نانومتر بود. شکل ۱ مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی ذرات نانو نقره است. نانوذرات نقره به فرم کلوئید و با غلظت مشخص از شرکت Qtechnano هند خریداری شد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM

### آزمایش باکتری کشی

برای ارزیابی حداقل غلظت نانوذرات که باعث کاهش و توقف رشد باکتری می‌شود از دو باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه K599 و *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 استفاده شد.

### کشت در محیط مایع

در این آزمایش رشد دو باکتری در محیط دینامیک (مایع) LB (تریپتون ۱۰ گرم در لیتر، کلرید سدیم ۵ گرم در لیتر و عصاره‌ی مخمر ۵ گرم در لیتر) در حضور مقادیر متفاوتی از نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. آگروباکتریوم رایزوزنز و تومافشینس به‌طور جداگانه در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب محیط LB حاوی ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات

رشد داده شدند (مقدار  $2 \times 10^8$  واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) از کشت مایع LB با غلظت ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به هر لوله‌ی آزمایش برای شروع کشت اضافه شد). میزان رشد و غلظت باکتری با ۵ وقفه‌ی ۵ ساعته در طول موج ۶۰۰ نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ی فاقد نانوذرات نقره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود.

### کشت در محیط جامد

در این آزمایش مقادیر  $10^5$  واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU) از اگروباکتریوم رایزوزنز و تومافشینس بر روی محیط جامد LB با ۱۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند. به این محیط‌های کشت مقادیر متفاوتی از نانوذرات نقره (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) افزوده شد. پتری‌دیش‌های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و تعداد کلونی‌های رشد یافته پس از ۴۸ ساعت شمارش شدند (هر تکرار حاوی سه پتری دیش بود و میانگین آنها محاسبه گردید).

### آنالیز TEM

برهمکنش اگروباکتریوم رایزوزنز با نانوذرات نقره به کمک میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور باکتری‌ها در محیط مایعی دارای ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره برای ۳ ساعت رشد داده شدند (در روی شیکر با دور ۱۵۰ RPM و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد). برای شروع رشد مقدار  $10^8$  CFU از باکتری مایع به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB اضافه شد. پس از ۳ ساعت، نمونه به سرعت و به مدت کوتاه سانتریفیوژ شد و رونشین دور ریخته شد. ته‌نشین باقی مانده با گلوترآلدئید ۴ درصد ثابت شد. پس از طی نمودن روش‌های نرمال مانند شستشو، آبگیری، اینفیلتریشن و جایگیری نمونه در رزین و پلیمریزه نمودن نمونه، نمونه را به کمک دستگاه اولترامیکروتوم برش (قطر مقطع برش داده ۶۰ نانو متر بود) دادیم و پس از رنگ آمیزی خشک نمودیم و بر روی گرید مسی پوشیده از کربن برای ورود به دستگاه میکروسکوپ الکترونی قرار دادیم. ولتاژ استفاده شده ۱۰۰ کیلو ولت و نوع دستگاه فیلیپس بود.

### انتقال ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم رایزوزنز

#### سویه باکتری و حامل دوتایی

در این آزمایش تنها از *A. rhizogenes* سویه K599 دارای پلاسمید دارای حامل دوتایی PKGW7.0 که دارای پروموتور ویروسی موزائیک گل کلم و ژن گزارشگر *Gus* به عنوان نشانگر گزارشگر و ژن *nptII* (نئومایسین فسفوترانسفراز) به عنوان نشانگر گزینشگر بود استفاده شد.

## کشت باکتری و آماده‌سازی

باکتری مد نظر در محیط کشت LB حاوی ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک اسپیکتینومایسین برای گزینش کشت داده شد (در سرعت ۲۰۰ rpm به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد). سپس باکتری با سرعت ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد و دوباره در ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر محیط مایع نیم غلظت MS (Murashige and Skoog, 1962) حل شد و غلظت باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بسته به ریز نمونه استفاده شده در محدوده ۰/۱ تا ۰/۸ تنظیم شد و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون پیش از مایه زنی به آن افزوده شد.

## انتقال ژن و تیمار نانوذرات نقره در مرحله همکشتی

رقم Samsun از توتون برای تست انتقال ژن استفاده شد. برای این منظور برگ‌های کاملاً نمو یافته‌ی توتون رشد یافته در گلخانه جدا و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ‌ها ابتدا با آب استریل آبکشی شدند و با ۲/۰ درصد توین ۲۰ برای ۵ دقیقه تیمار شدند و پس از آبکشی، با کلراکس ۲۰ درصد برای ۵ تا ۶ دقیقه گندزدایی سطحی و در انتها برای چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. قطعات برگ در شرایط استریل به قطعات ۵/۰ سانتیمتر مربعی بریده شدند و با محلول باکتری آماده شده از پیش، به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه مایع زنی شدند، سپس قطعات برگ روی کاغذ صافی استریل تا حدودی خشک و برای همکشتی به محیط MS دارای ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA منتقل شدند. پس از حداکثر سه روز همکشتی، قطعات برگ مجدداً با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو شد و پس از خشک شدن به محیط دارای غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و سفوتاکسیم (جدول ۱) برای کنترل باکتری و BAP و ۷۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین برای گزینش منتقل شد. در زیر کشت‌های بعدی غلظت کانامایسین به ۱۲۰ میلی گرم در لیتر رسانده شد. شاخساره‌های نابجای تولید شده جدا و پس از فروبری سریع در ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی کشت شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و نور فلورسنت نگهداری شدند.

جدول ۱: تیمارهای ترکیبی استفاده شده برای کنترل رشد مجدد باکتری پس از همکشتی  
با اگروباکتریوم رایزوژنز

| تیمارها           | غلظت (μg/ml) |
|-------------------|--------------|
| Cefotaxime        | 200          |
| Cefotaxime        | 300          |
| Cefotaxime+ AgNPs | 150+150      |
| Cefotaxime+ AgNPs | 200+150      |
| Cefotaxime+ AgNPs | 150+200      |
| AgNPs             | 200          |
| AgNPs             | 300          |

AgNPs: نانوذرات نقره

Cefotaxime: سفوتاکسیم

## استخراج DNA از برگ توتون‌های مقاوم در برابر کانامایسین

برای استخراج DNA از روش Stange و همکاران (1998) استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت برای استخراج در نظر گرفته شد. DNAهای استخراج شده در دمای ۲۰°- سانتی‌گراد نگهداری شد. DNAهای مورد نظر روی ژل آگاروز ۱ درصد برای بررسی کیفیت DNA قرار داده شدند.

## انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای تایید تراریخت بودن گیاهان تولید شده و برای تایید عدم حضور باکتری اضافی در بافت گیاهان باززایی شده، از دو جفت آغازگر مربوط به ژن *gus* (این ژن در سازه ژنی وجود دارد) و *C58* (برای تایید عدم وجود خود باکتری در بافت) استفاده شد. اندازه پیش‌بینی شده قطعه تکثیر شده برای ژن *Gus* و *C58* به ترتیب ۸۱۱ و ۴۲۵ جفت باز می‌باشد. پس از گرفتن توالی آغازگر از سایت NCBI، این آغازگرها طراحی (جدول ۲) و به کمک نرم‌افزار تحت وب OligoCal، کیفیت و دمای اتصال آنها آشکار شد. در نهایت برای اطمینان از اختصاصی بودن آنها، هر کدام از توالی‌های پیشرو و پسرو در NCBI مورد جستجوی BLAST قرار گرفتند.

جدول ۲: اطلاعات و توالی آغازگرهای طراحی شده مربوط به ژن‌های استفاده شده در این

| مقاله      |                                                                     |
|------------|---------------------------------------------------------------------|
| نام ژن     | توالی                                                               |
| <i>c58</i> | F, 5'-CCTTGGGCGTCGTCATAC-3'<br>R, 5'-TCGTCCTCGGTTCGTTCC-3'.         |
| <i>gus</i> | F, 5'- GCAATTGCTGTGCCAGGCAG -3'<br>R, 5'- CGTGCACCATCAGCACGTTAT -3' |

حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ نانوگرم از DNA، ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰x PCR، ۰/۷ میکرولیتر از کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر پیشرو و پسرو (غلظت محلول آغازگر ۱۰ میکرومولار بود) و ۰/۳ واحد از Taq DNA polymerase (Sinnagen, Iran) بود. آمیخته‌ی حاضر پس از افزودن آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد (جدول ۳). محصول PCR به‌دست آمده روی ژل آگاروز ۱ درصد که با safe stain رنگ آمیزی شده بود با ولتاژ ۸۰ رانده شد و وضعیت نوار با استفاده از دستگاه تصویر برداری Gel Documentation System شرکت کیاژن (ساخته شده در چین) بررسی شد.

**جدول ۳: برنامه چرخه های دمایی مورد نیاز برای انجام PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر.**

| تعداد دور | مرحله         | دوره ( دقیقه ) | دما (سانتی گراد) |
|-----------|---------------|----------------|------------------|
| ۱         | واسرشت        | ۴ (دقیقه)      | ۹۴               |
|           | واسرشت        | ۳۰ (ثانیه)     | ۹۴               |
| ۳۵        | اتصال         | ۳۰ (ثانیه)     | ۵۰-۵۶            |
|           | گسترش         | ۱ (دقیقه)      | ۷۲               |
| ۱         | گسترش نهایی   | ۱۰ (دقیقه)     | ۷۲               |
| ۱         | نگهداری نهایی |                | ۴                |

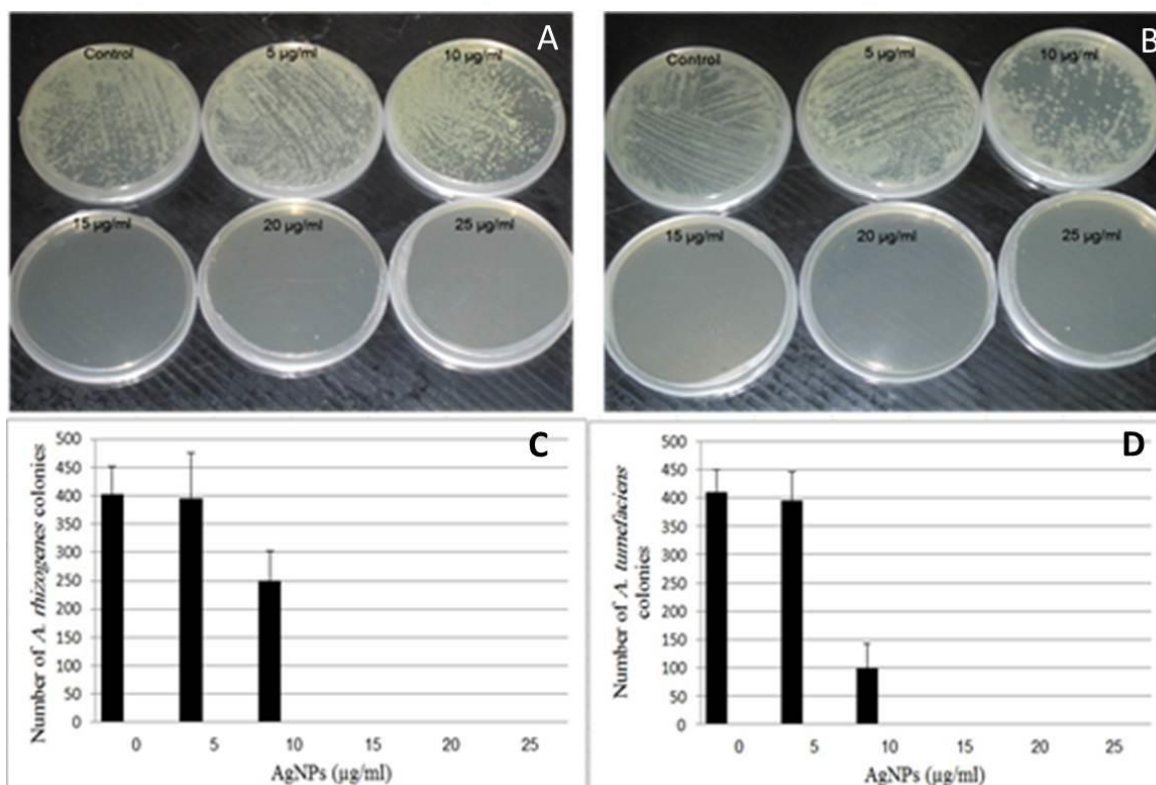
### تجزیه ی داده ها

هر کدام از آزمایشات حداقل با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. در رابطه با آزمایشات انتقال ژن در هر تکرار از ۴۰ ریز نمونه استفاده شد به این معنی که هر تیمار حداقل شامل ۱۲۰ ریز نمونه می شد. کل آزمایشات مربوط به انتقال ژن بارها تکرار شد (حداقل ۵ بار) تا نتیجه دلخواه حاصل شود. تجزیه و تحلیل داده ها عموماً با آخرین نسخه نرم افزار R (۳,۴,۲ نسخه) انجام شد.

### نتایج و بحث

#### زیست آزمون نانوذرات نقره در محیط کشت جامد

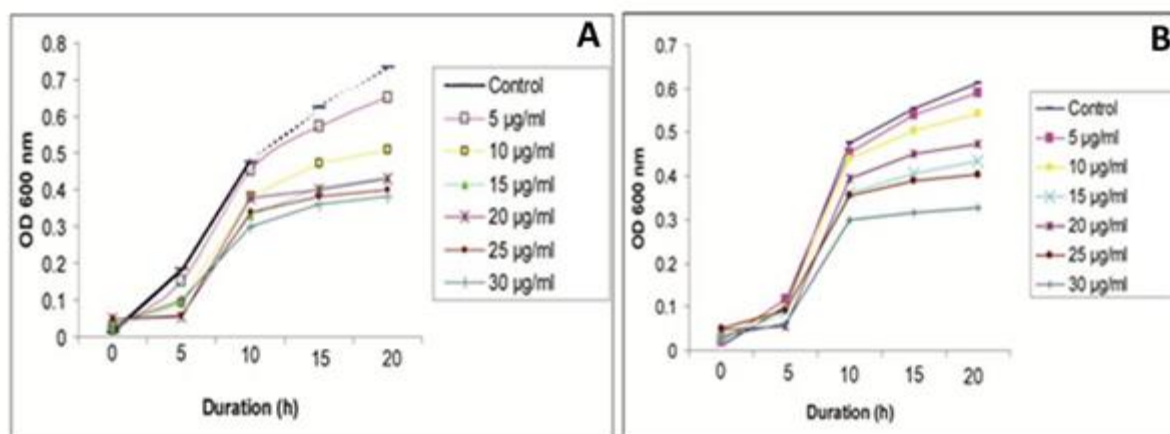
نتایج زیست آزمون نانوذرات نقره که با غلظت های مختلف در محیط جامد بر روی دو گونه مشهور اگروباکتریوم طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت در شکل ۳-۱ آمده است. نتایج نشان می دهد که هر دو گونه ی باکتری در محیط جامد LB در غلظت های بیش از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر قادر به رشد نمی باشند و این غلظت کمترین غلظت نانوذرات نقره برای کنترل این دو باکتری گرم منفی به حساب می آید. نتایج نشان می دهد زمانی که غلظت نانوذرات نقره از ۵ میکروگرم در میلی لیتر به ۱۰ می رسد میزان رشد باکتری نسبت به شاهد در مورد اگروباکتریوم تامیفشینس ۳ برابر کاسته می شود.



شکل ۲: A: باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز که در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره کشت شده است B: باکتری آگروباکتریوم تامیفشینس که در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره کشت شده است. C و D به ترتیب مربوط به نتایج کمی شده تعداد کلونی‌های رشد یافته در هر پتری می‌باشد. اعداد میانگین ۳ پتری‌دیش می‌باشد.

### زیست آزمون نانوذرات نقره در محیط کشت مایع

نتایج کشت مایع نیز از روند رشد مشابه‌ای پیروی می‌کند به شکلی که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حتی پس از گذشت ۱۵ تا ۲۰ ساعت از شروع کشت همچنان باکتری‌ها در حال رشد می‌باشند هرچند که میزان رشد باکتری‌ها در محیط فاقد نانوذرات در مورد هر دو باکتری بیشتر است. با افزایش غلظت از ۱۰ به ۱۵ و بیشتر میزان رشد به حالت خطی و ثابت در می‌آید که نشان دهنده‌ی توقف رشد باکتری‌هاست. این روند توقف رشد باکتری به خصوص ۱۰ ساعت پس از شروع کشت به شکل آشکارتری در شکل ۳ قابل مشاهده است.



شکل ۳: A: منحنی رشد اگروباکتریوم رایزوژنز در محیط کشت مایع و B: منحنی رشد اگروباکتریوم تامی فشینس در محیط کشت مایع. سمت راست هر دو شکل غلظت نانوذرات به کار رفته به صورت میکروگرم در میلی لیتر نمایش داده شده است.

#### اثر نانوذرات نقره بر سلول اگروباکتریوم رایزوژنز

بررسی‌هایی که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM بر روی اگروباکتریوم رایزوژنز که تحت تاثیر ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره تنها به مدت ۳ ساعت بود نشان از اتصال نانوذرات نقره به دیواره و نفوذ شدید این نانوذرات به درون غشاء باکتری دارند. حتی نانوذرات با قطر بیش از ۱۸ نانومتر و یا کوچکتر از آن نیز در درون سلول باکتری قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ TEM بر سلول اگروباکتریوم تامفشینس که تحت تاثیر ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره به مدت ۳ ساعت قرار داشت. مقیاس ارائه شده ۱۰۰ نانومتر است.

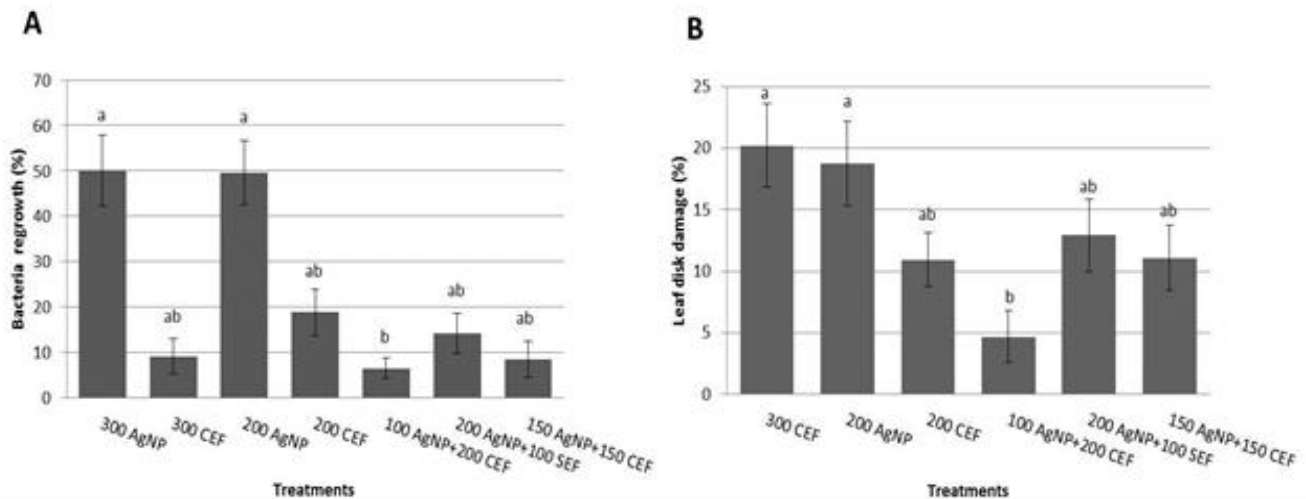
برای پرده برداشتن از چگونگی اثر نانوذرات و کاهش رشد باکتری، آزمایشی با میکروسکوپ الکترونی TEM صورت گرفت که نشان داد باکتری‌هایی که به مدت سه ساعت با نانوذرات نقره در تماس بوده‌اند به شدت از نانوذرات متاثر می‌شوند. تصاویر

بیانگر نفوذ نانوذرات به تمام قسمت‌های سلول باکتری است که به راحتی می‌توان حدس زد که نانوذرات نقره نه تنها غشاء باکتری را تخریب می‌نماید بلکه به سادگی با ماده ژنتیکی باکتری (DNA) در درون سلول و بسیاری از پروتئین‌های باکتریایی برهمکنش دارد و رشد باکتری را متوقف می‌نماید (Braydich-Stolle *et al.*, 2005, Shrivastava *et al.*, 2007). اثر نانوذرات نقره در کاهش رشد سه باکتری اشرشیاکولای، باسیلوس سابتلیس و اگروباکتریوم تامیفشینس پیش‌تر گزارش شده است (Wang *et al.*, 2012). این محققین تنها ۱۰ ساعت رشد در محیط کشت را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور کامل باعث توقف رشد اگروباکتریوم می‌شود ولی این غلظت منجر به توقف رشد دو باکتری استفاده شده در آزمایش حاضر نگردید و غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره برای توقف رشد باکتری‌ها نیاز بود. این تفاوت تا حدی می‌تواند مربوط به خصوصیات شیمیایی، پوشش و اندازه نانوذرات و شرایط کشت در این دو آزمایش باشد. در گزارشی دیگر اثر نانوذرات نقره سنتز شده در *Pseudopediastrum boryanum* بر روی رشد برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند *Listeria monocytogenes*، *Enterococcus faecalis* و گرم منفی مانند *Proteus mirabilis*، *Enterobacter aerogenes* و غیره تاثیر گذار نبود (Duygu *et al.*, 2019). در گزارشی دیگر نانوذرات سنتز شده در قارچ *Trichoderma* اثر بازدارندگی قابل قبولی در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار بر روی بیماری کنکر گوجه‌فرنگی (*Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*) داشتند (Noshad *et al.*, 2019). اثر بازدارندگی نانوذرات تولید شده به وسیله گیاهان بر روی پاتوژن‌های انسانی و غیر انسانی توسط دیگران نیز گزارش شده است (Tortella *et al.*, 2019).

### نتایج مربوط به انتقال ژن در توتون

بررسی‌های اولیه صورت گرفته برای کنترل رشد دوباره باکتری‌ها در محیط کشت پس از هم‌کشتی به طور شگفت‌آوری حاکی از غیر موثر بودن غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتری بود که در آزمایش زیست سنجی بدست آورده بودیم. بدین منظور غلظت‌های بسیار بالاتری از نانوذرات و حتی ترکیب آنها با سفوتاکسیم به عنوان یک آنتی بیوتیک معمول در انتقال ژن، مورد بررسی قرار گرفت. از طرفی غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا حدود ۵۰ درصد رشد باکتری را کاهش داد اما منجر به سوختگی برگ می‌شد. نتایج بررسی ما به صورت درصد رشد مجدد باکتری و میزان آسیب ترکیبات استفاده شده به صفحات برگ در توتون نشان داده شده است (شکل ۵). نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های بیش از ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره منجر به آسیب و سوختگی برگ می‌شود. از این رو حالت ترکیبی نانوذرات با سفوتاکسیم در نظر گرفته شد که نتایج بدست آمده نشان داد ترکیبی از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در ترکیب با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم نه تنها رشد مجدد باکتری را به شدت کاهش داد حتی ریزنمونه درصد سوختگی کمتری را نیز نشان داد. اگرچه که استفاده از ۲۰۰

و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم میزان رشد باکتری را به شدت کاهش داد ولی غلظت ۳۰۰ منجر به سوختگی برگ و غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم به تنهایی به اندازه استفاده ترکیبی نانوذرات نقره و سفوتاکسیم موثر عمل نکرد.



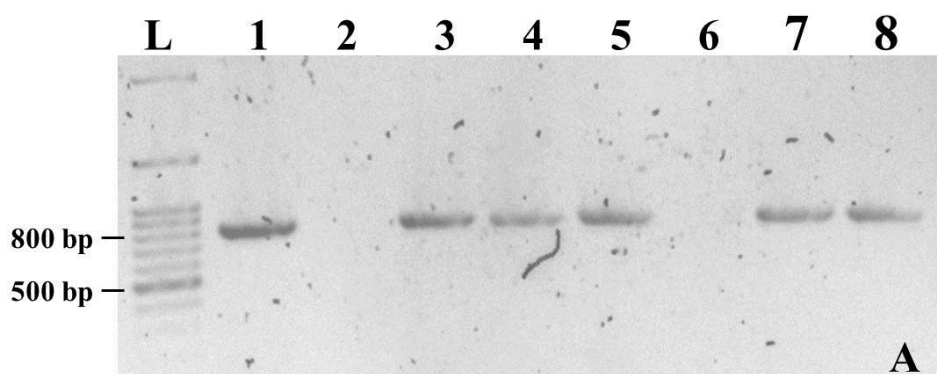
شکل ۵: اثر ترکیبی و تنه‌ای نانوذرات نقره و سفوتاکسیم افزوده شده به محیط کشت باززایی توتون پس از همکشتی با اگروباکتریوم رایزوئنز. این محیط حاوی کانامایسین برای گزینش سلول‌های تراریخت و ۲ میلی گرم در لیتر BA برای باززایی گیاهان می‌باشد. A: درصد رشد باکتری و B: درصد آسیب (به صورت درصد ریز نمونه در هر پتری دیش) به صفحات برگ توتون را نشان می‌دهد (توجه: تمام غلظت‌ها به صورت میکروگرم در میلی لیتر یا میلی گرم در لیتر است).

نتایج زیست‌سنجی به روشنی بیانگر این است که غلظت بیش از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث توقف رشد باکتری در محیط LB می‌شود اما نکته‌ی جالب این است که این غلظت نانوذرات نقره به هیچ عنوان برای توقف رشد باکتری پس از همکشتی با ریز نمونه‌های توتون کافی نبوده است. غلظت‌های بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای کنترل باز رشد باکتری طی انتقال ژن موثر نبود و غلظت‌های حدود ۲۰۰ و بالاتر اثر سمیت بر روی برگ‌های جوان و تازه‌ی توتون داشت. از نقطه نظر کاربردی مشخص شد که حالت ترکیبی نانوذرات با آنتی بیوتیک به نسبت ارزان قیمت سفوتاکسیم، منجر به نتایج به مراتب بهتری از استفاده تکی هر یک از این دو ماده ضد میکروبی می‌شود. اثرات سمیت نانوذرات نقره و سفوتاکسیم در گزارش‌های زیادی مشاهده می‌شود. در محیط کشت دارای ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم مقادیر کمتری باززایی در مقایسه با محیط ترکیبی دارای ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره مشاهده می‌شود. این اثر شاید مربوط به اثر سمیت نانوذرات بر روی سلول‌های گیاهی به‌ویژه بر روی توتون باشد که پیشتر نیز گزارش شده است (Batarseh, 2004). گزارش‌های زیادی وجود دارد که اثر نانوذرات نقره در تحریک رشد گیاه را در شرایط درون شیشه‌ای تایید می‌کند (سرمست و همکاران، ۲۰۱۵، عقدایی و همکاران، ۲۰۱۲، Wang et al., 2013)، حتی اثر مثبت سفوتاکسیم در باززایی گیاه نیز پیش‌تر گزارش شده است (Leifert et al., 2000). نتایج بدست آمده نشان داد که در همکشتی ریز نمونه‌ها

با آگروباکتریوم رایزوزنز نه تنها بافت‌ها آسیب کمتری در برگ‌های خود دیدند بلکه توقف رشد دوباره باکتری به مراتب در محیط دارای ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نانوذرات نقره بهتر بود. به نظر می‌رسد که ترکیب این دو آنتی بیوتیک در بهبود رشد توتون و توقف رشد آگروباکتریوم رایزوزنز بهتر بوده است. بایستی به این نکته توجه نمود که استفاده از آنتی بیوتیک‌های معمول که در فرایند انتقال ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد نه تنها ریسک مقاومت به باکتری را به دلیل وجود یک سازوکار عمل، بالا می‌برند بلکه ممکن است قابلیت باززایی ریز نمونه و توانایی ریشه‌زایی آن را تا حد زیادی متاثر نمایند. پژوهشگرانی اعلام کرده‌اند که برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به شدت باززایی شاخساره و به‌ویژه تشکیل ریشه را متاثر می‌نمایند (da Silva *et al*, 2003). به نظر می‌رسد کاربرد همزمان دو ترکیب ضد باکتری با نصف غلظت، بسیار موثرتر از استفاده هر کدام به تنهایی می‌باشد.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تایید تراریختی گیاهک‌های توتون

از میان گیاهک‌های باززایی شده در محیط دارای نانوذرات نقره و سفوتاکسیم، آنهایی که در محیط گزینشی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین (به دلیل وجود ژن نشانگر گزینشگر *NPTII*) قادر به رشد بودند به صورت تصادفی DNA استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک دو آغازگر *gus* و *c58* انجام شد. نتایج بدست آمده (شکل ۶) نشان از تکثیر قطعه ۸۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *gus* دارد که در پلاسמיד LBA4404 وجود دارد اما هیچ اثری از تکثیر قطعه ۴۲۵ جفت بازی که نشان از وجود آلودگی با خود باکتری در بافت است، دیده نمی‌شود.



شکل ۶: نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به تایید تراریختی توتون با ژن *gus*. L مربوط به نشانگر بیولوژیک. لاین ۱ مربوط به کنترل مثبت مربوط به ژن *Gus* که از خود باکتری به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. ستون‌های ۲ مربوط به محصول PCR ژن *C58* و ستون‌های ۳ تا ۸ مربوط به ۶ گیاهی بود که به صورت تصادفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک آغازگرهای ژن *Gus* برای تایید تراریختی بر روی آنها انجام شد.

در مجموع نتایج شفاف این تحقیق نشان می‌دهد که رشد آگروباکتریوم در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره هم در شرایط رشد دینامیک و هم محیط کشت جامد LB سرکوب شد اما پس از همکشتی قطعات برگ توتون با *A. rhizogenes*، کنترل رشد مجدد این

باکتری به طور موثری نیازمند غلظت‌های بالاتری از نانوذرات نقره بود. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر نانوذرات نقره باعث آسیب به بافت برگ می‌گردد و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در کنترل کامل باکتری پس از همکشتی موثر عمل نمی‌کند. بدین منظور مصرف همزمان نانوذرات نقره و سفوتاکسیم با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که استفاده از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم باعث کمترین آسیب به برگ توتون شده و میزان رشد مجدد باکتری را در حد قابل قبولی کاهش داده است. این روش کاربردی نه تنها باعث کاهش سمیت عناصر سنگین می‌شود بلکه باعث می‌شود از مصرف غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک طی انتقال ژن اجتناب نماییم. به طور کلی کاربرد نانوذرات به ویژه نانوذرات نقره همیشه حساسیت‌هایی را در میان دوستداران محیط زیست بوجود آورده است (Hoet *et al.*, 2004) ولی به هر حال این سوال مطرح است که آنتی‌بیوتیک‌های دیگر حاصل مصرف انسان و کارخانجات نیز حتی به شکل گسترده‌تری به محیط زیست آسیب وارد می‌کنند. مطالعه برهمکنش بین نانوذرات نقره و بسیاری از مولکول‌های زیستی در طبیعت آشکار نیست و نیازمند مطالعات طولانی مدت برای شناخت بیشتر این ترکیبات و تجمع آنها در سلول‌های زنده است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه شیراز برای ارائه خدمات و تجهیزات سپاسگزاری می‌کنند. منابع مالی این طرح به وسیله دانشگاه گرگان و منابع مالی مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی با حمایت مالی دانشگاه شیراز و پروفسور حسن صالحی فراهم شده است. این مقاله مستخرج از طرح داخلی مصوب به شماره ۵۱-۳۹۳-۹۷ و گرنت مصطفی خوشحال سرمست در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان می‌باشد.

## منابع

- Abdi, Gh., Salehi, H., Khosh-Khui, M. (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 709–714.
- Aghdaei, M., Salehi, H., Sarmast, M. (2012) Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem, micropropagation. *Advances in Horticultural Science* 2: 21-24
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179: 93–100.
- Batareseh, K.I. (2004) Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelating with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 546–548.
- Benelli, G. (2016) Plant-mediated synthesis of nanoparticles: A newer and safer tool against mosquito-borne diseases? *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6: 353–354.
- Bragg, P.D and Rannie D J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *E. coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 883–889.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M-C. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological sciences*, 88:412-419

- da Silva, J.A.T., Nhut, D.T., Tanaka, M., Fukai, S. (2003) The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulturae*, 97:397-410
- Dodds, J., Roberts, L. (1981) Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures. *In Vitro* 17(6):467-470
- Duygu, D.Y., Erkaya, A., Yalcin, B.M. (2019) Characterization of silver nanoparticle produced by *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E. Hegewald and its antimicrobial effects on some pathogens. *Inter. Env. Sci. Tech.* 1-10. doi.org/10.1007/s13762-019-02315-5.
- Falkiner, F. (1990) The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Int. Soc. Plants tiss. Newsletter* 60:13-23.
- Gupta, S.D., Agarwal, A., Pradhan, S. (2018) Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161: 624–633.
- Hoet, P.H., Bröske-Hohlfeld, I., Salata, O.V. (2004) Nanoparticles—known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1):12
- Klasen, H.J. (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26: 117–130.
- Kumari, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M., John, G. (2008) Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials*, 7: 236–241.
- Leifert, C., Waites, B., Keetley, J.W., Wright, S.M., Nicholas, J.R., Waites, W.M. (2000) Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 149–155.
- Leifert, C., Cammota, H., Waites, W.M. (1992) Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29: 153–160.
- Marshall, J.P. and Schneider, R.P. (1977) Systemic argyria secondary to topical silver nitrate. *Archives of Dermatological Research*, 133: 1077–1079.
- Noshad, A., Igbal, M., Folkers, L., Hetherington, C., Khan, A., Numan, M., Ullah, S. (2019) Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles (AgNPs) Synthesized from *Trichoderma Harzianum* against *Clavibacter Michiganensis*. *Journal of Nanotechnology Research*, 58.10-19
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Ogawa, Y. and Mii, M. (2005) Evaluation of 12  $\beta$ -lactam antibiotics for AMT through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. *Plant cell reports*, 23:736-743
- Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. (2011) Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105:285–290.
- Sarmast, M.K., Niazi, A., Salehi, H., Abolmoghdam, A. (2015) Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121(1):227-236
- Sarmast, M.K., Salehi, H., Khosh-Khuim M. (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica* 62(4):477-484

- Sarmast, M.K. and Salehi, H. (2016). Silver Nanoparticles: An Influential Element in Plant Nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology*, 58:441–449
- Selwyn, S., Lacey, R.W., Bakhtiar, M. (1980) The beta-lactam antibiotics: penicillins and cephalosporins in perspective. Hodder and Stoughton
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007) Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18(22):225103
- Stange, C., Prehn, D., Arce-Johnson, P. (1998). Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 1–8.
- Teixeira da Silva, G.A., Duong, T., Michi, T., Seiichi, F. (2003). The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulturae*, 97, 397–410.
- Thomas, A. and Broadbridge, R. (1972) The nature of carbenicillin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 70(2):231-241
- Tortella, G., Navas, M., Parada, M., Duran, N., Seabra, AB., Hoffmann N. (2019) Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of Weeds and Optimized by Response Surface Methodology to the Control of Soil Pathogenic Bacteria *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19:148-156.
- Wang, C., Wang, L., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, J. (2012) Toxicity effects of four typical nanomaterials on the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Earth Sciences* 65(6):1643-1649
- Wang, F., Cui, X., Sun, Y., Dong, C-H. (2013a) Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant cell reports* 32(7):1099-1109
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J.L., Colvin, V.L., Braam, J., Alvarez, P.J. (2013b) Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations. *Environmental science & technology* 47(10):5442-5449
- Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., (2009) Nano-silver -a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3:109-138.

## **Inhibitory effects and mechanism of Silver nanoparticles in control of *Agrobacterium rhizogenes* growth after co-cultivation and genetic transformation in Tobacco**

M. K. Sarmast<sup>1\*</sup>, H. Salehi<sup>2</sup>

Received:2020.1.22

Accepted:2020.9.6

### **Abstract**

Potential influence of AgNPs on plant genetic transformation through *Agrobacterium* has not yet been addressed. Here we showed that the growth of *Agrobacterium* was suppressed in 10 µg/ml AgNPs but controlling the overgrowth of these bacteria would effectively necessitate a higher concentration of AgNPs when tobacco explants have inoculated with *A. Rhizogenes*. Research results indicated that applying more than 150 µg/ml AgNPs and more, resulted in leaf injury and application of 100 µg/ml of AgNPs was unable to suppress bacteria regrowth after co-cultivation with tobacco leaves. The concurrent application of the AgNPs and Cefotaxime with different concentrations were investigated. The results indicated that using 100 µg/ml of AgNPs along with 200 mg/l of cefotaxime lead to the lowest leaf injury and the highest regeneration potential. This application not only caused a reduction in heavy metal toxicity but also decreased excess concentrations of antibiotics during the course of transformation. TEM manifested that the AgNPs could suppress *Agrobacterium* growth by potentially anchoring to and penetrating the bacterial cell wall. Our results show that the simultaneous use of AgNPs along with Cefotaxime can suppress the overgrowth of *Agrobacterium* during plant transformation. The results of this experiment can open a new window for application of AgNPs with lower diameter in order to suppress bacteria overgrowth.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, Electron Microscopy, Genetic engineering, Tobacco.

---

1- Assistant Professor of Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Golestan, Iran

\*(Corresponding author: mkhsarmast@gau.ac.ir)

2-Assistant Professor of Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

## تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه بهشهر

سید علی رضایی جمنانی<sup>۱</sup>، علی میرابی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

### چکیده

این تحقیق به منظور آنالیز اسانس و عصاره‌ی اتانولی و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) منطقه هزارجریب بهشهر به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتزی انجام شد. برگ گیاه از رویشگاه‌های طبیعی آن در ارتفاعات استان مازندران و در اوایل شهریور ماه جمع‌آوری شد. در این مطالعه، تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه با دستگاه GC/MS بررسی شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی با استفاده از روش DPPH بررسی و با آنتی اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید مقایسه شد. نتایج نشان داد که اجزای اصلی اسانس به ترتیب فنوکسی اتانول (۳۱/۶۶٪)، مجموع انانتیومر کاربوفیلین اکساید (۲۴/۷۱٪)، مجموع انانتیومر سیترال (۱۳/۸۹٪) و مجموع انانتیومر کاربوفیلین (۹/۸۸٪) و اجزای اصلی عصاره اتانولی به ترتیب کاربوفیلین اکساید (۲۸/۹۵٪)، ۲-هیدرازینو نیکوتینیک اسید (۱۱/۳۷٪)، فیتول (۸/۶۱٪) و بتا-کاربوفیلین (۷/۴۴٪) می‌باشند. همچنین  $IC_{50}$  عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به ترتیب ۳۹/۰۵ و ۹۸/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در روش FRAP توان احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به ترتیب ۹۱/۳ و ۱۰۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، عصاره‌ها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و توانایی احیاکنندگی هستند و می‌توانند در صنعت دارویی به کار روند.

**واژه های کلیدی:** آنتی اکسیدان، اسانس، بادرنجبویه.

### مقدمه

گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی و به طور کلی فراورده‌های طبیعی در جهان به ویژه در سال‌های اخیر رو به افزایش است. مهم‌ترین علل این گرایش را می‌توان اثرات داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مواد شیمیایی در کارخانه‌های داروسازی از سوی دیگر دانست (Martinez et al., 2001). امروزه علاقه فراوانی در استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی وجود دارد، چون آنتی اکسیدان‌های طبیعی از مشکلات سمیت ناشی از استفاده داروهای

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، گروه شیمی، قائم شهر، ایران.

۲- دانشیار شیمی تجزیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، گروه شیمی، قائم شهر، ایران

\* نویسنده مسئول: a.mirabi@qaemiau.ac.ir

شیمیایی جلوگیری می کنند و گیاهان، ترکیبات فیتوشیمیایی فراوانی دارند که منبع آنتی اکسیدان های طبیعی هستند (Kulisic et al., 2004).

بادرنجبویه یا بادرنگبویه یا وارنگبو (*Melissa officinalis*) گیاهی معطر و علفی و از راسته لب گلی ها (*Lamiales*) و تیره نعنائیان (*Lamiaceae*) است. ملیسا (*Melissa*) نام علمی بادرنجبویه است که از واژه ای یونانی، به معنای زنبور گرفته شده است، چون این گیاه محبوب زنبور عسل است. بادرنجبویه را از دوران های باستان می شناختند و در واقع اطباء ایران و عرب بودند که برای نخستین بار بادرنجبویه را به عنوان داروی قلب به کار بردند و به دنبال آن کشیش های کارتلیت در قرن ۱۷، الکلی ساختند که به نام آب بادرنجبویه معروف بود (Capecka, 2005). در قدیم عمده مصرف بادرنجبویه مربوط به خواص ضد نفخ و ضد تب آن بوده است (Lamaison et al., 1991)، و بوعلی سینا آن را در رده داروهای تقویت قلب و همچنین موثر برای تقویت نیروی حیاتی بدن دانسته است (Ministry of Health, 2002).

این گیاه بومی مناطق شرق مدیترانه و غرب آسیا است (Zargari, 1995). در ایران نیز این گیاه در نواحی گوناگون به صورت خودرو، در کنار جاده ها است. اغلب مناطقی که بادرنجبویه از آن گزارش شده اطراف تهران، کرج، کرمانشاه، جنگل گلستان، مازندران، گیلان و آذربایجان است (Hariry, 2011). مهم ترین مراکز کشت و صادرات بادرنجبویه در کشورهای لهستان، مجارستان، رومانی، یونان، فرانسه و بلغارستان می باشد (Amoee, 2009).

ساقه های گیاه بادرنجبویه چهار گوش و کمی کرکدار است و به بلندی سی تا هشتاد سانتی متر می رسند. (Haji-sharifi, 2016)

برگ های زرد مایل به سبز آن به شکل بیضی و یا قلب هستند و لبه ی آنها دندانه دندانه است و وقتی برگ ها له شوند، بوی لیمو شیرین از آنها متصاعد می شود، همچنین موجب از بین رفتن افسردگی می شود.

از مهم ترین خواص این گیاه می توان آرام بخش بودن آن را نام برد. بادرنجبویه دارای خواص نیرودهنده و ضد تشنج است، همچنین مقوی معده، بادشکن، آرام بخش، تسهیل کننده عمل هضم و معرق است و به خاطر تحریک جریان خون باعث ازدیاد ادرار و عرق می شود (Wenying et al., 2003). در درمان میگرن و هیستری مصرف می شود و اثرات ضد ویروس و آیدز نیز دارد که مربوط به کافئیک اسید و تانن موجود در آن است. از بادرنجبویه برای رفع دل پیچه های ناشی از نفخ، دردهای عصبی معده، تپش قلب، سردرد و سرگیجه، کم خونی و بیماری های تنفسی استفاده می شود. همچنین برای رفع فساد دندان مفید است و جویدن تازه آن بوی بد دهان را مرتفع می سازد و همچنین از برگ تازه آن برای رفع سوزش و درد، در محل گزش زنبور استفاده می شود (Patora & Klimek, 2002). در تحقیقات اخیر از بادرنجبویه در درمان آلزایمر نیز استفاده می شود (Rojhan, 1998). امروزه از اسانس و عصاره ی گیاه بادرنجبویه، در تهیه فراورده های دارویی استفاده می شود (Andreas et al., 1990, Heins, 1980) و همچنین اثر ضد باکتریایی اسانس بادرنجبویه بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شده است (مقتدر، ۱۳۹۲). در این

آزمایش‌ها مشخص شد که اثر اسانس گیاه بر روی باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس، اپیدرمیدیس و باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونی و اشرشیاکلی، بیشتر از اثر آنتی‌بیوتیک تتراساکلین است. با توجه به درصد بالای ترکیبات سیترونلال و کارواکرول موجود در گیاه که خواص ضدباکتریایی دارند از اسانس این گیاه می‌توان برای مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای خاص استفاده کرد (Klink, 1997). همچنین تاثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر میزان آنزیم‌های کبدی و تغییرات پاتولوژی آن در موش‌های صرعی بررسی شد که نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بادرنجبویه با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد تشنجی، می‌تواند آسیب‌های ناشی از داروهای شیمیایی را کاهش دهد و از بافت کبدی محافظت کند. تاثیر ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی بادرنجبویه نیز بررسی شد (هریزچی و فرخی، ۱۳۹۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره بادرنجبویه دارای فعالیت ضد قارچی است و مقدار  $IC_{50}$  برای عصاره بادرنجبویه  $31/25$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. تحقیق حاضر با هدف بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه برای نخستین بار در منطقه هزارجریب بهشهر انجام گرفت و همچنین ترکیب مواد متشکله اسانس و عصاره‌ی اتانولی برگ این گیاه به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) تعیین شد.

## روش کار

### تهیه‌ی گیاه

گیاه بادرنجبویه از منطقه هزارجریب در جنوب‌شرقی شهرستان بهشهر، بین ۳ استان مازندران، گلستان و سمنان با موقعیت جغرافیایی ۲۸-۳۶۰ تا ۴۰-۳۶۰ عرض شمالی و ۴۱-۵۳ تا ۹-۵۴ طول شرقی و در ارتفاع ۱۳۰۰ متری در استان مازندران در اوایل شهریور ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد و سپس برگ این گیاه جدا و در سایه و مجاورت هوا، خشک و به وسیله آسیاب‌برقی خرد شده و به صورت پودر درآمد.

### تهیه اسانس بادرنجبویه

۴۰ گرم از پودر گیاه خشک شده پس از توزین به همراه ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن ته‌گرد قرار گرفت و سپس توسط دستگاه کلونجر به مدت ۵ ساعت با سرعت تقطیر یک میلی‌لیتر در دقیقه اسانس‌گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب (Merck)، آبگیری و در ظرف دربسته تیره‌رنگ، دوراز نور و در یخچال نگهداری شد.

### تهیه عصاره ها

در دو ظرف به صورت جداگانه ۶۵۰ گرم از برگ گیاه پودر شده ریخته و سپس در یکی ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول و در دیگری ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال n-هگزانی اضافه شد و به روش خیساندن فرآیند عصاره‌گیری انجام شد. پس از گذشت شش

روز، عصاره‌ها توسط دو صافی فلزی و کاغذی، صاف شدند و سپس حلال با روتاری پرانده شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شد.

### روش تجزیه اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه توسط دستگاه GC-MS

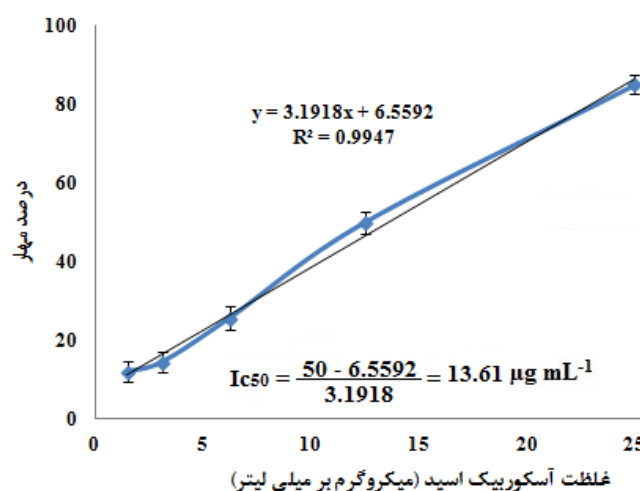
آنالیز اسانس و عصاره اتانولی برگ گیاه توسط دستگاه GC-MS از شرکت Agilent مدل Hewlett-Packard از کشور آمریکا با ستون موبینه HP-5 (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرومتر با ضخامت فاز ساکن ۰/۵ میکرومتر) در دانشکده شیمی دانشگاه آزاد قائم‌شهر انجام شد. برای این منظور پس از تزریق اسانس و عصاره اتانولی گیاه به دستگاه GC-MS، با استفاده از ضرایب بازداری هریک از اجزای تفکیک شده و طیف جرمی آنها، ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و عصاره اتانولی گیاه شناسایی شدند. دمای ستون برنامه‌ریزی شد بدین صورت که برای ۲ دقیقه ابتدایی در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  و سپس با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه دما به  $150^{\circ}\text{C}$  افزایش یافت، در ادامه دما با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به  $210^{\circ}\text{C}$  رسانده شد و برای ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد، همچنین دمای قسمت تزریق نمونه و آشکارساز به ترتیب در  $250^{\circ}\text{C}$  و  $280^{\circ}\text{C}$  تنظیم شد. از گاز هلیوم با خلوص (۹۹/۹۹۹٪) و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت استفاده شد.

### روش به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های بادرنجبویه

در ابتدا ۱۲ محلول از عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به طور جداگانه با غلظت‌های ۱۵/۷۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به حجم ۲ میلی‌لیتر تهیه شد و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH (Sigma Aldrich) با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر یک از آنها اضافه شد. برای محلول کنترل نیز به ۲ میلی‌لیتر اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه، ۲ میلی‌لیتر DPPH اضافه شد. برای اندازه‌گیری محلول استاندارد یا آنتی‌اکسیدان سنتزی (آسکوربیک اسید) و محلول کنترل در این آزمایش، از حلال اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه به عنوان شاهد استفاده شد. برای هر عصاره نیز یک محلول شاهد تهیه شد، به این صورت که به ۲ میلی‌لیتر از هر غلظتی از عصاره، ۲ میلی‌لیتر اتانول و n-هگزانی به طور جداگانه اضافه و دستگاه اسپکتروفتومتری جذبی Jenway مدل 6550، توسط آن کالیبره شد. این محلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از فرمول  $(1 - AS/AC) \times 100$  محاسبه شد. در این معادله AC جذب محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH بدون عصاره به عنوان حلال کنترل، و AS جذب محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH به همراه عصاره گیاه به عنوان نمونه می‌باشد و همچنین مقدار  $IC_{50}$  از روی رگرسیون خطی منحنی کالیبراسیون و قرار دادن عدد ۵۰ بجای Y در معادله خط بدست آمد.

## روش به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آسکوربیک اسید

محلول استاندارد این تحقیق برای غیرفعال سازی رادیکال آزاد DPPH، آنتی اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید است که با غلظت های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و به ۲ میلی لیتر از هر کدام از آن ها، ۲ میلی لیتر رادیکال آزاد DPPH اضافه گردید. این محلول ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در این روش نیز از فرمول  $(1 - AS/AC) \times 100$  برای محاسبه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آنتی اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید استفاده شد که شکل ۱ این تغییرات را نمایش می دهد.



شکل ۱: تغییرات درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت های متفاوت آسکوربیک اسید

## روش سنجش توانایی احیا کنندگی عصاره گیاه (روش FRAP)

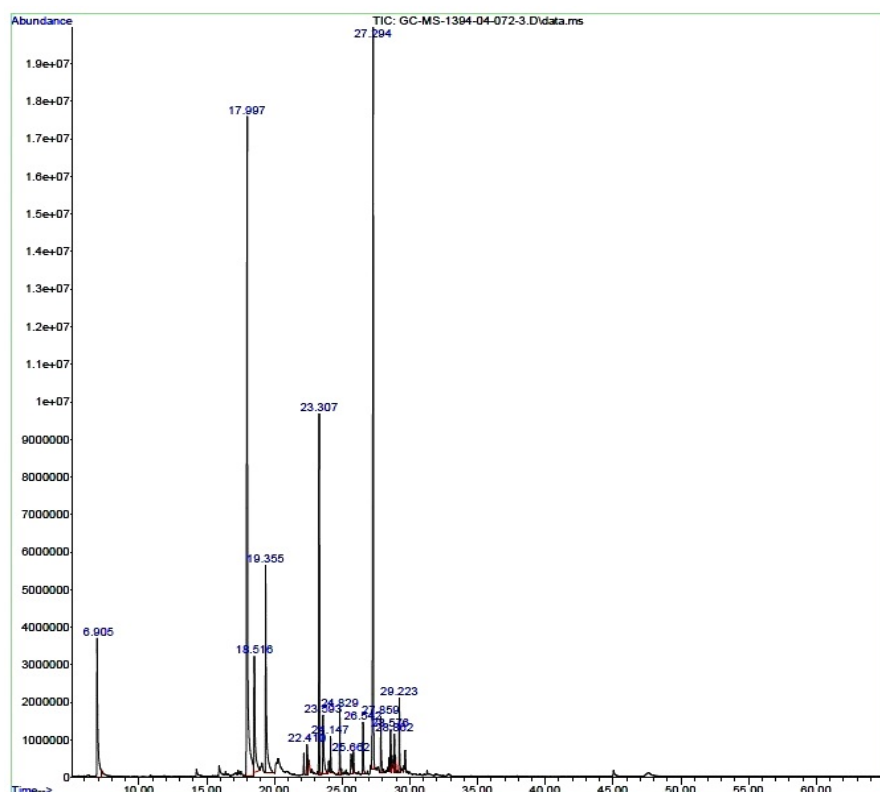
در روش FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) از رادیکال های آزاد برای تعیین پتانسیل آنتی اکسیدان ها استفاده نمی شود، بلکه فقط توانایی احیا شدن آهن فریک ( $Fe^{3+}$ ) به آهن فرو ( $Fe^{2+}$ ) توسط آنتی اکسیدان در نمونه، اندازه گیری می شود، لذا پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره یک گیاه بر علیه رادیکال های آزاد، ضرورتاً با توانایی آن ماده در احیاء آهن فریک به آهن فرو با هم برابر نمی باشند، بعبارتی در این روش میزان توان مندی عصاره گیاه در احیا کردن کاتیون های آهن سنجیده می شود و شدت رنگ آبی تولید شده، نشان دهنده قدرت احیا کنندگی عصاره اتانولی و n-هگزانی گیاه است و هر چه میزان جذب بیشتر باشد قدرت احیا کنندگی را نشان می دهد. در این روش برای تعیین محلول FRAP، به ۲/۵ میلی لیتر محلول تری پریدل تری آزین (Sigma Aldrich)، ۲/۵ میلی لیتر کلرید آهن (III) و ۲۵ میلی لیتر بافر استات با pH معادل ۳/۶ اضافه شد. سپس به ۱ میلی لیتر از هر یک از محلول عصاره های اتانولی و n-هگزانی که با غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ساخته شد، به طور جداگانه ۲ میلی لیتر محلول FRAP اضافه شد. برای تهیه محلول کنترل، ۱

میلی لیتر اتانول به ۲ میلی لیتر محلول FRAP اضافه شد. برای اندازه گیری محلول کنترل در اسپکتروفتومتر از محلول شاهد شامل اتانول و محلول FRAP بدون کلرید آهن (III) استفاده شد. برای هر عصاره نیز یک محلول شاهد تهیه شد، به این صورت که به ۱ میلی لیتر عصاره، ۰/۵ میلی لیتر محلول TPTZ (تری پری دیل تری آذین) و ۵ میلی لیتر بافر استات با pH معادل ۳/۶ اضافه و دستگاه اسپکتروفتومتر توسط آن کالیبره شد. این محلول ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب یون  $Fe^{2+}$  در طول موج بیشینه ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. همچنین تمامی اندازه گیری ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت خطای استاندارد (Sd) در نمودارها گزارش گردید.

## نتایج

### نتایج حاصل از آنالیز اسانس برگ گیاه

آنالیز اسانس استخراج شده از برگ گیاه بادرنجبویه، توسط دستگاه GC-MS انجام شد که کروماتوگرام آن در شکل ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود ۱۶ ترکیب در کروماتوگرام شناسایی شدند.



شکل ۲: کروماتوگرام حاصل از آنالیز اسانس برگ گیاه بادرنجبویه

در این آنالیز مشخص شد ترکیب فنوکسی اتانول با ۳۱/۶۶٪، بیشترین درصد ترکیبات شناسایی شده موجود در اسانس را دارا می باشد، پس از آن مجموع آنانتیومر کاریوفیلن اکساید با ۲۴/۷۱٪، مجموع آنانتیومر سیترال با ۱۳/۸۹٪ و مجموع آنانتیومر کاریوفیلن با ۹/۸۸٪ بیشترین ترکیبات شناسایی شده موجود را شامل می شوند (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس برگ گیاه بادرنجبویه

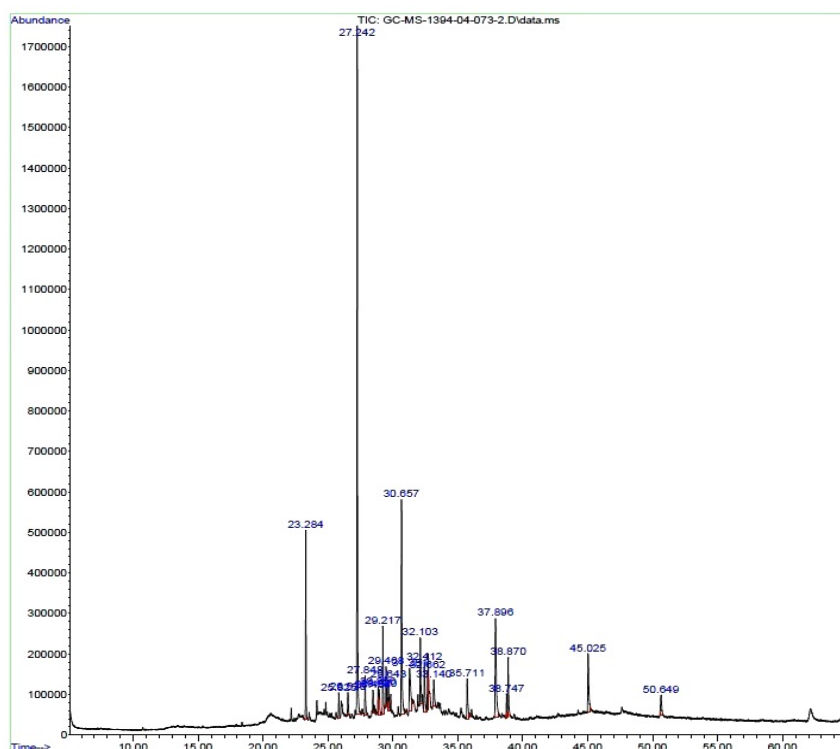
| شماره پیک | نام ترکیب                     | شاخص بازداري | درصد ترکیب |
|-----------|-------------------------------|--------------|------------|
| ۱         | Styrene                       | ۸۵۹          | ۶/۶۸       |
| ۲         | Phenoxy ethanol               | ۱۲۳۱         | ۳۱/۶۶      |
| ۳         | Cis-citral (neral)            | ۱۲۵۱         | ۵/۲۹       |
| ۴         | Trans-Citral (Geranial)       | ۱۲۸۰         | ۸/۶۰       |
| ۵         | Trans-Geraniol (lemonol)      | ۱۳۹۲         | ۱/۲۹       |
| ۶         | $\beta$ -caryophyllene        | ۱۴۲۸         | ۸/۹۱       |
| ۷         | Cyclopropanecarboxilic Acid   | ۱۴۴۰         | ۲/۹۰       |
| ۸         | $\alpha$ -caryophyllene       | ۱۴۶۲         | ۰/۹۷       |
| ۹         | (-)- Germacrene-D             | ۱۴۹۰         | ۱/۶۴       |
| ۱۰        | 2- Propionyl oxy tetra decane | ۱۵۱۰         | ۱/۶۰       |
| ۱۱        | Caryophyllene oxide           | ۱۵۶۲         | ۱/۶۴       |
| ۱۲        | Trans- Caryophyllene oxide    | ۱۵۹۴         | ۲۳/۰۷      |
| ۱۳        | Humulene epoxide II           | ۱۶۱۹         | ۱/۷۵       |
| ۱۴        | 2-norpinanol 3,6,6-trimethyl  | ۱۶۵۱         | ۱/۳۹       |
| ۱۵        | $\alpha$ - Cadinol            | ۱۶۶۳         | ۱/۱۲       |
| ۱۶        | z-hexadecen-7-yne             | ۱۶۷۸         | ۱/۹۸       |

#### تعیین درصد بازده عصاره‌ها

پس از انجام عمل عصاره‌گیری به روش خیس‌اندن، وزن عصاره‌ها تعیین شد که ۲۰ و ۱۴ گرم به ترتیب عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی به طور جداگانه از ۶۵۰ گرم از برگ گیاه پودر شده تهیه شد. راندمان استخراج عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه توسط فرمول  $100 \times (\text{گرم برگ گیاه} / \text{گرم عصاره})$  محاسبه شد و درصد بازده عصاره‌ها به ترتیب ۳/۰۸٪ و ۲/۱۵٪ به صورت وزنی-وزنی پودر خشک گیاه محاسبه گردید.

نتایج حاصل از آنالیز عصاره اتانولی برگ گیاه

آنالیز عصاره اتانولی از برگ گیاه بادرنجبویه، توسط دستگاه GC-MS انجام شد که کروماتوگرام آن در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ۲۳ ترکیب در کروماتوگرام عصاره اتانولی شناسایی شدند.



شکل ۳: کروماتوگرام حاصل از آنالیز عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه

بیشترین درصد ترکیب شناسایی شده از عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه، مربوط به ترکیب کارپوفیلن اکساید با ۲۸/۹۵٪ است، که به مقدار ۴/۲۴٪ از مجموع آنانتیومرهای کارپوفیلن اکساید شناسایی شده از اسانس، بیشتر است. پس از آن ۲-هیدرازینو نیکوتینیک اسید با ۱۱/۳۷٪، فیتول با ۸/۶۱٪ و بتا-کارپوفیلن با ۷/۴۴٪ مهمترین ترکیب شناسایی شده موجود در عصاره اتانولی برگ را تشکیل می‌دهد (جدول ۲).

#### بررسی فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط آسکوربیک اسید

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت آسکوربیک اسید، زیاد می‌شود و با توجه به اینکه معادله خط منحنی به صورت رابطه  $Y=3.1918X + 6.5592$  بدست آمد، بنابراین با قراردادن عدد ۵۰ به جای Y در معادله خط، مقدار X برابر ۱۳/۶۱ بدست آمد، که همان  $IC_{50}$  آسکوربیک اسید می‌باشد و به عنوان غلظتی از آسکوربیک اسید است که می‌تواند ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند، عبارتی هر چه مقدار  $IC_{50}$  کمتر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا توانایی مهار رادیکال آزاد عصاره بیشتر است.

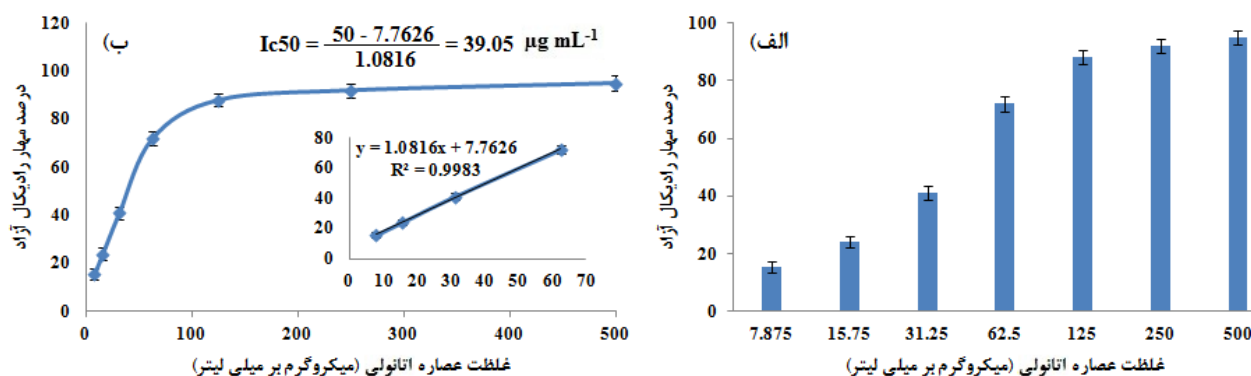
جدول ۲: ترکیب‌های تشکیل دهنده عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه

| شماره پیک | نام ترکیب                                 | شاخص بازداری | درصد ترکیب |
|-----------|-------------------------------------------|--------------|------------|
| ۱         | $\beta$ - caryophyllene                   | ۱۴۲۷         | ۷/۴۴       |
| ۲         | $\delta$ - cadinene                       | ۱۵۳۱         | ۱/۲۱       |
| ۳         | $\beta$ - Histine                         | ۱۵۶۱         | ۱/۱۶       |
| ۴         | (-) Epoxy caryophyllene                   | ۱۵۹۲         | ۲۸/۹۵      |
| ۵         | $\alpha$ - Favnesena                      | ۱۶۱۹         | ۲/۲۰       |
| ۶         | 2.4 -Dimethyl -Methanol                   | ۱۶۴۶         | ۰/۹۹       |
| ۷         | 2 - Bromoethanol                          | ۱۶۶۴         | ۱/۲۴       |
| ۸         | $\alpha$ -Calacorene                      | ۱۶۷۳         | ۱/۴۳       |
| ۹         | chembl                                    | ۱۶۸۰         | ۴/۶۸       |
| ۱۰        | 2-Methylnaphthalene                       | ۱۶۹۲         | ۱/۷۲       |
| ۱۱        | N,N – Dimethylmethane Sulfonamide         | ۱۶۹۹         | ۱/۶۹       |
| ۱۲        | 2-Hydrazino–nicotinic acid                | ۱۷۴۷         | ۱۱/۳۷      |
| ۱۳        | Loliolide                                 | ۱۷۷۷         | ۴/۳۷       |
| ۱۴        | Longi Folenaldehyde                       | ۱۸۱۷         | ۳/۴۷       |
| ۱۵        | 4-Bromo-1-naphthylamine                   | ۱۸۳۲         | ۳/۲۵       |
| ۱۶        | Neophyta diene                            | ۱۸۴۴         | ۱/۳۲       |
| ۱۷        | 2-[dimethylamino-methyl] -4- ethyl phenol | ۱۸۶۸         | ۱/۷۶       |
| ۱۸        | Palmitic acid – ethyl ester               | ۲۰۰۰         | ۲/۸۰       |
| ۱۹        | Phytol                                    | ۲۱۲۰         | ۸/۶۱       |
| ۲۰        | P - Hydroxynorephedrine                   | ۲۱۶۸         | ۱/۱۷       |
| ۲۱        | Linolenic acid                            | ۲۱۷۵         | ۳/۲۳       |
| ۲۲        | 2-(2-ethylhexoxy carbonyl)benzoic acid    | ۲۵۵۳         | ۴/۱۵       |
| ۲۳        | 3-Ethoxyamphetamine                       | ۲۸۳۰         | ۱/۷۰       |

### بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی بادرنجبویه به روش DPPH

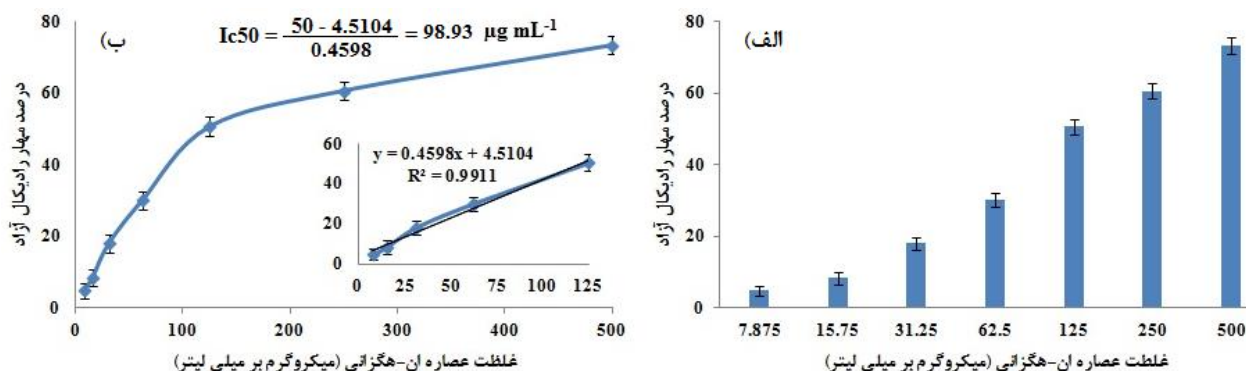
در این روش، از رنگ رادیکال آزاد (DPPH) به عنوان نشانگر استفاده شد، به این صورت که هر چه عصاره توانایی بیشتری در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH داشته باشد از شدت رنگ بنفش مخلوط، بیشتر می‌کاهد و در نهایت به سمت رنگ زرد متمایل می‌شود. مزیت مصرف DPPH، این است که در زمان کوتاهی می‌توان تعداد زیادی نمونه را اندازه‌گیری نمود و همچنین از حساسیت کافی برخوردار است. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت، تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد

DPPH دارد (شکل ۴ الف)، بطوریکه با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. شکل ۴ ب، منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت عصاره اتانولی می‌باشد و شیب تند قسمت ابتدایی منحنی کالیبراسیون به این معنی است که با افزایش اولیه غلظت عصاره، مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های اتانولی با قدرت بیشتری صورت می‌گیرد. همچنین با توجه به اینکه میزان  $IC_{50}$  معیاری برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، بنابراین محاسبه  $IC_{50}$  برای عصاره اتانولی به کمک معادله منحنی کالیبراسیون ( $Y=1.0816X+7.7626$ ) انجام گرفت که معادل  $39/05$  میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد، و این در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی آسکوربیک اسید ( $13/61$ ) قابل توجه است، با این توضیح که هرچه مقدار  $IC_{50}$  عصاره کمتر باشد، توانایی قدرت مهار بیشتری دارد.



شکل ۴: الف) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره اتانولی برگ گیاه بادرنجبویه، ب) منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره اتانولی

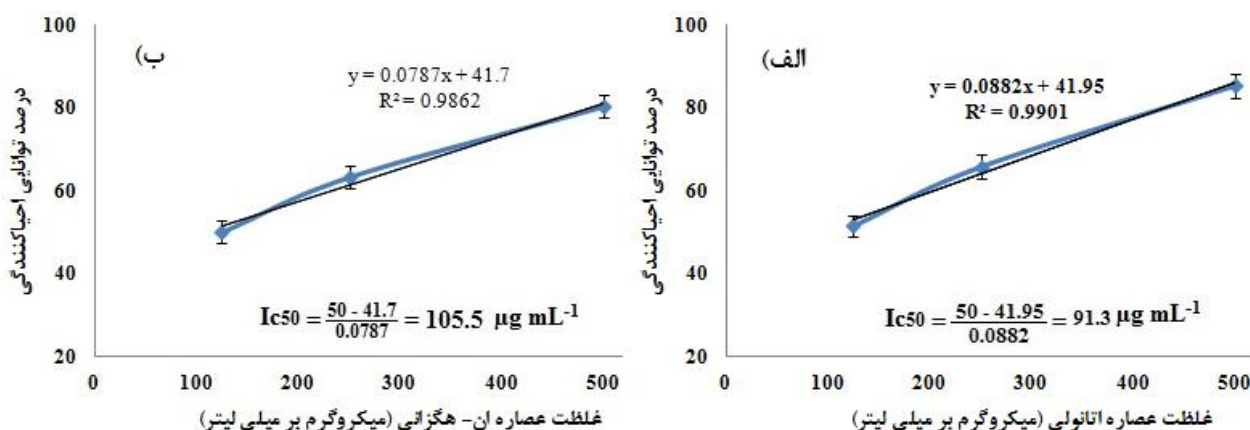
شکل ۵ الف، نیز نشانگر تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بر حسب غلظت عصاره n-هگزانی و شکل ۵ ب، منحنی کالیبراسیون درصد مهار رادیکال DPPH بر حسب غلظت عصاره n-هگزانی می‌باشد. فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های n-هگزانی نیز با افزایش غلظت افزایش یافت. همچنین میزان  $IC_{50}$  برای عصاره n-هگزانی توسط معادله منحنی کالیبراسیون ( $Y=0.4598X+4.5104$ ) معادل  $98/93$  میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره اتانولی نسبت به عصاره n-هگزانی در غلظت یکسان میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند.



شکل ۵: الف) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد توسط عصاره n-هگزان برگ گیاه بادرنجبویه، ب) منحنی کالبراسیون درصد مهار رادیکال توسط عصاره n-هگزان

#### تعیین قدرت احیاکنندگی بادرنجبویه به روش FRAP

شکل ۶ درصد توان احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و n-هگزان برگ گیاه بادرنجبویه برحسب غلظت‌های میکروگرم بر میلی لیتر عصاره را نمایش می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت عصاره، تاثیر معنی‌داری بر قدرت احیاکنندگی دارد و به کمک معادله خط، میزان  $IC_{50}$  برای هر دو عصاره محاسبه شد. توان احیاکنندگی عصاره اتانولی و n-هگزان به ترتیب ۹۱/۳ و ۱۰۵/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شدند، بعبارت دیگر عصاره اتانولی و عصاره n-هگزان با غلظت‌های فوق، توانایی احیاء ۵۰٪ از کاتیون‌های آهن را دارد، بنابراین عصاره اتانولی قدرت احیاکنندگی بالاتری نسبت به عصاره n-هگزان دارد و همچنین مقادیر  $IC_{50}$  از روی رگرسیون خطی بین درصد توانایی احیاکنندگی و غلظت‌های مربوطه بدست آمد.



شکل ۶: تغییرات درصد توانایی احیاکنندگی عصاره‌های الف) اتانولی، ب) n-هگزان برگ گیاه بادرنجبویه

## بحث و نتیجه گیری

امروزه درمان با آنتی بیوتیک ها، همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد. گیاهان دارویی با داشتن مزیت های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن، سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران، برای درمان بیماری ها از جمله عفونت ها مورد توجه قرار گرفته اند (Pino *et al.*, 2006). استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست زیرا وجود ترکیبات شیمیایی است که باعث اثر درمانی در گیاه می گردد. نتایج این تحقیق نشان داد که اجزای اصلی اسانس برگ بادرنجبویه به ترتیب کاریوفیلین اکساید، فنوکسی اتانول، سیترال و کاریوفیلین است. این ترکیبات با توجه به تأثیری که دارند مورد استفاده قرار می گیرند به عنوان مثال: کاریوفیلین اکساید مانع تجمع غیرطبیعی مایع در غشای بین یاخته ای بافت های بدن شده و ضد تومور است (Dakhili *et al.*, 2006). فنوکسی اتانول از پرکاربردترین مواد نگهدارنده است و می تواند با کمترین عوارض و مشکلات، جایگزین مناسبی برای نگهدارنده ها باشد. سیترال به عنوان طعم دهنده داروها و همچنین در تهیه عطر و ادکلن، مواد آرایشی، ساخت آبنبات، محصولات نانوایی و بستنی استفاده می شود (Bakkali, 2008).

کاریوفیلین می تواند از بروز اثرات مضر قلبی و عروقی و عصبی، دیابت، آلزایمر و بیماری ام اس جلوگیری کند و دارای اثرات ضدسرطانی است (Morales & Santos, 1997). کلیمک و همکاران، با تجزیه اسانس بادرنجبویه مشاهده کردند که بیشترین ترکیب اسانس را سیترونلال، ژرانیول، ژرانیل استات، لینالول، لینالیل استات و لیمونین تشکیل می دهد، درحالی که در مطالعه حاضر بیشترین ترکیبات اسانس شامل: کاریوفیلین اکساید، فنوکسی اتانول، سیترال و کاریوفیلین بود و یافته های فوق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی نداشت (Klimek *et al.*, 1998)، این امر احتمالاً به دلیل تفاوت شرایط اقلیمی (سرد و مرطوب)، اداکی و جغرافیای منطقه (ارتفاعات کوهستانی مازندران) می باشد. شاروپو و همکاران به بررسی ترکیبات اسانس برگ گیاه بادرنجبویه پرداختند و در این بررسی، ۱۵ ترکیب اصلی (شامل: استایرن، ژرانیل، سیترال، نرال، کاریوفیلین اکسید، لمونول، نرال، بتا کاریوفیلین) معرفی شد (Sharopov *et al.*, 2013) که با بعضی از یافته های مطالعه حاضر مطابقت داشت. در هر دو تحقیق، فصل برداشت گیاه در تابستان (در ارتفاع بالای ۱۰۰۰ متر) و اسانس گیری به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر انجام شد. جلال و همکاران ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه را به ترتیب کاریوفیلین اکساید و کاریوفیلین اعلام کردند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Jalal *et al.*, 2015) این نکته قابل ذکر است که در این دو مطالعه روش استخراج (تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر)، نحوه خشک کردن برگ گیاه و ذخیره آن پس از برداشت یکسان بودند. بوزوویک و همکاران با تجزیه اسانس بادرنجبویه ترکیبات کاریوفیلین و کاریوفیلین اکساید را بعنوان اجزاء اصلی گزارش دادند که با نتایج مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد (Bozovic *et al.*, 2018) در هر دو تحقیق، اسانس گیری به روش تقطیر کلاسیک و زمان نمونه برداری در اواخر تابستان انجام شد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که ترکیب اسانس های به دست آمده از یک گونه خاص گیاهی براساس جغرافیای منطقه، شرایط

اقلیمی و اداپتیکی، روش استخراج، نحوه خشک کردن، فصل برداشت، سن گیاه و مرحله رشد متفاوت است. همچنین اجزای اصلی عصاره اتانولی برگ بادرنجبویه به ترتیب کاربوفیلن اکساید، ۲-هیدرازینو نیکوتینیک اسید، فیتول و بتا-کاربوفیلن می‌باشد. همانطور که پیش‌تر اشاره شد فیتول از معروف‌ترین دی‌ترپنوبید خطی است، که مستقیماً از ژرانیل ژرانیل پیروفسفات حاصل می‌شود و به کلروفیل متصل است. نکته قابل توجه در آنالیز عصاره اتانولی این است که تنها دو ترکیب شناسایی شده، کاربوفیلن اکساید و بتا-کاربوفیلن به ترتیب با ۲۸/۹۵٪ و ۷/۴۴٪ با ترکیبات شناسایی شده از اسانس مشترک بودند، بتا-کاربوفیلن موجود در عصاره به مقدار ۱/۴۷٪ کمتر است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که درصد بازده استخراج عصاره اتانولی بیشتر از عصاره n-هگزانی است. با مقایسه نتایج بدست آمده، عصاره‌های بادرنجبویه منطقه هزارجریب به‌شهر، خصوصاً عصاره اتانولی دارای اثر آنتی اکسیدانی قابل قبولی نسبت به خاصیت آنتی اکسیدانی سنتزی آسکوربیک اسید هستند و می‌توانند پس از آزمایش‌های تکمیلی در صنعت دارویی به‌کار روند. آسکوربیک اسید یک ترکیب آلی طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که به خوبی در آب حل می‌شود و از نیازهای غذایی انسان است و کمبود آن موجب بیماری آسکوربوت می‌شود (Nonomura & Benson, 1992)، نام دیگر آن ویتامین C است. همچنین با روش FRAP مشخص شد که عصاره‌ی اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه توانایی احیاکنندگی خوبی دارند، به عبارت دیگر گیاهانی که قدرت احیاء آهن بالایی دارند قادرند به راحتی رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را خنثی کنند. نتایج این مطالعه به طور کلی نشان داد که عصاره‌های اتانولی و n-هگزانی برگ گیاه بادرنجبویه در هر دو روش DPPH و FRAP، دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی بالایی هستند. با توجه به مهار رادیکال‌های آزاد که سبب تخریب سلول‌های بدن می‌شوند، این عصاره‌ها می‌توانند به عنوان یک فرآورده گیاهی طبیعی در صنایع دارویی به‌کار روند و همچنین جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان سنتزی قرار گیرند، از طرف دیگر به دلیل طعم لیمویی بادرنجبویه امکان استفاده از غلظت‌های بالاتر این عصاره در صنایع غذایی وجود دارد.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله، از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر که زحمت فراوانی برای فراهم نمودن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز این پروژه تحقیقاتی کشیده‌اند، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

## منابع

- مقتدر، م. (۱۳۹۲) شناسایی ترکیب‌های شیمیایی و بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه بادرنجبویه، اولین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار.
- هری‌زچی، ل.، فرخی، ف. (۱۳۹۳) تاثیر لاموتریژین و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر میزان آنزیم‌های کبدی و تغییرات پاتولوژی آن در موش‌های صرعی تجربی با پنتیلن تترازول. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، دوره هشتم، شماره ۵، صفحه ۴۸-۵۶.

- Amoe, A.M. (2009). Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. Publications of the Institute of Applied Higher Education of Agriculture Jahad.
- Andreas, A.R. Lazaro, J.J. Chueca, A. Hermoso, R. and Lopez Gorge, J. (1990). Effect of alcohols on the association of photosynthetic FBPase to thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 78: 409-413.
- Ashrafi, B. Ramak, P. Taleie, Gh. and Rashidipor, M. (2015). Investigation of antioxidant properties of *Dracocephalum kotschy Bios*. 2th national conference on Biology and Horticultural of Iran: Tehran.
- Bakkali, F. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-475.
- Bozovic, M. Garzoli, S. Baldisserotto, A. Romagnoli, C. Pepi, F. and Cesa, S. (2018). *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. & Sm.) Arcang. essential oil: Chemical composition and preliminary antimicrobial investigation of samples obtained at different harvesting periods and by fractionated extractions. *Industrial Crops and Products*, 117: 317-321.
- Capecka, E. and Mareczek, A. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93(2): 223-6.
- Dakhili, M. Zahrai Salehi, T. Torabi Goodarzi, M. and Khavari, A. (2006). Evaluation of antimicrobial effects of 4 medicinal plants against salmonella typhymurium and comparison them with common antibiotics in veterinary medicine. *J Med Plants*, 5(20): 21-24.
- Haji-sharifi, A. (2016). *Secrets of Medicinal Plants*. Publication of Hafez Novin, Tehran.
- Hariry, R.E. (2011). Anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* on pentylenetetrazole (PTZ) model of convulsion in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16): 3803-3809.
- Heins, R. (1980). Inhibition of ethylene synthesis is and senescence incarnation by ethanol. *Journal of American Society Horticulture. Science*, 105: 141-144.
- Jalal, Z. Atki, YE. Lyoussi, B. and Abdellaoui, A. (2015). Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5: 458-461.
- Klimek, B. Majda, T. and Patora, J. (1998). Investigation of essential oil and phenolic compounds of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) Cultivated in poland. VIIth conference on the application of chromatographic methods in phytochemical and biomedical research lublin, poland. *Herbpolonica*, 44(4): 324-31.
- Klink, B. (1997). Alternative medicine: is natural really better. *Drug Top*, 141: 99-100.
- Kulisic, T. Radonic, A. and Katalinic, V. (2004). Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. *Journal of Food Chemistry*, 85: 633-640.
- Lamaison, J.L. Petitjean-Freytet, C. Duband, F. and Carnat, A.P. (1991). Rosemarinic acid content and antioxidant activity of French lamiaceae. *Fitoterapia*, 62: 166-171.
- Martinez-Tome, M. Jimenez, A. Ruggieri, S. Frega, N. Strabbioli, R. and Murcia, M. (2001). Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, 64: 1412-1419.
- Ministry of Health. (2002). *Iranian Herbal Pharmacopoeia*. Tehran. Ministry of Health Pub: 121-41.
- Morales, J.P. and Santos, B.M. (1997). Effects of different ethanol concentration on the initial growth of lettuce (*Lactuca sativa*). *Proceeding of the Caribbean Food Crop Society*, 33: 442-447.

- Nonomura, A. and Benson, A. (1992). The path of carbon photosynthesis improved crop yields with methanol. Proceeding National Academic Science USA, 15: 9794-9798.
- Patora, J. Klimek, B. (2002). Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 59(2): 139-43.
- Pino, JA. Rosado, A. and Fuentes, V. (1999). Composition of the essential oil *Melissa officinalis* L. From Cuba. *J Essent Oil Res*, 11(3): 363-4.
- Ren, W. Qiao, Zh. Wong, H. Zhu, L. and Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519-53.
- Rojhan, M. (1998). *Treated by Medicinal Plants*. Aya cultural center publishing, Tehran.
- Sharopov, FS. Wink, M. Khalifaev, DR. Zhang, H. Dosoky, NS. and Setzer, WN. (2013). Composition and bioactivity of the essential oil of *Melissa officinalis* L. Growing wild in Tajikistan. *Int J Trad Nat Med*, 2(2): 86-96.
- Zargari, A. (1995). *Medicinal Plants*. 5th ed. Tehran: Tehran University, Pp. 77-81.

## Analyzing of chemical composition of the essential oil and study of antioxidant activity of extract of *Melissa officinalis* from Behshahr-Iran

S.A. rezaei Jamnani<sup>1</sup>, A. Mirabi<sup>2\*</sup>

Received: 2019.9.23

Accepted: 2020.9.6

### Abstract

This research has been conducted to analyze essential oil and ethanol extract and investigate the antioxidant activity of the ethanol and n-hexane extracts of the *Melissa officinalis* leaves collected from Hezar Jarib area of Behshahr. *Melissa officinalis* leaf can be considered as a substitute of the synthetic antioxidants. The leaves of the plant were collected from its natural habitats in the heights of Mazandaran province in early September. In this study, chemical composition of the essential oil and ethanol extract of the *Melissa officinalis* leaf were analyzed by GC/MS. The antioxidant activity of the ethanol and N-hexane extracts is investigated using method of DPPH and compared to the synthetic antioxidant of ascorbic acid. The results showed that the main components of essential oil are: Phenoxyethanol (31.66%), total of Caryophyllene Oxide enantiomer (24.71%), total of Citral enantiomer (13.89%) and total of Caryophyllene enantiomer (9.88%) also the main components of ethanol extract are: Caryophyllene Oxide (28.95%), total of 2-Hydrazino-Nicotinic acid (11.37%), Phytol (8.61%) and  $\beta$ -Caryophyllene (7.44%) respectively. Also the  $IC_{50}$  of the ethanol and n-hexane extracts are determined 39.05 and 98.93  $\mu$ g/ml respectively, and in the FRAP method the ability of reducing of the ethanol and n-hexane extracts were 91.3 and 105.5  $\mu$ g/ml respectively. By comparing the results, extracts have antioxidant effect and ability of reducing so can be used in medicine industries.

**Keywords:** Antioxidant, Essential oil , *Melissa officinalis*

---

1- Graduated from the Islamic Azad University, Ghaemshahr Branch, Department of Chemistry, Ghaemshahr, Iran.

2- Associate Professor of Analytical Chemistry, Islamic Azad University, Ghaemshahr Branch, Department of Chemistry, Ghaemshahr, Iran

\*(Corresponding author : a.mirabi@qaemiau.ac.ir)

## ارزیابی تنش آلوپاتیک بقایای اویارسلام (*Cyperus esculentus*) بر برخی از علف‌های هرز مهاجم

ابوذر سعیدی پور<sup>۱</sup>، ابراهیم غلامعلی پور علمداری<sup>۲\*</sup>، عباس بیابانی<sup>۲</sup>، زینب اورسجی<sup>۴</sup>، علی نخزری مقدم<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۷

### چکیده

پدیده آلوپاتی به علت ایجاد ترکیبات فعال زیستی به وسیله گیاهان و یا بقایای به جا مانده از آن‌ها ایجاد می‌گردد که بر جوانه‌زنی، رشد و توسعه‌ی افراد همان گونه یا گونه‌های دیگر اثر می‌گذارد. بدین منظور، آزمایشی با هدف ارزیابی تنش آلوپاتیک حاصل از مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام (۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ گرم در سه کیلوگرم خاک لوم) بر خصوصیات جوانه‌زنی و مورفوفیزیولوژیکی علف‌های هرز مهاجم نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی انجام شد. این تحقیق به صورت دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار در سه تکرار انجام شد. مطابق نتایج، شدت اثرات آلوپاتیک اویارسلام بر دو علف‌هرز نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی بسته به مقادیر بقایا در خاک کاهشی و معنی‌دار بود. به‌طوری‌که صفاتی نظیر درصد و نرخ جوانه‌زنی، سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ به‌علاوه محتوای رنگیزه‌های کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئیدها در نیلوفرپیچ بیشتر تحت تاثیر ترکیبات دگرآسیب مقادیر مختلف بقایا در مقایسه با شاهد قرار گرفت. بررسی روند تغییرات محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی نیز بیانگر افزایش این مشخصه‌ها با افزایش مقادیر بقایای اویارسلام بود. پایین‌تر بودن رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش شدیدتر مولفه‌های جوانه‌زنی و رشدی در نیلوفرپیچ در مقایسه با خربزه‌وحشی می‌تواند گواهی بر حساسیت بیشتر این گونه در حضور مواد آلوپاتیک اویارسلام باشد. علف‌هرز اویارسلام با توجه به زیتوده بالای آن در مزارع و اثبات اثر آلوپاتیک آن، می‌تواند کاندیدی برای تولید علف‌کش‌ها با منشاء زیستی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** اثرات آلوپاتیک، رنگیزه‌های کلروفیل، سطح برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز، وزن تر ریشه، وزن

### خشک برگ

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم علف‌های هرز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

۲- استادیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

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

۳- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

۴- استادیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

۵- استادیار، گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

## مقدمه

علف‌های هرز از دیر باز به‌عنوان عنصری نامطلوب در بوم نظام‌های کشاورزی موجب افزایش هزینه تولید و کاهش کیفیت محصول می‌شوند (Yousefi *et al.*, 2014؛ اجتهادی و همکاران، ۱۳۹۲). خسارت ناشی از علف‌های هرز به کلیه محصولات کشاورزی حدود ۵۰ درصد تولید جهانی محاسبه شده است (FAO, 2010). لذا وجود علف‌های هرز یکی از مهمترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی است و بدون شک کاهش تولید، نتیجه مستقیم رقابت، آلودگایی و یا فعالیت توأم آن دو با هم می‌باشد (Pudelko *et al.*, 2014; Sturm *et al.*, 2016). پدیده آلودگایی به‌علت ایجاد ترکیبات فعال زیستی به‌وسیله گیاهان و یا بقایای به‌جا مانده از آن‌ها ایجاد می‌گردد. این ترکیبات پس از تبدیل به مواد ثانویه و ورود به محیط رشد گیاهی در مزرعه و یا دیگر اکوسیستم‌ها ممکن است جوانه‌زنی، رشد و نمو سایر گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند. هرچند، این تأثیرات ممکن است به‌صورت مثبت و یا منفی بروز پیدا کند (Marinov-Serafimov, 2010; Azadbakht *et al.*, 2013; Ravlic *et al.*, 2015). مواد آلوده‌شیمیایی با خاصیت آلودگایی در تمام بافت‌های گیاهی از جمله، ریشه‌ها، ریزوم‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها، میوه‌ها و بذرها وجود دارند (عامری و همکاران، ۱۳۹۱). اصولاً متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان مواد آلوده‌شیمیایی، تنها بر یک عامل فیزیولوژیک مؤثر نیستند، بلکه بر جنبه‌های متعددی از جمله محتوای رنگیزه‌ها و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده اثر دارند و حتی تغییر ژنتیکی در گیاهان می‌تواند تحت تأثیر این مواد قرار گیرد (Pudelko *et al.*, 2014). فرهودی و همکاران (۱۳۹۳) گزارش نمودند که ترکیبات آلوده‌شیمیایی سبب تغییر در مسیر بیان ژن‌ها، بازدارندگی جوانه‌زنی، تقسیم میتوز و فتوسنتز در گیاهان اطراف خواهند شد. هم‌چنین این ترکیبات با اختلال در فعالیت آنزیم‌های حیاتی گیاهان نظیر آنزیم‌های پاداکساینده، آلفا آمیلاز و ساکارز سنتتاز موجب آسیب‌پذیری سایر گیاهان می‌شوند. کاهش فتوسنتز، ایجاد تنش اکسیداتیو و تخریب غشاهای سلولی، تخریب رنگیزه‌های گیاهی و اختلال در عمل آنزیم‌های حیاتی از جمله اثرات ترکیبات آلودگایی می‌باشد (Lorenzo *et al.*, 2011; Farhoudi & Lee, 2013). اصولاً در شرایط تنش میزان تولید انواع فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. انواع فعال اکسیژن به‌عنوان عوامل اصلی بروز تنش اکسیداتیو از توان اکسیدکنندگی بالایی برخوردار هستند که فرآیندهای مختلف سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع پاداکساینده ضروری می‌باشد. آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع پاداکساینده در گیاهان می‌باشند (دانشمند، ۱۳۹۳). تجمع اسمولیت‌های سازگار در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله تنش حاصل از آلوده‌شیمیایی‌ها نیز گزارش شده است (Mishra *et al.*, 2008). Weir و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که تنش‌های زیستی و غیرزیستی در طی دوره‌ی رشد گیاه اغلب موجب افزایش محتوای اسیدهای آمینه‌ی آزاد نظیر پرولین می‌شوند. اوبارسلام ارغوانی (*Cyperus rotundus*)، جزو مهمترین علف‌های هرز رایج و مشکل‌سازترین علف‌های هرز در جهان است (Holm *et al.*, 1977).

گزارش شده است عمده‌ی ماده تولید شده در آن ترکیبات فنلی است که به‌عنوان عامل بازدارنده در جوانه‌زنی جو، خردل سیاه و پنبه عمل می‌کند (Friedman and Horowitz, 1971). Belel و همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند که مواد شیمیایی سمی موجود در عصاره آبی اویارسلام به‌طور قابل توجهی رشد ساقه و ریشه بادم زمینی را کاهش داد، هم‌چنین رشد ساقه بیشتر از رشد ریشه تحت تاثیر قرار گرفت. در آزمایشی دیگر Kavitha و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که ترکیبات شیمیایی آلوپاتیک موجود در عصاره‌های ساقه و غده‌ی اویارسلام، طول گیاهچه و وزن تر و خشک گیاهچه‌های چمن غاز را مهار نمودند. درجه‌ی مهار به غلظت عصاره وابسته بود و عصاره غده‌ی اویارسلام بیشتر از عصاره ساقه آن سبب مهار رشد در گیاهچه‌های چمن غاز گردید. نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی از علف‌های هرز مهاجم و سمج در مزارع مختلف به‌ویژه سویا می‌باشند. این گیاهان پیش از این در استان گلستان وجود نداشتند و اخیراً با تغییرات گیاه‌شناسی قابل توجهی از حالت مهاجم به‌صورت بومی به فلور علف‌های هرز مزارع سویای استان گلستان به‌ویژه مزارع شرق استان اضافه شده‌اند. تاکنون تحقیقات چندانی پیرامون اثر آلوپاتیک علف‌هرز اویارسلام بر علف‌های هرز مهاجم علی‌رغم زیتوده تولیدی بالای آن در مزارع صورت نگرفته است، لذا هدف از این تحقیق، بررسی تنش آلوپاتیک حاصل از مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر گونه‌های مهاجم علف‌های هرز نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی در مزارع شرق استان گلستان بود.

## مواد و روش‌ها

### مشخصات جغرافیایی، اقلیمی و خاک

در این آزمایش بخش‌های هوایی علف‌هرز اویارسلام در مرحله رویشی از مزارع تحت کشت گیاه زراعی سویا در دهستان مرکزی شهرستان رامیان در محدوده‌ی اراضی روستای نارکلاته با مختصات طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۰۵ دقیقه ۳۵ ثانیه و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۰۳ دقیقه ۳۱ ثانیه با ارتفاع ۱۰۰ متر از سطح دریا و با متوسط بارندگی سالیانه‌ی ۵۵۰ میلی‌متر جمع‌آوری شد. قبل از اجرای این آزمایش، برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل انجام آزمایش اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که دو کیلوگرم نمونه‌ی خاک مرکب به‌صورت W از شش نقطه‌ی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری به‌وسیله اوگر برداشت شد. سپس برای تجزیه‌ی برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه خاک‌شناسی شهرستان کلاله منتقل گردید. نتیجه آزمایش به‌شرح جدول ۱ بود.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محل انجام آزمایش

| مشخصات     | فاکتور مورد بررسی                          |
|------------|--------------------------------------------|
| سیلتی لومی | بافت خاک                                   |
| ۷/۸        | pH                                         |
| ۱/۲        | هدایت الکتریکی خاک (میلی موس بر سانتی متر) |
| ۰/۷۵       | کربن آلی (درصد)                            |
| ۰/۱۱       | نیتروژن (درصد)                             |
| ۷          | فسفر قابل جذب (پی پی ام)                   |
| ۱۵۰        | پتاسیم قابل جذب (پی پی ام)                 |

### شناسایی و آماده سازی نمونه های گیاهی

در ابتدا نمونه های گیاهی اویارسلام با کمک کورموفیت های ایران مورد شناسایی دقیق گونه ای قرار گرفت (قهرمان، ۱۳۷۳). سپس برای برداشتن گرد و غبار و عدم اختلاط آن ها با آلودشیمیایی ها برای مدت یک دقیقه با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفتند. در ادامه نمونه های علف هرز اویارسلام با کمک آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، خشک گردید. نمونه ها ابتدا توسط آسیاب به قطعات ریز تبدیل و از الک هایی با مش ۸ (تعداد مربع و یا ذرات الک در یک اینچ) عبور داده شدند. سپس نمونه ها تا زمان شروع آزمایش در کیسه های پلاستیکی زیب دار نگهداری شدند.

### فرآیند تجزیه بقایای اویارسلام و کاشت بذور

بر طبق نتایج تجزیه ی آزمون خاک محل اجرای آزمایش و لومی بودن آن، خاک مورد نیاز از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی متری زمین تهیه و سپس از الک هایی با مش ۸ عبور داده شد. مقادیر مختلف گیاهی نظیر ۰ (شاهد)، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ گرم از علف هرز اویارسلام در سه کیلوگرم خاک لوم در شرایط گلدان به مدت ۴۰ روز به منظور پوسیده شدن نگهداری شد (پور حیدر غفاری و همکاران، ۱۳۹۱). در پایان روز چهلیم، خاک گلدان ها برای خروج آلودشیمیایی های گازی به مدت یک هفته در معرض هوای آزاد پهن گردید. در ادامه، بذره های علف های هرز نیلوفرپیچ و خربزه وحشی با هیپو کلریت سدیم ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه مورد ضد عفونی قرار گرفت. سپس ۱۰ عدد بذر دو گونه مورد بررسی در گلدان هایی به پهنای ۱۷/۳۰ سانتی متر و ارتفاع ۲۱ سانتی متر به طور جداگانه کاشته شدند و بلافاصله پس از کاشت بذور، گلدان ها تا ظرفیت زراعی مورد آبیاری قرار گرفتند. این آزمایش ها در شرایط محیطی کنترل شده گلخانه شامل رطوبت نسبی ۶۵ درصد، تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای روز ۲۵ درجه سانتی گراد و شب ۱۵ درجه سانتی گراد انجام شد (کریمی آرپناهی و همکاران، ۱۳۹۷). پس از ظهور گیاهچه ها، عملیات تنک کردن انجام و در انتها در هر گلدان فقط ۳ بوته یکسان از لحاظ مورفولوژیکی نگهداری شد. این تحقیق به صورت دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار در ۳ تکرار در ۱۵ گلدان تا زمان قبل از گل دهی (به مدت ۵۰ روز)

انجام شد. این آزمایش‌ها در گلخانه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس در سال زراعی ۱۳۹۷ به اجرا درآمد. در انتهای آزمایش، برخی از خصوصیات جوانه‌زنی و مورفولوژیکی نظیر سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی، نمونه‌های برگي دو گونه‌ی علف‌هرز به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله مورد سنجش قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری محتوای آمینواسید پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز، نمونه‌ها به فریزر منفی ۸۶ درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان شروع آزمایش نگهداری شدند.

#### اندازه‌گیری درصد و نرخ جوانه‌زنی گیاهچه‌ها

برای تعیین درصد و نرخ جوانه‌زنی در مزرعه، تعداد کلئوپتیل‌های خارج شده از سطح خاک هر روز شمارش و این عمل تا ۱۴ روز بعد از کاشت انجام گردید و سپس از طریق فرمول ذیل درصد و نرخ جوانه‌زنی محاسبه شد (Maguire, 1962).

$$\text{رابطه‌ی (۱)} \quad \text{درصد جوانه‌زنی} = \sum \frac{\text{تعداد بذور جوانه زده تا روز شمارش}}{\text{شمارش روزهای مورد نظر پس از شروع آزمایش}}$$

$$\text{رابطه‌ی (۲)} \quad \text{نرخ جوانه‌زنی} = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذرهای کشت شده}} \times 100$$

#### اندازه‌گیری مشخصه‌های مورفومتری

قبل از شروع گل‌دهی و فاز زایشی، سطح برگ در هر بوته با استفاده از دستگاه Leaf Area Meter مدل Delta-t محاسبه گردید. وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ نیز با کمک ترازوی دیجیتالی با دقت یک‌صدم اندازه‌گیری شد.

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

محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی بر اساس روش استون سرد (Arnon, 1967) با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از روابط ذیل، محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه تازه برآورد شد.

$$\text{رابطه‌ی (۳)} \quad \text{Chlorophyll a} = [(19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V / 100W]$$

$$\text{رابطه‌ی (۴)} \quad \text{Chlorophyll b} = [(19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V / 100W]$$

$$\text{رابطه‌ی (۵)} \quad \text{Carotenoides} = [100(A_{470} - 3.27 (\text{mg chl a}) - 104 (\text{mg chl b}) / 227]$$

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

محاسبه درصد تحریک‌کنندگی و یا بازدارندگی با استفاده از رابطه‌ی ذیل برآورد شد (Amoo et al., 2008).

$$PLI = [(R_2 - R_1) / R_1] \times 100 \quad \text{رابطه‌ی (۶)}$$

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

### اندازه‌گیری محتوای پرولین

محتوای پرولین بر اساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا استخراج عصاره‌ی آنزیمی صورت گرفت. بدین ترتیب، ابتدا مقدار یک گرم از نمونه‌ی برگ تازه با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سرد به‌خوبی ساییده شد. سپس در سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه محلول رویی با دقت جدا و به‌عنوان روشناور استفاده گردید (Kala, 2015). سپس محتوای فعالیت آنزیم کاتالاز با تغییرات جزئی روش Aebi (۱۹۸۴) توسط علی سلطانی و همکاران (۱۳۹۱) به‌وسیله میزان تخریب  $H_2O_2$  به کمک اسپکتروفتومتر مدل Biochrom libera- S22 در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه تعیین گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی  $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  برای  $H_2O_2$  محاسبه شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با کمک نرم افزار Minitab با نسخه ۱۶ مورد آزمون قرار گرفت و داده‌های غیرنرمال، نرمال گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS با نسخه ۹/۳ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با کمک آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار حفاظت شده<sup>۱</sup> (در جایی که آماره F معنی‌دار) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

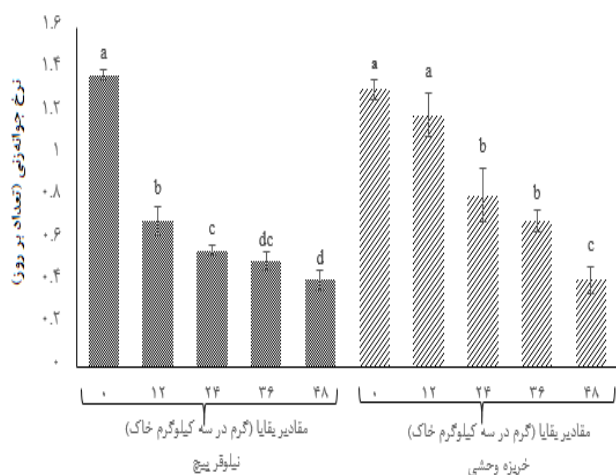
<sup>۱</sup> Protected Least Significant difference

## نتایج و بحث

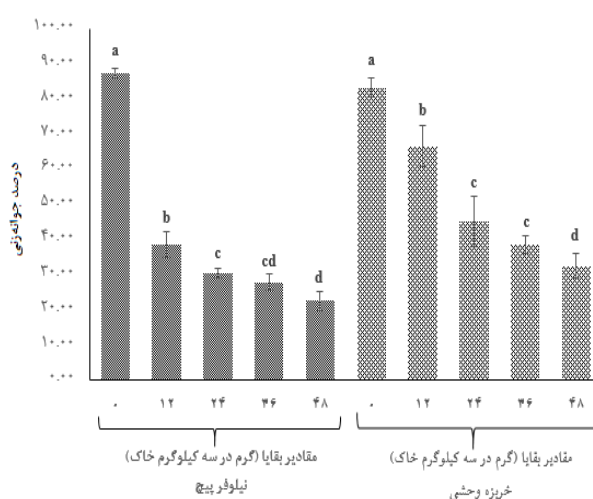
### درصد و نرخ جوانه‌زنی

بررسی روند تغییرات درصد و نرخ جوانه‌زنی دو گونه‌ی نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی نشان داد که مقادیر مختلف بقایای اویارسلام تاثیر بازدارندگی متفاوتی بر این مشخصه‌ها در دو گونه‌ی مورد بررسی داشتند؛ به گونه‌ای که شیب تغییرات کاهش درصد و نرخ جوانه‌زنی نیلوفرپیچ به تنش ترکیبات آللوپاتیک ناشی از اویارسلام بیشتر از خربزه‌وحشی بود (شکل‌های ۱ و ۲). علت این مساله می‌تواند تفاوت در خصوصیات فیزیولوژیکی دو گونه‌ی مورد بررسی و پاسخ متفاوت آن‌ها به ترکیبات آللوپاتیک اویارسلام باشد.

Gomes و همکاران (۲۰۱۶) با ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی غده‌های اویارسلام ارغوانی (*Cyperus rotundus*) بر مشخصه‌های جوانه‌زنی کاهو و منداب (*Eruca sativa*) در بسترهای مختلف خاک گزارش نمودند که با افزایش غلظت عصاره، جوانه‌زنی بذور آزمایشی در بسترهای مختلف کاهش یافت. بیشترین کاهش جوانه‌زنی گیاهان کاهو و منداب به بستر شنی اختصاص داشت. در آزمایشی دیگر عبدی و عابدی (۱۳۹۸) گزارش نمودند که اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهان مریم‌گلی، نعنای فلفلی و کاسنی بر درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای گیاه چاوداروحشی بیشتر از علف‌هرز دم‌روباهی بوده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، عصاره‌های نعنای فلفلی و مریم‌گلی دارای اثرات دگرآسیبی قویتری نسبت به کاسنی بودند. موثرترین عصاره در کاهش درصد جوانه‌زنی علف‌هرز دم‌روباهی، عصاره نعنای فلفلی بود.



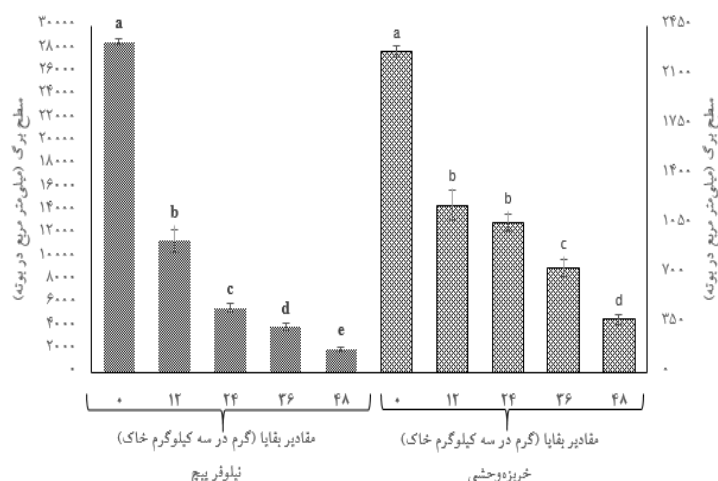
شکل ۲: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر نرخ جوانه‌زنی نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



شکل ۱: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر درصد جوانه‌زنی نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

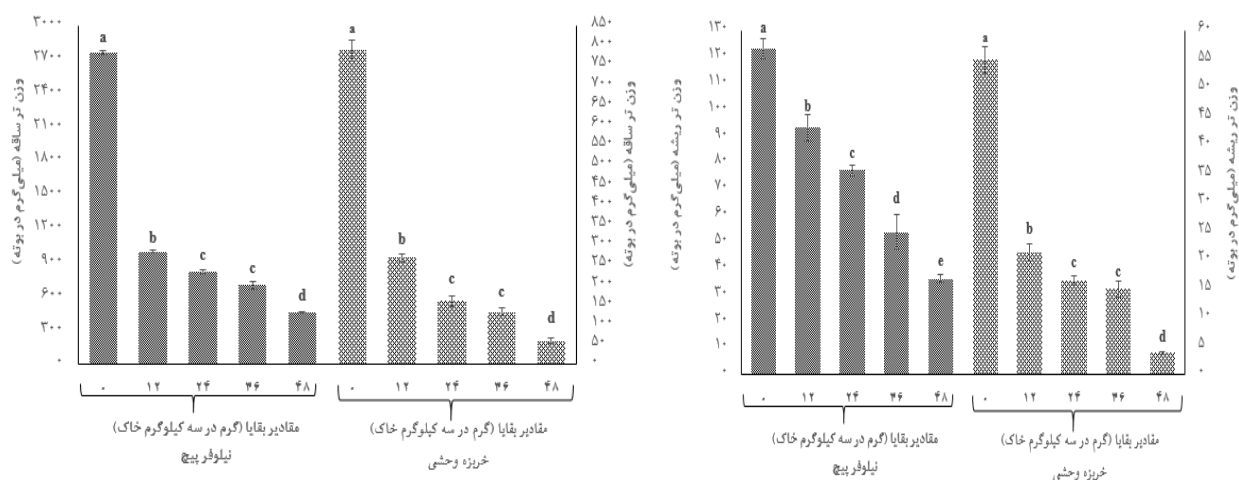
## نتایج مورفومتری

مطابق نتایج، مقادیر مختلف بقایای اویارسلام اثر کاهشی متفاوتی بر سطح برگ دو گونه‌ی مورد بررسی نشان دادند. به گونه‌ای که مقادیر مختلف بقایای اویارسلام اثر کاهشی بیشتری بر سطح برگ علف‌هرز نیلوفرپیچ داشتند. بیشترین اثر کاهشی در دو گونه‌ی مورد بررسی مربوط به مقدار ۴۸ گرم از بقایا بود (شکل ۳).



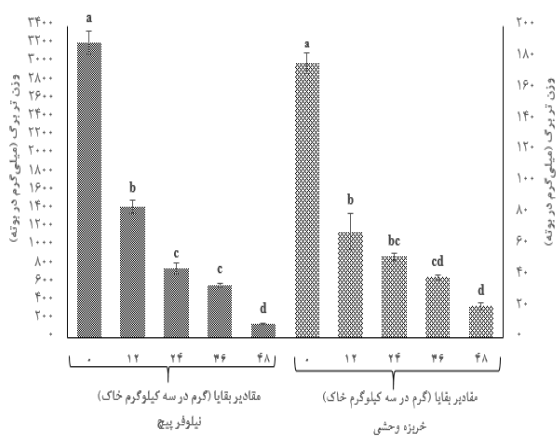
شکل ۳: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر سطح برگ در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

بررسی روند تغییرات وزن تر ریشه، ساقه و برگ در دو گونه‌ی مورد بررسی در واکنش به مقادیر مختلف بقایای گیاهی علف‌هرز اویارسلام نشان داد که بقایای علف‌هرز اویارسلام در تمام سطوح، وزن تر سه اندام دو گونه مورد بررسی را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد هر یک از آن‌ها کاهش داد. کمترین و بیشترین درصد بازدارندگی به‌ترتیب به مقدار ۱۲ و ۴۸ گرم بقایای علف‌هرز اویارسلام اضافه شده به خاک اختصاص داشت، اگرچه اختلاف آن‌ها با سایر تیمارها در برخی از صفات معنی‌دار نبود. این مطلب می‌تواند بیانگر وابستگی پدیده‌ی آلوپاتی به غلظت مواد آلویشیمیایی ناشی از بقایا باشد. مطابق نتایج، شیب کاهش بازدارندگی وزن تر در سه اندام مورد بررسی در بوته نیلوفرپیچ بیشتر از خربزه وحشی بود (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).



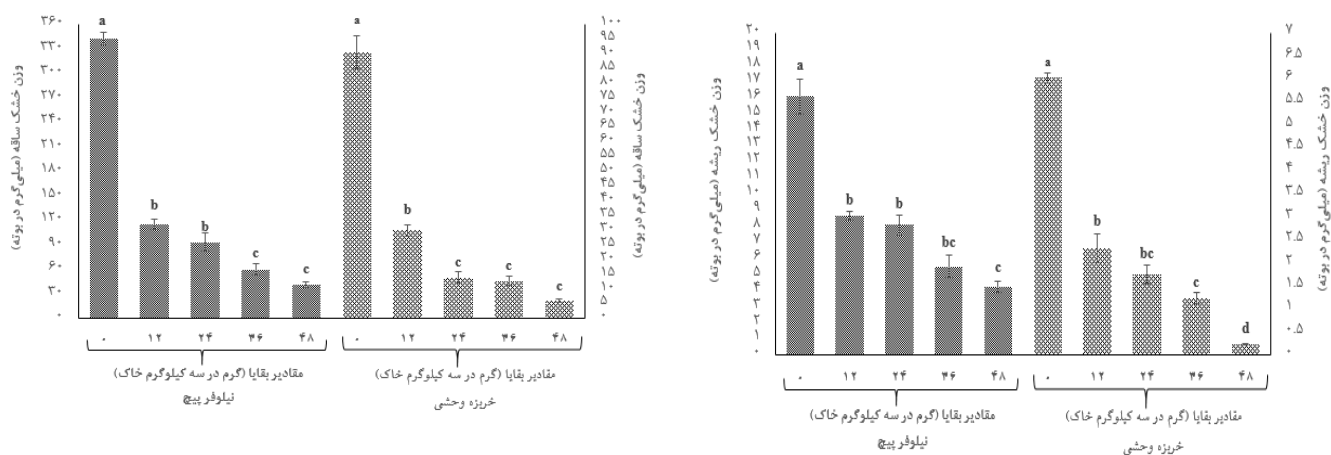
شکل ۵: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن تر ساقه در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

شکل ۴: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن تر ریشه در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



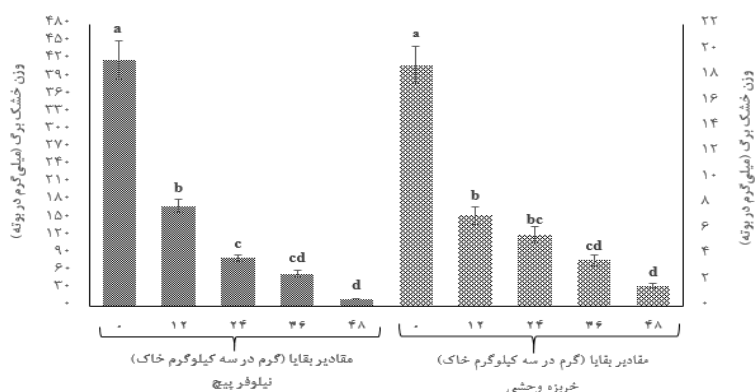
شکل ۶: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن تر برگ در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

نتایج به دست آمده هم چنین نشان داد که وزن تر و خشک ریشه بیشتر از دو مولفه‌ی وزن خشک ساقه و برگ تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک ناشی از بقایای علف‌هرز اویارسلام قرار گرفتند (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). با توجه به این که ریشه اولین اندامی می‌باشد که تحت تاثیر ترکیبات مختلف آللوپاتیک قرار می‌گیرد، بنابراین این امر دور از انتظار نیست



شکل ۸: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن خشک ساقه در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

شکل ۷: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن خشک ریشه در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



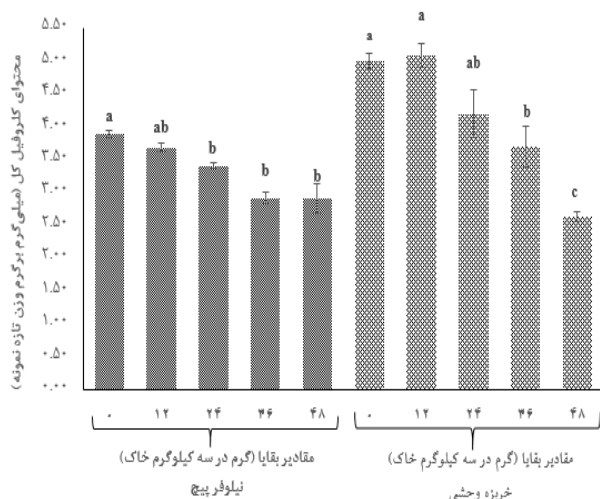
شکل ۹: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر وزن خشک برگ در بوته نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

چنین نتیجه مشابهی نیز در مورد اثر آللوپاتیک غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی علف‌های هرز سوروف، قیاق و گل گندم بر شاهی (پورنمازی و همکاران، ۱۳۹۸)، بقایای علف‌های هرز سوروف، اویارسلام، بنداوش و تیرکمان آبی بر برنج (Gholamalipour

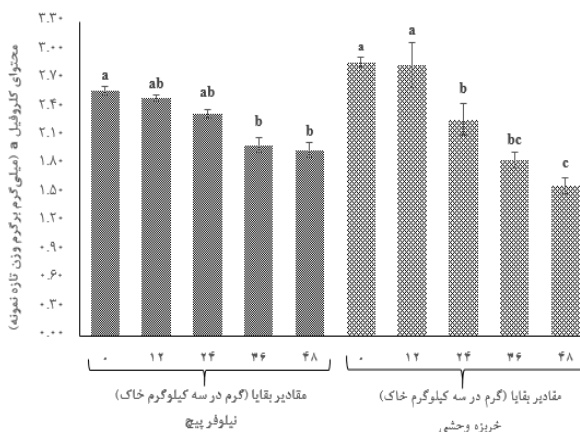
Alamdari, 2011) کرچک بر گیاه دارواش (سیدی و همکاران، ۱۳۹۴) و چندین نمونه گیاه دارویی بر دانه‌های روغنی و حبوبات (Rawat et al., 2016) گزارش شده است. Gulzar و همکاران (۲۰۱۶) در آزمایشی گزارش نمودند که ترکیبات آللوپاتیک، تقسیم سلولی بافت‌های در حال رشد نوک ریشه را مورد هدف قرار می‌دهند و موجب افزایش تعداد کروموزوم‌های غیرمعمول می‌گردند. Mushtaq و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر عصاره‌ی آبی ساقه تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای سنا (*Cassia tora*) گزارش نمودند که آلوشیمیایی‌های محلول در آب از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای این گیاه جلوگیری نمودند و موجب ناهنجاری کروموزومی در مراحل میتوزی گردیدند. در مجموع این مطالعه نشان داد که تاثیر بازدارندگی بقایای اویارسلام بر وزن تر و خشک اندام‌های مورد مطالعه دو گونه‌ی نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی تفاوت داشت، به گونه‌ای که تاثیر بازدارندگی بقایای اویارسلام بر وزن خشک بیشتر از وزن تر صفات بود. همچنین شیب تغییرات کمتر وزن تر و خشک اندام‌ها در خربزه‌وحشی در مقایسه با نیلوفرپیچ می‌تواند بیانگر حساسیت کمتر خربزه‌وحشی به بقایای آللوپاتیک ناشی از علف‌هرز اویارسلام باشد. بدیهی است توان آللوپاتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است و عواملی مانند گونه گیاهی، غلظت و نوع ماده شیمیایی آللوپاتیک، عوامل محیطی و عملیات زراعی بر تحمل گونه‌های گیاهی نسبت به آللوپاتی تاثیر دارند.

### محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

مطابق نتایج، تاثیر مقادیر مختلف بقایای اویارسلام بر صفات رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و کلروفیل کل) در دو گونه‌ی مورد مطالعه متفاوت بود. بر طبق نتایج، در دو تیمار ۳۶ و ۴۸ گرم بقایای در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱۰ و ۱۱).

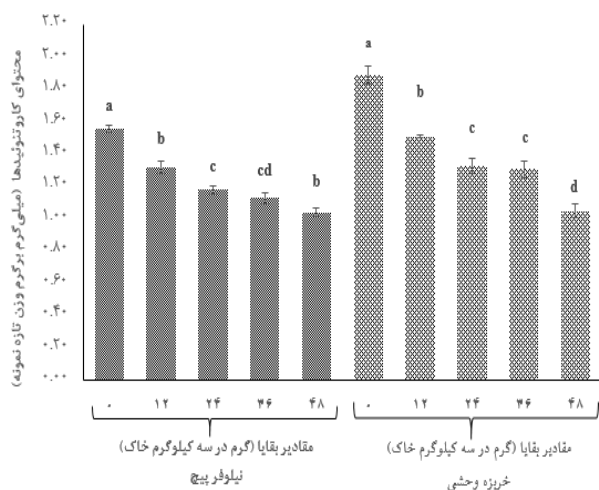


شکل ۱۱: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای کلروفیل کل نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

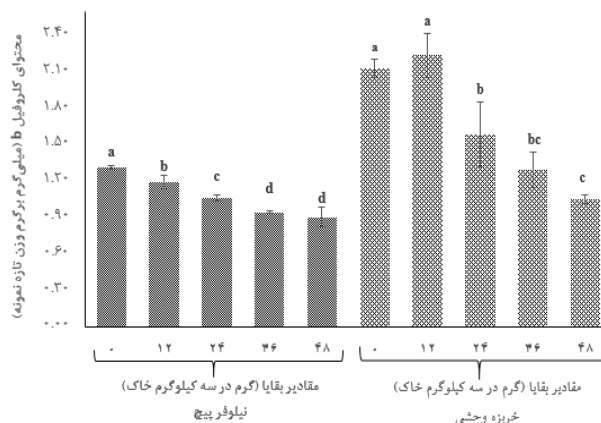


شکل ۱۰: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای کلروفیل a نیلوفرپیچ و خربزه‌وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

همچنین مقایسه میانگین رنگیزه‌های کلروفیل b و کاروتنوئیدهای نیلوفرپیچ و خربزه وحشی نیز بیانگر اثر بازدارندگی معنی‌دار مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر صفت مورد بررسی بود، اما تیمار ۱۲ گرم در مورد محتوای کلروفیل b در گیاه خربزه وحشی مستثنی بود. (شکل ۱۲ و ۱۳).



شکل ۱۳: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای کاروتنوئیدهای نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار



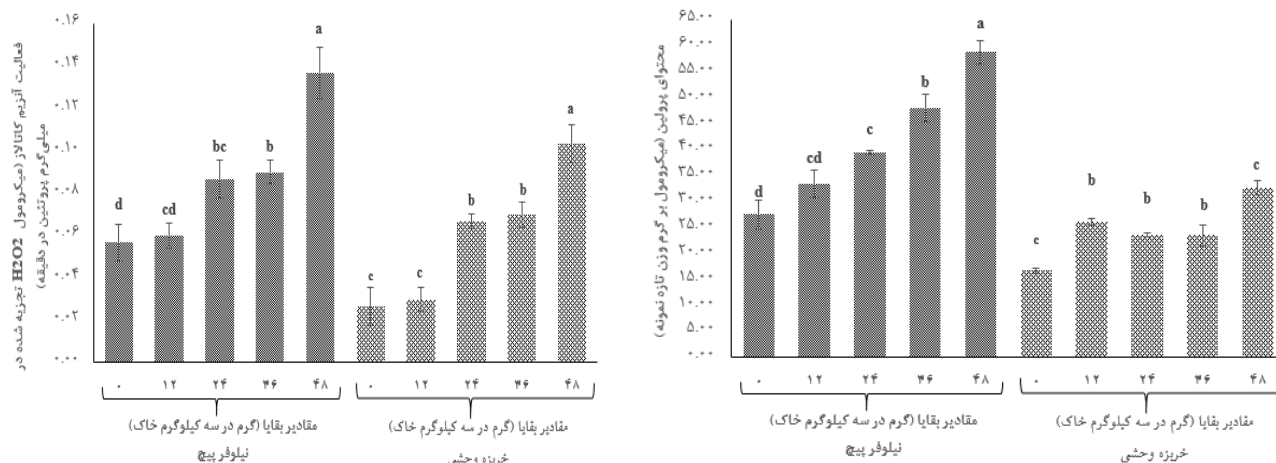
شکل ۱۲: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای کلروفیل b نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

به‌طور کلی محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی در علف‌هرز خربزه وحشی در مقایسه با نیلوفرپیچ بالاتر می‌باشد، از سوی دیگر میزان بازدارندگی مقادیر مختلف اویارسلام بر رنگیزه کلروفیل b و کاروتنوئیدها در خربزه وحشی بیشتر بود. پایین‌تر بودن محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش شدیدتر وزن خشک در نیلوفرپیچ می‌تواند گواهی بر حساسیت بیشتر این گونه نسبت به خربزه وحشی در حضور مواد آلوپاتیک اویارسلام باشد. همچنین نتایج نشان داد محتوای کلروفیل b و کاروتنوئیدهای دو گونه مورد مطالعه بیشتر از کلروفیل a تحت تاثیر ترکیبات آلوپاتیک بقایای اویارسلام قرار گرفت. با توجه به تأثیرپذیری متفاوت مقادیر بقایای اویارسلام بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها در دو گونه مورد بررسی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که حد آستانه تاثیر آلوپاتیک بقایای اویارسلام بر این رنگیزه‌ها در دو گونه‌ی حاضر متفاوت می‌باشد. در پژوهش بهداد و همکاران (۱۳۹۴)، محتوای کلروفیل b نسبت به کلروفیل a در برگ گیاه بروموس تحت تأثیر عصاره‌ی اندام هوایی گیاه درمنه کاهش بیشتری نشان داد. Young (۱۹۹۱) گزارش نمود که در مرحله اولیه تنش‌های محیطی، میزان سنتز کلروفیل b و کاروتنوئیدها (به‌عنوان گیرنده‌های نوری مکمل) در برگ به‌علت نقش آن‌ها در حفاظت از ساختار کلروفیل‌ها در برابر اثرات تخریبی انواع فعال اکسیژن افزایش می‌یابد اما با گذشت زمان و در تطابق گیاه با تنش میزان آن‌ها کاهش پیدا می‌کند. حسن

سلطان و همکاران (۱۳۹۵) بیان داشتند کلروفیل b و کاروتنوئیدها گروهی از رنگیزه‌ها هستند که علاوه بر نقشی که در تشکیل رنگیزه‌ها بر عهده دارند، خاصیت پاداکساینده‌گی نیز برای آن‌ها گزارش شده است. تاتاری و همکاران (۱۳۹۷) گزارش نمودند که محتوای رنگیزه‌های کلروفیل علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli* L.) تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف پنیرک (*Malva sylvestris* L.) کاهش یافت. این محققین نتیجه‌گیری نمودند که تنش آللوپاتیک ناشی از مواد آللوپاتیک موجود در سوروف منجر به فعال شدن مسیر کاتابولیسمی کلروفیل می‌شود. Zuo و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که طیف وسیعی از مواد آللوپاتیک قادرند با تغییر در محتوای کلروفیل‌های a و b (به‌عنوان مهمترین رنگیزه‌های فتوسنتزی) بر فرآیند فتوسنتزی گیاهان اثر بگذارند.

### محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی روند تغییرات محتوای پرولین در دو گیاه مورد مطالعه نشان داد که این مشخصه با افزایش مقادیر بقایای اویارسلام افزایش یافت. بیشترین اثر افزایشی در دو گونه‌ی مورد بررسی مربوط به تیمار ۴۸ گرم از بقایا بود (شکل ۱۴). تجمع پرولین در گیاهان مورد بررسی در حضور تنش مواد آللوپاتیک اویارسلام می‌تواند به‌واسطه تجزیه پروتئین‌ها، سنتز پرولین و غیرفعال شدن تخریب آن باشد (Abdel Latef et al., 2017). پرولین یکی از اسیدآمین‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون سلولی گیاه نقش به‌سزایی دارد (Bundig et al., 2017). اسیدآمین پرولین در شرایط تنش با مهار انواع فعال اکسیژن نقش مهمی در حفظ ساختار پروتئین‌های غشا، کارکرد سلول و کاهش نشت الکترولیت‌ها دارد. پرولین نقش کلیدی در تنظیم اسمزی و حفظ ساختار سلولی و مهار انواع فعال اکسیژن بازی می‌کند (Kaur & Asthir, 2015). بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در برگ دو گونه‌ی مورد بررسی بیانگر اثر افزایشی مقادیر بقایای اویارسلام بر این مشخصه بود (شکل ۱۵). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌تواند منجر به مهار کارآمد پراکسید هیدروژن تحت تنش اکسیداتیو ناشی از بقایای اویارسلام باشد. در شرایط تنش‌های اکسیداتیو، اسید آسبیزیک موجب افزایش بیان ژن‌ها می‌گردد که این ژن‌ها باعث رمزگذاری و افزایش آنزیم‌های پاداکساینده نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز می‌شوند (Ghanaatiyan and Sadeghi, 2017). سیستم دفاعی در مقابل انواع فعال اکسیژن به‌طور عمده شامل مکانیسم‌های دفاع آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز) و ترکیبات اکساینده غیرآنزیمی (آسکوربیک، گلووتاتیون) است (Namdjoyan et al., 2017).



شکل ۱۵: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای فعالیت آنزیم کاتالاز نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

شکل ۱۴: اثر مقادیر مختلف بقایای علف‌هرز اویارسلام بر محتوای پروتئین نیلوفرپیچ و خربزه وحشی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌داری تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون PLSD در سه تکرار

## نتیجه‌گیری کلی

مطابق نتایج، شدت اثر آللوپاتیکی علف‌هرز اویارسلام بر دو علف‌هرز مهاجم نیلوفرپیچ و خربزه وحشی بسته به مقادیر بقایای گیاهی علف‌هرز مورد بررسی در خاک متفاوت بود. صفاتی نظیر درصد و نرخ جوانه‌زنی، سطح برگ، وزن تر و خشک گیاه همچنین رنگیزه فتوسنتزی در هر دو گونه همراه با افزایش محتوای بقایای اویارسلام در خاک، روند کاهشی نشان داد. کاهش شدیدتر مولفه‌های رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تنش آللوپاتیک ترکیبات بقایای اویارسلام، حساسیت بیشتر گونه را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد این گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای کاروتنوئیدها به تنش اکسایشی ایجاد شده ناشی از اثرات آللوپاتیک اویارسلام پاسخ نشان می‌دهند اما این ویژگی‌های محافظتی فیزیولوژیک گیاهان مورد بررسی کافی و مناسب نیست. بنابراین علف‌هرز اویارسلام در مزارع با توجه به زیتوده بالا و هم‌چنین وجود اثرات آللوپاتیکی می‌تواند به‌عنوان کاندیدی قابل تامل برای تولید علف‌کش‌ها با منشاء زیستی در نظر گرفته شود. این مساله نیازمند بررسی‌های بیشتر و هم‌چنین تجزیه فیتوشیمی ترکیبات موجود در این علف‌هرز می‌باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان تشکر و قدردانی صمیمانه خود را نسبت به کارشناس محترم آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی جناب آقای مهندس بابایی کمک و مساعدت در فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی ابراز می‌دارند.

## منابع

- اجتهادی، ح.، سپهری، ع. و عکافی، ح.ر. (۱۳۹۲) روش‌های اندازه‌گیری تنوع زیستی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۳۰ صفحه.
- بهداد، آ.، ابریشم چی، پ. و جنگجو، م. (۱۳۹۴) ارتباط فنولوژی، محتوای ترکیبات فنلی و خاصیت آلودگایی در گیاه درمنه خراسانی (*Artemisia khorassanica* Karshfha) و اثر آن بر رشد و فیزیولوژی گیاهچه بروموس کپه داغی (*Bromus kopetdaghensis* Drobov). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۶(۲۴): ۳۶-۳۱.
- پور حیدر غفاری، س.، اسلامی، س.، حسن نژاد، س.، علی زاده، ح. و زمانی، غ.ر. (۱۳۹۱) اثر آلودگی چاودار روی ذرت شیرین (*Secale sp*) و برخی علف‌های هرز مهم آن. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار ۲۲(۱).
- تاتاری، م.، غلامعلی پور علمداری، ا.، اورسجی، ز. و زارعی، م. (۱۳۹۸) بررسی پتانسیل دگرآسیبی عصاره آبی اندام‌های مختلف پنیرک (*Malva sylvestris* L.) بر کاسنی (*Cichorium intybus* L.) و سوروف (*Echinochloa crus-galli* L.). نشریه حفاظت زیست بوم گیاهان ۷(۱۵): ۱۲۳-۱۰۷.
- پورنمازی، ع.ر.، غلامعلی پور علمداری، ا.، بیابانی، ع. و طلایی، ف. (۱۳۹۸) ارزیابی توان بالقوه دگرآسیبی برخی از علف‌های هرز بر خصوصیات جوانه‌زنی و رنگیزه فتوسنتزی گیاهچه شاهی. مجله پژوهش‌های بذر ایران ۶(۱): ۱۴۳-۱۲۹.
- حسن سلطان، ت.، نوروزی، م. و آموزگار، م.ع. (۱۳۹۵) بررسی محتوای کلروفیل a و b و توتال کاروتنوئید و هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار گونه جلبک سبز جدا شده از سواحل گلستان دریای خزر. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-ملکولی ۲۶(۶): ۳۶-۳۱.
- دانشمند، ف. (۱۳۹۳) تأثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی. مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران) ۷(۳): ۴۲۶-۴۱۷.
- سیدی، س.م.، رضوانی مقدم، پ.، شهریاری، ر. و آزاد، م. (۱۳۹۴) اثر دگرآسیبی اندام‌های مختلف کرچک (*Ricinus communis* L.) در کاهش جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌های سس (*Cuscuta campestris* Yuncker). نشریه بوم‌شناسی کشاورزی ۷(۲): ۱۶۷-۱۵۶.
- عامری، ع.ا.، ربانی نسب، ح.ا.، جلیلود، م.ر. و ایمانی، م. (۱۳۹۱) اثرات دگرآسیبی (آلودگایی) چند گونه علف‌های هرز روی جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis*). مجله علوم پزشکی خراسان شمالی (ویژه‌نامه فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی) ۴: ۳۲-۲۳.
- عبدی، س. و عابدی، ر. (۱۳۹۸) مدل‌سازی رگرسیونی غیرخطی رفتار جوانه‌زنی بذور چاوداروحشی و دمرابهی تحت اثرات دگرآسیبی گیاهان نعنای فلفلی، کاسنی و مریم گلی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۲(۳): ۵۸۱-۵۷۳.

علی سلطانی، ا.، علیزاده، ه.، محفوظی، س. و خیالپرست، ف. (۱۳۹۱) اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت سرماسازگاری بر خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم بهاره و زمستانه گندم نان (*Triticum aestivum* L.). مجله علوم زراعی ایران ۱۴(۲): ۱۲۰-۱۰۸.

فرهودی، ر.، کوروش‌نژاد، ن. و مدحج، ع. (۱۳۹۳) بررسی تاثیر عصاره آبی گندم (*Triticum aestivum*) بر جوانه زنی، رشد رویشی، تخریب غشای سلولی، فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و ساکاروز سنتتاز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*). مجله حفاظت گیاهان، ۲۸: ۱۴۷-۱۵۰.

قهرمان، ا. (۱۳۷۳) کورموفیت‌های ایران. جلد چهارم، مرکز نشر دانشگاه تهران، ۶۱۸ صفحه.

کریمی آرپناهی، ن.، اسلامی، س.و. و دهقان خلیلی، ر. (۱۳۹۶) بررسی تأثیر تنش خشکی بر رشد و پراکنش علف‌هرز اویارسلام ارغوانی (*Cyperus rotundus* L.). نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) ۳۱(۱): ۲۹-۳۹.

Abdel Latef, A.A.H., Srivastava, A.K., Abd El-Sadek, M.S., Kordrostami, M. and Tran, L.P. (2017) Titanium dioxide nanoparticles improve growth and enhance tolerance of broad bean plants under saline soil conditions. Land Degradation and Development 29(4): 1065-1073.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymology 105: 121-126. Academic Press.

Amoo, S.O., Ojo, A.U. and Van Staden, J. (2008) Allelopathic potential of Tetrapleura tetraptera leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. South African Journal of Botany 74: 149-152.

Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24: 1-15.

Azadbakht, A., Mahmoodi, S., Amraie, R., Amraei, B. and Nasrollahi, H. (2013) Evaluation the allelopathic effects of aerial and underground extract of sunflower (*Helianthus annus* L.) on germination characteristics and seedling growth of Hoary cress (*Cardaria draba*). Annals of Biological Research 4(5):188-195.

Bates, L.S., Walderen, R.D., and Taere, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Belel, M.D. and Rahimatu, D.B. (2012) Allelopathic effect of *Cyperus tuberosus* seed and leaf extract on seedling growth of groundnuts (*Arachis hypogaea*). Journal of Agriculture and Social Sciences 8: 87-91.

Bundig, C., Vu, T.H., Meise, P., Seddig, S., Schum, A. and Winkelmann, T. (2016) Variability in osmotic stress tolerance of starch potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) as revealed by an in vitro screening: role of proline, osmotic adjustment and drought response in pot trials. Journal of Agronomy and Crop Science 203: 206-218.

FAO. 2010. The Lurking menace of weeds. <http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/>. 30. (View date in web site, 14 May 2020)

Farhoudi, R. and Lee, D. (2013) Allelopathic effects of barley extract (*Hordeum vulgare*) on sucrose synthase activity, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activities of *Hordeum spontaneum* and *Avena ludoviciana*. Proceedings of the National Academy of Science 80(1): 213-220.

Friedman, T. and Horowitz, M. (1971) Biologically active substances in subterranean parts of purple nutsedge. Weed Science 19: 389-401.

- Ghanaatiyan, K. and Sadeghi, H. (2017) Differential responses of chicory ecotypes exposed to drought stress in relation to enzymatic and non-enzymatic antioxidants as well as ABA concentration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 92: 404-410.
- Gholamalipour Alamdari, A. (2011) Preliminary phytoconstituents screening of some weeds and their potential toxicity on rice variety-Tarom via decomposition bioassay. *International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology*. vol.16, IACSIT Press, Singapore.
- Gomes, I.S., Oliveira, C.S., Pelosi, A.P., Pacheco, L.C.P.S., Benett, C.G.S. and Benett, K.S.S. (2016) Evaluation of physiological quality of lettuce and rocket salad seeds in the presence of purple nutsedge extract. *African Journal of Agricultural Research* 11(21): 1887-1893.
- Gulzar, A., Siddiqui, M.B. and Bi, S. (2016) Phenolic acid allelochemicals induced morphological, ultrastructural, and cytological modification on *Cassia sophora* L. and *Allium cepa* L. *Protoplasma* 253(5): 1211–1221.
- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V. and Herberger, J.P. (1977) *The world worst weed distribution and biology*. University Press of Hawaii. Honolulu, Hawaii USA, 610 Pp.
- Kala, S. (2015) Effect of NaCl salt stress on antioxidant enzymes of isabgol (*Plantago ovata* forsk.) genotypes. *International Journal of Scientific and Technology Research* 4: 40-43.
- Kaur, G. and Asthir, B. (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59: 609-619.
- Lorenzo, P., Palomera-Pérez, A., Reigosa, M.J. and González, L. (2011) Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata* Link on the physiological parameters of native understory species. *Plant Ecology* 212: 403-411.
- Marinov-Serafimov, P. (2010) Determination of allelopathic effect of some invasive weed species on germination and initial development of grain legume crops. *Pesticides and Phytomedicine* 25(3): 251-259.
- Mishra, A., Mandoli, A. and Jha, B. (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolate from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1093-1101.
- Mushtaq, W., Ain, Q., Siddiqui, M.B. and Hakeem, K.R. (2019) Cytotoxic allelochemicals induce ultrastructural modifications in *Cassia tora* L. and mitotic changes in *Allium cepa* L.: a weed versus weed allelopathy approach. *Protoplasma* 256: 857–871.
- Namdjoyan, S., Kermanian, H., Soorki, A.A., Tabatabaei, S.M. and Elyasi, N. (2017) Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide in alleviating zinc toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Ecotoxicology* 26(6):752-761.
- Pudelko, K., Majchrzak, L. and Narozna, D. (2014) Allelopathic effect of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) on monocot and dicot plant species. *Industrial Crops and Products* 56: 191–199.
- Ravlic, M., Balicevic, B., Nikolic, M. and Sarajlic, A. (2015) Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sageon weed species hoary cress (*Lepidium draba*). *Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 44(1): 48-52.
- Rawat, L.S., Maikhuri, R.K., Negi, V.S., Bahuguna, Y.M., Pharswan, D.S. and Maletha, A. (2016) Allelopathic performance of medicinal plants on traditional oilseed and pulse crop of Central Himalaya, India. *National Academy Science Letters* 39(3):141–144.
- Sturm, D.J., Kunz, C. and Grehards, R. (2016) Inhibitory effects of cover mulch on germination and growth of *Stellaria media* (L.) Vill., *Chenopodium album* L. and *Matricaria chamomilla* L. *Crop Protection* 90: 121-130.

- Weir, T.L., Park, S.W. and Vivanco, J.M. (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472-479.
- Young, A.J. (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 83: 702-708.
- Yousefi, A.R., Oveisi, M. and Gonzalez-Andujar, J.L. (2014) Prediction of annual weed seed emergence in garlic (*Allium sativum* L.) using soil thermal time. *Journal of Horticultural Science* 168: 189-192.
- Zuo, S., Li, X., Ma, Y. and Yang, S. (2014) Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant and Soil* 378: 49-58.

**Evaluation of allelopathic stress of *Cyperus esculentus* remains on some invasive weeds**A. Saeedipour<sup>1</sup>, E. Gholamalipour Alamdari<sup>2\*</sup>, A. Biabani<sup>3</sup>, Z. Avarseji<sup>4</sup>, A. Nakhzari Moghadam<sup>5</sup>

Received:2020.1.31

Accepted:2020.9.28

**Abstract**

Due to the plant production of biological active compounds, allelopathy is formed from plants or their remnants. This has some effects on germination, growth and development of the same species or other species. For this purpose, an experiment was conducted to evaluate the allelopathic stress of different amounts of *Cyperus esculentus* weed remains (0, 12, 24, 36 and 48 g per 3 Kg loamy soil) on germination and morphophysiological characteristics of aggressive weeds of *Ipomoea tricolor* and *Cucumis melo*. This experiment was done in the form of two separated experiments in a completely randomized design with five treatments and three replications in the pot condition. Findings showed that the intensity of allelopathic effects of *C. esculentus* on two weeds of *I. tricolor* and *C. melo* was decreasing and significant based on the amount of residue of *C. esculentus* in the soil. So that traits such as rate and germination percentage, leaf area, fresh and dry weight of root, stem, leaf and also the content of chlorophyll a, b, total and carotenoids in *I. tricolor* more affected under allelopathic compounds of different plant residues of *C. esculentus* as compared to control. Studying the trend of changes in proline content and catalase activity in *I. tricolor* and *C. melo* also indicates some characteristics such as increasing values of *C. esculentus* remnants. Lower photosynthetic pigments and more severe reduction of germination and growth traits in *I. tricolor* as compared to *C. melo* can be testify to the greater sensitivity of these species in the presence of allelopathic substances of *C. esculentus*. Due to the high biomass on farms, its proved allelopathic effect *C. esculentus* can be a candidate for the production of biological derived herbicides.

**Keywords:** Allelopathic effect, Catalase enzyme activity, Chlorophyll pigments, Leaf area, Leaf dry weight, Root fresh weight.

---

1- MSc. in Weeds Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

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

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

3- Associate Professor, Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

4- Assistance Professor of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

5- Assistance Professor, Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

## بررسی ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ گونه‌های *Anemone L.* و *Pulsatilla Mill.* (Ranunculaceae) در ایران

محدثه شجاعی<sup>۱</sup>، فریبا شریف‌نیا<sup>۲\*</sup>، مصطفی اسدی<sup>۲</sup>، ایرج مهرگان<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

### چکیده

در این مطالعه ۹ آرایه متعلق به جنس‌های *Anemone* و *Pulsatilla* تحت بررسی‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ گرفته‌اند تا به اهمیت این صفات در شناسایی آرایه‌های این جنس‌ها پی برده شود. برای دستیابی به یافته‌های دقیق‌تر از بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نیز بهره برده‌ایم. صفات متعدد اندازه، شکل و نوک برگ‌ها، ویژگی‌های کرک، الگوی اپیدرمی، شکل قطعات برگ و... مورد بررسی قرار گرفتند که براساس شکل برگ‌ها چهار شکل: سه بخشی عمیق، سه بخشی پنجه‌ای شکل، سه بخشی مضاعف، شانه‌ای و براساس الگوی اپیدرمی چهار تیپ: مخطط، مشبک، چروکیده و بدون طرح مشاهده شد. با استفاده از آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) صفاتی از جمله طول، شکل کلی، الگوی اپیدرمی و شکل قطعات برگ دارای بیشترین تفاوت هستند و قابلیت جداسازی گونه‌ها و حتی واریته‌ها را دارند همچنین در فنوگرام نیز جدایی آرایه‌ها به خوبی مشاهده می‌شود.

**واژه های کلیدی:** آرایه، الگوی اپیدرمی، شکل برگ، میکروسکوپ الکترونی نگاره

### مقدمه

تیره‌ی Ranunculaceae دارای ۵ زیر تیره، ۴۳ جنس و ۲۳۴۶ گونه است (Christenhusz & Byng, 2016). دو جنس *Anemone L.* و *Pulsatilla Mill.* متعلق به زیر قبیله‌ی *Anemonineae* و قبیله‌ی *Anemoneae* از تیره آلاله-ایان (Ranunculaceae) هستند. *Anemone s.str.* شامل ۱۱۸ گونه در ۱۵ زیر جنس و ۲۳ بخش، با پراکنش در سراسر دنیا اما به طور غالب در نیمکره‌ی شمالی است (Ziman et al., 2008). بعضی از گونه‌های *Anemone* از نظر زینتی دارای اهمیت هستند از جمله گونه‌ی *A. coronaria L.* که دارای کولتیوارهایی به رنگ‌های سفید، بنفش، قرمز و صورتی می‌باشد. جنس *Pulsatilla*

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

۲- دانشیار زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* نویسنده‌ی مسئول: f\_sharifnia@iau-tnb.ac.ir

۳- استاد پژوهش، موسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران

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

نیز دارای ۳۵ گونه در اروپا، ترکیه، ایران، روسیه و آسیای مرکزی است. دو جنس مذکور دارای دو نوع برگ هستند: برگ‌های قاعده‌ای با تعداد متفاوت، دم‌برگ‌دار و برگ‌های گریبان با آرایش فراهم، دو تا سه عدد، دارای دم‌برگ یا فاقد آن.

در فلورا ایرانیکا به ۱۷ گونه از جنس *Anemone* اشاره شده است که پنج گونه از آن متعلق به ایران است (Rechinger 1992, Riedl, 1992). هرچند که در طی سال‌های اخیر گونه‌ی *A. tschernajaewii* Regel. در شرق و شمال شرق ایران (Joharchi 2011, Akhani, 2006, Joharchi et al., 2011) و گونه‌ی *A. narcissiflora* L. در شمال غرب ایران (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰) گزارش شده است. براساس مطالعات (Ziman et al. 1998) و حیدری (۱۳۸۶) گونه‌ی *A. petiolulosa* Juz. که به‌عنوان یک گونه‌ی مجزا در فلورا ایرانیکا و فلور شوروی است، به عنوان واریته‌ای از گونه‌ی *A. biflora* DC. معرفی شده است. هم‌چنین آرایه‌ی *A. gortschakowii* Kar. & Kir. نیز در فلور شوروی (Komarov, 1937) و رستنی‌های ایران (مبین، ۱۳۶۴) به‌عنوان یک گونه‌ی مجزا در نظر گرفته شده اما براساس مطالعه‌ی Sinno-Saoud et al. (2007) مرتبه واریته گزارش شده است. فلورا ایرانیکا ۳ گونه از جنس *Pulsatilla* را نام برده است که تنها یک گونه از آن (*P. albana* (Stev.) Bercht & j. Presi) در ایران رویش دارد (Rechinger & Riedl, 1992).

با توجه به تنوع زیاد و پراکنش گسترده، جنس *Anemone* بیش از صد سال است که موضوع مطالعه‌ی محققان مختلفی بوده و طبقه‌بندی و تعداد گونه‌ی متفاوتی برای این جنس ارائه شده است. گروه اول از این مطالعات مبتنی بر صفات ریخت‌شناسی، کاربولوجی، تشریح و گرده‌شناسی است (Ulbrich, 1905/1906, Ziman et al., 1998; 2008; 2011, Tamura, 1993; 1995, Rasmussen, 1979, Stroductsev, 1991, Manning & Goldblatt, 2013). براساس همین صفات چند جنس را از *Anemone* جدا کردند. Stroductsev (1991) برپایه کاربولوجی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی، جنس *Anemone* را به هفت جنس مجزا تقسیم کرده اند. هشت گونه‌ی متعلق به جنس *Knowltonia* (دارای میوه گوشتی) از جنس *Anemone* (دارای میوه خشک) تنها براساس نوع میوه صورت گرفته است (Rasmussen, 1979). حیدری (۱۳۸۶) صفات تشریحی دم‌برگ و ساقه و ویژگی‌های دانه‌گرده‌ی ۵ گونه‌ی *Anemone* در ایران را مورد بررسی قرار داده است و صفاتی همچون تعداد و آرایش دستجات آوندی دم‌برگ، تعداد لایه‌های فیبری و تیپ بافت مکانیکی اطراف دسته‌ی آوندی را صفات تشخیصی معرفی کرده است.

ویژگی‌های ریخت‌شناسی برگ *Anemone* نیز همواره دارای اهمیت بوده است به طور مثال دو جنس *Barneoudia* و *Oreithales* که از *Anemone* مجزا شده‌اند (Lourteigh, 1951; 1956) و این جدایی تنها براساس ویژگی‌های برگ از جمله فقدان برگ‌های قاعده‌ای در زمان گلدهی در جنس *Barneoudia* و فقدان برگ‌های گریبان در جنس *Oreithales* بوده است. هم‌چنین صفات متعدد ریخت‌شناسی از جمله ویژگی‌های برگ‌های قاعده‌ای و گریبان به عنوان صفات مهم تشخیصی برای شناسایی ده گونه‌ی *Anemone* متعلق به ناحیه بالکان معرفی شده است (Ziman et al., 2011).

در سال‌های اخیر صفات ریزریخت‌شناسی نیز مورد توجه قرار گرفته و این گونه مطالعات بیشتر بر روی میوه بوده است (Cheng et al., 2015, Rutkowska & Antkowiak 2013, Chaudhary & Trifonova, 1988, Ziman et al., 2008). ساختار داخلی و خارجی میوه در نود و پنج آرایه‌ی متعلق به بیست و هفت جنس تیره رانونکولاسه در چین مورد مطالعه قرار گرفته است؛ براساس ویژگی‌های میوه، جنس‌های این تیره به چهار گروه تقسیم شدند و دو جنس *Anemone* و *Pulsatilla* در گروه چهارم با داشتن میوه‌ی فندقه با دو دسته‌ی آوندی غیرمنشعب و اندوکارپ با یک لایه‌ی فیبری ویژگی یافته است (Cheng et al., 2015). شجاعی و همکاران (تحت چاپ) نیز به بررسی ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و تشریح فندقه‌ی گونه‌های ایرانی *Anemone* و *Pulsatilla* پرداختند و تفاوت‌های آشکاری در الگوی سطح فندقه (achene body)، تعداد لایه‌های اندوکارپ و مزوکارپ و هم‌چنین طول و شکل خامه مشاهده کردند و این صفات را دارای ارزش تشخیصی معرفی کردند.

گروه دوم مطالعات مبتنی بر داده‌های مولکولی است (Hoot et al., 1994; 1995; 2012, Ehrendorfer & Samuel, 2009, Meyer et al., 2010). (Hoot et al., 2012). با مطالعه‌ی نواحی ITS هسته‌ای و *atpB-rbcL* کلروپلاستی بر روی گونه‌های *Anemone* خصوصاً گونه‌های متعلق به نیمکره جنوبی، از تک نیایی بودن *Anemone* حمایت کردند و برخلاف سایر طبقه‌بندی‌ها تنها دو زیرجنس *Anemone* (X=8) و *Anemonidium* (x=7) را در *Anemone* تشخیص دادند. زیرجنس *Anemonidium* شامل بخشه‌های *Hepatica*, *Keiskea*, *Anemonidium* و *Omalocarpous* و زیر جنس *Anemone* شامل بخشه‌های *Pulsatilloides*, *Pulsatilla*, *Rivularidium* و *Anemone* است.

گروه سوم مطالعات مبتنی بر ترکیبی از مطالعات هستند، البته تعداد این مطالعات کم می‌باشد. (Zhang et al., 2015). با استفاده از داده‌های گرده‌شناسی، سیتولوژی و سیستماتیک مولکولی به مطالعه‌ی بخشه‌ی *Begoniifolia* از جنس *Anemone* پرداخته است و در بین آرایه‌های مورد مطالعه سه تیپ گرده‌ی سه‌شیری، شش‌شیری و پنج‌منفذی با کاربوتیپ  $2n=(10m+4st+2t)$  مشاهده کرده است و در بررسی‌های توالی DNA هسته‌ای و کلروپلاستی دو کلاد شامل دو زیرجنس *Anemone* و *Anemonidium* را تشخیص داده است.

به سه دلیل مطالعه‌ی این دو جنس در ایران دارای اهمیت است:

(۱) ایران پراکنش انتهایی چندین گونه‌ی *Anemone* و محل تلاقی آرایه‌های آسیایی با آرایه‌های اروپایی است. به طور مثال آخرین مرز پراکنش شرقی گونه *A. coronaria* که در اروپا و عراق رویش دارد، نواحی غربی ایران است. هم‌چنین مرز جنوبی پراکنش *A. caucasica* Willd. ex Rupr. ناحیه‌ی هیرکانی در ایران است. *A. biflora* از کشورهای شرقی به ایران وارد شده و با عبور از مناطق مرکزی ایران وارد عراق می‌شود و دیگر در اروپا دیده نمی‌شود. *A. biflora* var. *petiolulosa* (Juz.)

Ziman. نیز از شرق وارد ایران می‌شود و حداکثر تا سمنان کشیده شده است. *A. tschernjaewii* از شمال شرقی کشور وارد شده است و تنها در شرق و شمال شرق ایران یافت می‌شود.

(۲) تعیین جایگاه دقیق گونه‌ی *P. albana* که همواره مورد بحث در بین گیاه‌شناسان بوده است. بعضی از محققین بر این اعتقادند که این گونه باید در جنس *Pulsatilla* قرار گیرد (مبین، ۱۳۶۴، Rechinger & Riedl, 1992, Yaprak et al., 2011, Komarov, 1937) و برخی دیگر آن را در میان گونه‌های *Anemone* ذکر می‌کنند (Davis, Parsa, 1951, Boissier, 1867). (1965).

(۳) کمبود مطالعه‌ی جنس *Anemone* در ایران و حتی در آسیا، در حالی که اکثر مطالعات بر روی گونه‌های متعلق به نیمکره‌ی جنوبی انجام شده است.

در این مطالعه ۹ آرایه از جنس‌های مذکور تحت مطالعه‌ی ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) قرار گرفتند.

## مواد و روش کار

آرایه‌های مورد بررسی متعلق به نمونه‌های هرباریومی موسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (TARI) هستند، لیست گونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

پس از اطمینان از شناسایی گونه‌ها با استفاده از فلورهای ایرانیکا، ترکیه، عراق، شوری و رستنی‌های ایران، برگ‌ها تحت مطالعه‌ی ماکروسکوپی و عکس‌برداری قرار گرفتند. برای بررسی دقیق‌تر از لوپ و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مدل Hitachi استفاده شد. در این روش ابتدا سطح پشتی برگ‌ها را با کمک برس مویی تمیز کردیم و روی پایه‌های مخصوصی چسباندیم و پس از فریز شدن به وسیله دستگاه اندودکننده، با لایه‌ی نازکی از طلا پوشاندیم و سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد مشاهده قرار گرفتند. از هر نمونه با ۳ بزرگنمایی x70، x200 و x400 عکس‌برداری شد.

صفات متعدد کمی و کیفی تعریف و کدگذاری شدند (جدول ۲) (شریف نیا و چلبیان، ۱۳۸۲). سپس با استفاده از نرم‌افزار مربوطه (IBM SPSS Statistics ver.22) آنالیز تجزیه‌ی خوشه‌ای (Cluster Analysis) به روش Average linkage و آنالیز تجزیه به عامل‌های اصلی (PCA) بر روی داده‌ها انجام گرفت.

جدول ۱: نمونه‌های مورد بررسی و محل جمع آوری و شماره هرباریومی آنها در مطالعات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ

| گونه                                      | محل جمع آوری و شماره‌ی هرباریومی                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>A. biflora</i> var. <i>biflora</i>     | <p>اراک، ۱۰ کیلومتری اراک به سمت بروجرد، در حاشیه‌ی روستای خانه میدان، ۲۳۰۰ متر، متقی (TARI)۴۲۸</p> <p>اصفهان، سمیرم، کوه دنا، بالای تنگه ریگان، ۲۴۰۰ متر، نوروزی (TARI)۲۰۹۱</p> <p>ایلام، ابدانان، اناران به سمت گرازان، ۱۵۲۰ متر، مظفریان (TARI)۹۳۱۶۱</p> <p>چهار محال و بختیاری، لردگان، ۱۸۷۰ متر، غلامیان (TARI)۳۵۲۶</p> <p>خراسان، ۹ کیلومتری بیرجند به سمت قوچان، ۱۷۸۰ متر، اسدی و معصومی (TARI)۵۵۶۴۷</p> <p>خراسان، ۷ کیلومتری مشهد به سمت کلات نادری، ۱۲۵۰ متر، اسدی و معصومی (TARI)۵۵۸۱۳</p> <p>خراسان، جاده گرگان- بجنورد، قبل از روستای رباط قرابیل، ۱۰۵۰ متر، اسدی و شهسواری (TARI)۶۹۱۲۷</p> <p>زنجان، کوه قیداری، ۲۰۰۰-۲۵۰۰ متر، باقری (TARI)۹۸۲۶۸</p> <p>فارس، اقلید، کیلومتر ۱۸ سد دورودزن به سمت اقلید، ۲۱۵۰ متر، زندی (TARI)۸۲۴۵</p> <p>قزوین، شجاع‌الدین، عبدالآباد، ۲۵۰۰ متر، چرخ چیان (TARI)۱۲۳۳*</p> <p>کرمان، سیرچ بالای تونل، کوه سرو، ۲۷۰۰ متر، غنچه ای (TARI)۵۶۱۲</p> <p>کرمان، کوهپایه، دهانه‌ی کوه آبشار، ۲۸۰۰ متر، غنچه ای (TARI)۵۵۹۸</p> <p>کرمانشاه، کوه پارو، ۱۷۰۰- ۲۰۰۰ متر، وندل و اسدی (TARI)۱۶۷۳۰</p> <p>گلستان، گرگان، ۱۲ کیلومتری شرق مراوه تپه، ۲۵۰ متر، اسدی و شهسواری (TARI)۶۹۲۰۵</p> <p>همدان، ۱۰ کیلومتر غرب نهاوند، جنگل کیان، کوه گرین، ۱۶۵۰-۱۸۰۰ متر، صفی خانی و علی دادی (TARI)۲۴۶۶</p> <p>همدان، ۱۵ کیلومتری ملایر به سمت همدان، جاده سیاه کمر، روستای بارابند، ۲۳۰۰-۲۳۷۰ متر، کالوندی و رزاقی (TARI)۵۵۴۴</p> |
| <i>A. biflora</i> var. <i>petiolulosa</i> | <p>اراک، ۳ کیلومتری جنوب شرقی شازند، کوه چال خاتون، ۲۵۰۰-۲۱۰۰ متر، آخانی (TARI)۸۳۵</p> <p>اصفهان، به سمت دلیجان وموته، ۲۰۰۰ متر، باباخانلو (TARI)۱۷۶۲۴</p> <p>تهران، ۷۳ کیلومتری از تهرانبه سمت قم، ۱۳۹۰ متر، وندل و معصومی (TARI)۱۹۰۲۶</p> <p>تهران، کوه برف خانه، ۲۸۰۰-۲۳۰۰ متر، وندلبو و اسدی (TARI)۱۶۴۶۹</p> <p>خراسان، مشهد به سمت قوچان، چناران، برفاب های بینالود، ۲۰۰۰-۱۵۰۰ متر، جم زاد، مظهری، پاریاب و امیرآبادی (TARI)۷۵۷۷۷*</p> <p>خراسان، جاده گرگان- بجنورد، نرسیده به روستای رباط قرابیل، ۱۰۵۰ متر، اسدی و شهسواری (TARI)۶۹۱۲۷</p> <p>خراسان، حدود ۲۹ کیلومتری غرب کلات نادری، نزدیک سلطان آباد، ۸۵۰ متر، اسدی و معصومی (TARI)۵۵۷۷۵</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|                                                                                                                   |                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| سمنان، شاه پسند به سمت شاه‌رود، ۱۸۰۰ متر، مندل، فروغی، ثانی و شیدل پور ۱۱۴۴ (TARI)                                |                                             |
| سمنان، منطقه حفاظت شده‌ی توران، کوه پیغمبر، ۲۲۰۰-۱۵۰۰ متر، Freitag و جویدی ۲۹۰۸۶ (TARI)                           |                                             |
| فارس، ۳۳ کیلومتری از بابا میدان به سمت یاسوج، ۲۰۰۰ متر، اسدی و ابوحمز ۳۸۴۲۴ (TARI)                                |                                             |
| فارس، ۶۰ کیلومتری جنوب آباده، کوه بول، نزدیک اقلید، ۲۸۰۰ متر، فروغی ۱۷۳۱۸ (TARI)                                  |                                             |
| کهگلویه و بویر احمد، یاسوج نزدیک آبشار، ۱۸۰۰ متر، اسدی و ابوحمز ۳۸۴۴۰ (TARI)                                      |                                             |
| گلستان، گرگان، ۳ کیلومتری شرق مراوه تپه، ۲۵۰ متر، Hewe ۳۵۹۸ (TARI)                                                | A. <i>biflora</i> var. <i>gortschakowii</i> |
| خراسان، ۴۵ کیلومتری شمال شیروان، ۳۰۰۰-۲۳۰۰ متر، اسدی و معصومی ۵۰۴۱۳ (TARI)                                        |                                             |
| گلستان، گرگان، ۹۰ کیلومتری شرق مراوه تپه، ۳۰۰ متر، اسدی و معصومی ۵۵۴۷۶ (TARI)*                                    |                                             |
| تهران به سمت کرج، ۲۰۰۰ متر، اسدی، مظفریان و وثوقی ۳۳۳۷۵ (TARI)                                                    |                                             |
| آذربایجان، ماکو به سمت خوی، کوه‌های جنوب غرب کلیسای کندی، ۲۶۵۰-۲۴۰۰ متر، اسدی و مظفریان ۳۰۳۱۳ (TARI)*             | A. <i>narcissiflora</i>                     |
| آذربایجان، حدودا ۳۰ کیلومتری شمال شرقی مرند، روستای کوه کمر، ۲۰۰۰-۲۶۰۰ متر، اسدی و شهسواری ۶۵۶۲۷ (TARI)           |                                             |
| آذربایجان، مرند، کوه سلطان جهانگیر، ۲۵۰۰ متر، اکرمی و مظفریان ۹۳۸۱۵ (TARI)                                        |                                             |
| آذربایجان، اسلام به سمت خلخال، ۲۳۰۰ متر، وندل و اسدی ۲۷۸۰۱ (TARI)                                                 | P. <i>albana</i>                            |
| آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، ۲۰۰۰-۲۳۰۰ متر، اسدی و معصومی، ۲۰۲۶۳ (TARI)*                                  |                                             |
| آذربایجان، جاده اسلام به سمت خلخال، گردنه آلماس، ۲۴۰۰-۲۳۵۰ متر، وندل و اسدی، ۱۸۵۱۲ (TARI)                         |                                             |
| آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، ۲۳۰۰-۲۵۰۰ متر، اسدی و سردابی، ۲۴۱۰۸ (TARI)                                   |                                             |
| آذربایجان، ماکو به خوی، کوه‌های جنوب غربی کلیسای کندی، ۲۴۰۰-۲۶۵۰ متر، اسدی و مظفریان ۳۰۳۱۲ (TARI)                 |                                             |
| خوزستان، شوشتر، ۳۷ کیلومتری جاده اهواز، ۹۰۰ متر، فروغی، ۳۰۸۹ (TARI)                                               | A. <i>coronaria</i>                         |
| کرمانشاه، ۱۵۰ کیلومتر شمال غرب کرمانشاه به سمت بابایادگار، ۱۳۰۰ متر، شوشتری و حاتمی ۲۵۷۳ (TARI)                   |                                             |
| کرمانشاه، ۱۵۰ کیلومتری از اسلام آباد به سمت ایلام، تنگه دالاب، روستای گلزار، ۱۴۶۰ متر، شوشتری و حاتمی ۲۲۲۹ (TARI) |                                             |
| کرمانشاه، ۲۴ کیلومتری از گیلانغرب به سمت سومار، ۸۷۰ متر، نعمتی و روشن زاده ۳۷۳۴ (TARI)                            |                                             |
| کرمانشاه، اسلام آباد غرب، ۴۰ کیلومتری اسلام آباد به سمت ایلام، ۱۵۰۰ متر، فتاحی، توکلی و زنگنه ۲۵۹۷ (TARI)         |                                             |
| کرمانشاه، حاشیه رودخانه گراسو، نزدیک روستای گذارپی، ۱۲۴۵ متر، مظفریان ۹۳۹۸۸ (TARI)                                |                                             |
| کرمانشاه، ۱۵۰ کیلومتری شمال غرب کرمانشاه، بابایادگار، ۱۳۰۰ متر، شوشتری و حاتمی ۲۵۷۲ (TARI)*                       |                                             |
| کرمانشاه، ۴۵ کیلومتری غرب کرد، روستای ریجاب، ۹۰۰ متر، حاتمی ۲۵۶۱ (TARI)                                           |                                             |
| لرستان، خرم آباد، تنگه ملاوی، ۷۰۰ متر، فروغی ۳۰۷۹ (TARI)                                                          |                                             |
| مازندران، سیاه بیشه، جاده چالوس، ۲۱۲۰ متر، ثابتی ۳۶۸۸ (TARI)*                                                     | A. <i>blanda</i>                            |

|                         |                                                                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>A. caucasica</i>     | آذربایجان، اسالم به سمت خلخال، ۲۰۰۰ متر، وندل و معصومی ۱۹۱۰۵ (TARI)                                        |
|                         | آذربایجان، کالیبار به سمت مکیدی، ۱۷۰۰-۱۳۰۰ متر، وندل و اسدی ۱۷۰۰۷ (TARI)                                   |
|                         | سمنان، کوه قطری (کوه ابر)، شمال شاهرود، ۲۵۰۰ متر، وندل، فروغی، ثانی و شیردل پور ۱۱۱۷۱ (TARI)               |
|                         | فیروزکوه، پل ورش، ۱۷۲۰ متر، فروغی ۱۲۲۴ (TARI)                                                              |
|                         | مازندران، پل سفید، جنگل بالای روستای سنگ ده، ۲۲۰۰-۱۷۰۰ متر، اسدی ۷۳۲۸۷ (TARI)                              |
|                         | مازندران، جاده چالوس، ۲ کیلومتری سیاه بیشه، ۲۴۵۰ متر، Runemark و مظفریان ۲۸۰۷۷ (TARI)                      |
|                         | مازندران، جنوب رامسر، دره نی دشت، ۱۷۰۰ متر، وندل و معصومی ۱۹۱۴۵ (TARI)                                     |
|                         | مازندران، دره چالوس، بالای سیاه بیشه، ۲۲۰۰ متر، وندل و شیردل پور ۱۶۸۴ (TARI)                               |
|                         | مازندران، سیاه بیشه، جاده چالوس، کیلومتر ۳۹ به سمت مرزن آباد، ۲۰۵۰ متر، خاتم ساز و رحمان پور ۶۹۲۴۱ (TARI)* |
|                         | مازندران، سیاه بیشه، دره چالوس، ۲۳۶۰ متر، فروغی ۳۹۶ (TARI)                                                 |
| <i>A. tschernjaewii</i> | خراسان رضوی، ۵۰ کیلومتری مشهد به سمت کلات نادری، ۱۸۵۰ متر، اسدی و معصومی ۵۵۸۷۵ (TARI)*                     |

نمونه‌های مورد بررسی با SEM با \* نشان دار شده اند

## نتایج و بحث

بررسی‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ انجام شد و از ۷ صفت کمی و ۶ صفت کیفی برای مقایسه و ارزیابی آرایه‌ها استفاده گردید. کلیه اطلاعات کمی و کیفی به طور دقیق و با جزئیات معرفی و شرح داده شده است (جدول ۲ و ۳).  
 طی این بررسی‌ها نتایج زیر به دست آمد: بزرگترین میانگین طول و عرض پهنک برگ و تعداد برگ در گونه‌ی *A. narcissiflora* و کوچکترین طول و عرض پهنک برگ در *A. biflora* var. *gortschakowii* مشاهده شده است.  
 براساس شکل برگ، آرایه‌ها به ۴ گروه تقسیم می‌شوند: سه بخشی عمیق (triset) ، سه بخشی پنجه‌ای شکل (Palmately triset) ، سه بخشی مضاعف (Ternately compound) و شانه‌ای (Pinnaite).  
 براساس شکل نوک برگ ۳ حالت در بین نمونه‌ها مشاهده شده است: نوک کند (Obtuse)، نوک تیز (Acute) و نوک منقارک‌دار (Mucronate).

برگ‌ها در سه واریته‌ی *A. biflora* سه بخشی عمیق (triset) با نوک کند (obtuse) هستند که عمدتاً در واریته‌ی *gortschakowii* به علت تقسیمات عمیق به صورت سه بخشی پنجه‌ای شکل (palmately triset) به نظر می‌رسد، برگ گونه‌ی *A. tschernjaewii* نیز سه بخشی با تقسیمات عمیق (triset) و نوک منقارک‌دار (Mucronate). برگ *A. coronaria* به شکل سه بخشی مضاعف (Ternately compound) با نوک تیز (acute)، برگ *A. narcissiflora* سه تا پنج بخش پنجه‌ای شکل (Palmately 3-5 partite) با نوک کند (obtuse)، برگ *A. blanda* سه بخشی عمیق (triset) با قطعات دم‌برگ‌دار با نوک

کند (obtuse)، برگ *P. albana* ۲ تا ۳ بار شانه‌ای (2-3 pinnaite sect) با نوک کند (obtuse) و برگ *A. caucasica* سه بخشی عمیق (trisected) با نوک تیز (acute) می‌باشد (شکل ۱).

جدول ۲: صفات و داده‌های کمی برگ گونه‌های *Anemone* و *Pulsatilla* مورد مطالعه

| گونه                                           | میانگین طول<br>پهنک (mm) | میانگین عرض<br>پهنک (mm) | نسبت میانگین<br>طول به عرض<br>پهنک | تعداد<br>برگ | تعداد روزنه (در<br>0/1 mm <sup>2</sup> ) | میانگین<br>طول<br>کرک (mm) | میانگین طول<br>دمبرگچه (mm) |
|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------|------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>A. biflora</i> var.<br><i>biflora</i>       | ۱/۹                      | ۳/۱                      | ۰/۶۱                               | ۱-۲          | ۵                                        | ۰                          | ۱/۵                         |
| <i>A. biflora</i> var.<br><i>petiolulosa</i>   | ۳/۳                      | ۴/۲                      | ۰/۷۸                               | ۲-۳          | ۱۰                                       | ۰                          | ۶/۵                         |
| <i>A. biflora</i> var.<br><i>gortschakowii</i> | ۱/۵                      | ۱/۲                      | ۱/۲۵                               | ۲            | ۵                                        | ۰                          | ۰                           |
| <i>A. tschernjaewii</i>                        | ۴                        | ۴/۲                      | ۰/۹۵                               | ۲            | ۳                                        | ۰                          | ۰                           |
| <i>A. coronaria</i>                            | ۳/۵                      | ۲/۹                      | ۱/۲۰                               | ۴            | ۲                                        | ۰/۳۱                       | ۶                           |
| <i>A. blanda</i>                               | ۳                        | ۶                        | ۰/۵۰                               | ۳-۴          | ۲                                        | ۰/۳۱                       | ۶                           |
| <i>A. caucasica</i>                            | ۲/۱                      | ۴/۵                      | ۰/۴۶                               | ۲-۳          | ۲                                        | ۰/۲۹                       | ۰                           |
| <i>A. narcissiflora</i>                        | ۶/۵                      | ۶/۵                      | ۱                                  | ۹-۱۱         | ۸                                        | ۰/۸۰                       | ۰                           |
| <i>P. albana</i>                               | ۳                        | ۵                        | ۰/۷۰                               | ۳-۴          | ۱۲                                       | ۰/۶۲                       | ۰                           |

برگ نمونه‌های *A. biflora* var. *biflora*، *A. biflora* var. *petiolulosa*، *A. biflora* var. *gortschakowii* و *A. tschernjaewii* فاقد کرک و سایر نمونه‌ها دارای کرک هستند. بزرگترین میانگین طول کرک متعلق به *A. narcissiflora* و بیشترین تراکم کرک متعلق به *P. albana* است. قطعات برگ آرایه‌های *A. biflora* var. *biflora*، *A. biflora* var. *petiolulosa*، *A. blanda* و *A. coronaria* دارای دمبرگچه با طول متفاوت هستند که گسترده‌ترین بازه و میانگین طول دمبرگچه به نمونه‌های *A. biflora* var. *petiolulosa* تعلق دارد که بین ۳ تا ۱۳ میلیمتر متغیر است.

براساس الگوی اپیدرمی ۴ تیپ مشاهده شده است: تیپ ۱) مشبک (Reticulate) در آرایه‌های *A. biflora* var. *biflora*

*A. biflora* var. *petiolulosa*، *A. biflora* var. *gortschakowii* (اشکال ۲ و ۳).

تیپ ۲) بدون طرح (Simple) در آرایه‌ی *A. tschernjaewii* (شکل ۳).

تیپ ۳) چروکیده (Rugose) در آرایه‌های *A. coronaria*، *A. narcissiflora* و *P. albana* (اشکال ۲ و ۳).

تیپ ۴) مخطط (Striate) در آرایه‌های *A. blanda* و *A. caucasica* (شکل ۳).

جدول ۳: صفات و داده‌های کیفی برگ گونه‌های *Anemone* و *Pulsatilla* مورد مطالعه

| وجود یا عدم وجود دم‌برگچه | تراکم کرک   | شکل نوک برگ | شکل قطعات برگ  | شکل برگ                                    | الگوی اپیدرمی | گونه                                        |
|---------------------------|-------------|-------------|----------------|--------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------|
| Positive                  | Hairless    | Obtuse      | Pinnatifid     | Trisected or sometimes palmately trisected | Reticulate    | <i>A. biflora</i> var. <i>biflora</i>       |
| Positive                  | Hairless    | Obtuse      | Pinnatipartite | Trisected with long petiolule              | Reticulate    | <i>A. biflora</i> var. <i>petiolulosa</i>   |
| Negative                  | Hairless    | Obtuse      | Pinnatifid     | Palmately trisected sessile or sub sessile | Reticulate    | <i>A. biflora</i> var. <i>gortschakowii</i> |
| Negative                  | Hairless    | Mucronate   | Flabellate     | Trisect                                    | Simple        | <i>A. tschernjaewii</i>                     |
| Positive                  | Hairy       | Acute       | Pinnatipartite | Ternately compound with petiolule          | Rugose        | <i>A. coronaria</i>                         |
| Positive                  | Hairy above | Obtuse      | Flabellate     | Trisected with petiolule                   | Striate       | <i>A. blanda</i>                            |
| Negative                  | Hairy above | Acute       | Obovatos       | Trisect                                    | Striate       | <i>A. caucasica</i>                         |
| Negative                  | Hairy       | Obtuse      | Flabelliform   | Palmately 3-5 partite                      | Rugose        | <i>A. narcissiflora</i>                     |
| Negative                  | Hairy       | Obtuse      | Pinnatisect    | 2-3 pinnaite sect                          | Rugose        | <i>P. albana</i>                            |

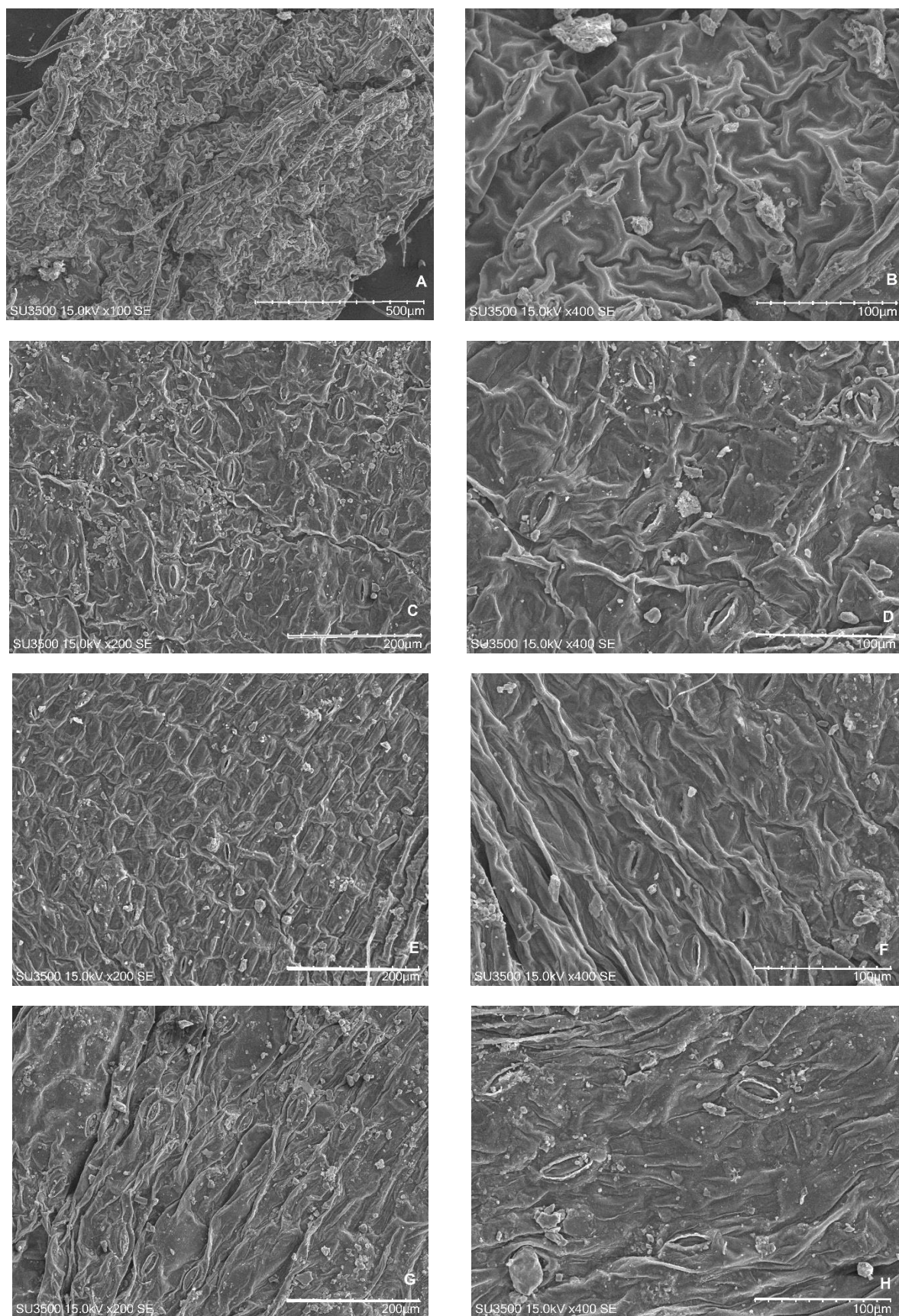
فنوگرام تجزیه خوشه‌ای به روش Average Linkage براساس کلیه داده‌های کمی و کیفی صفات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ ترسیم گردید. فنوگرام در فاصله‌ی ۲۵، دو شاخه شده و گونه‌ی *P. albana* از گونه‌های *Anemone* جدا شده است. در فاصله ۲۱ نیز *A. narcissiflora* از سایر آرایه‌ها مجزا گشته است (شکل ۴).

در فاصله‌ی ۱۲ مجدداً فنوگرام دو شاخه شده و دو گونه‌ی *A. blanda* و *A. caucasica* در حالی که تشکیل یک گروه خواهری را داده‌اند از آرایه‌های دیگر جدا شده‌اند (شکل ۴).

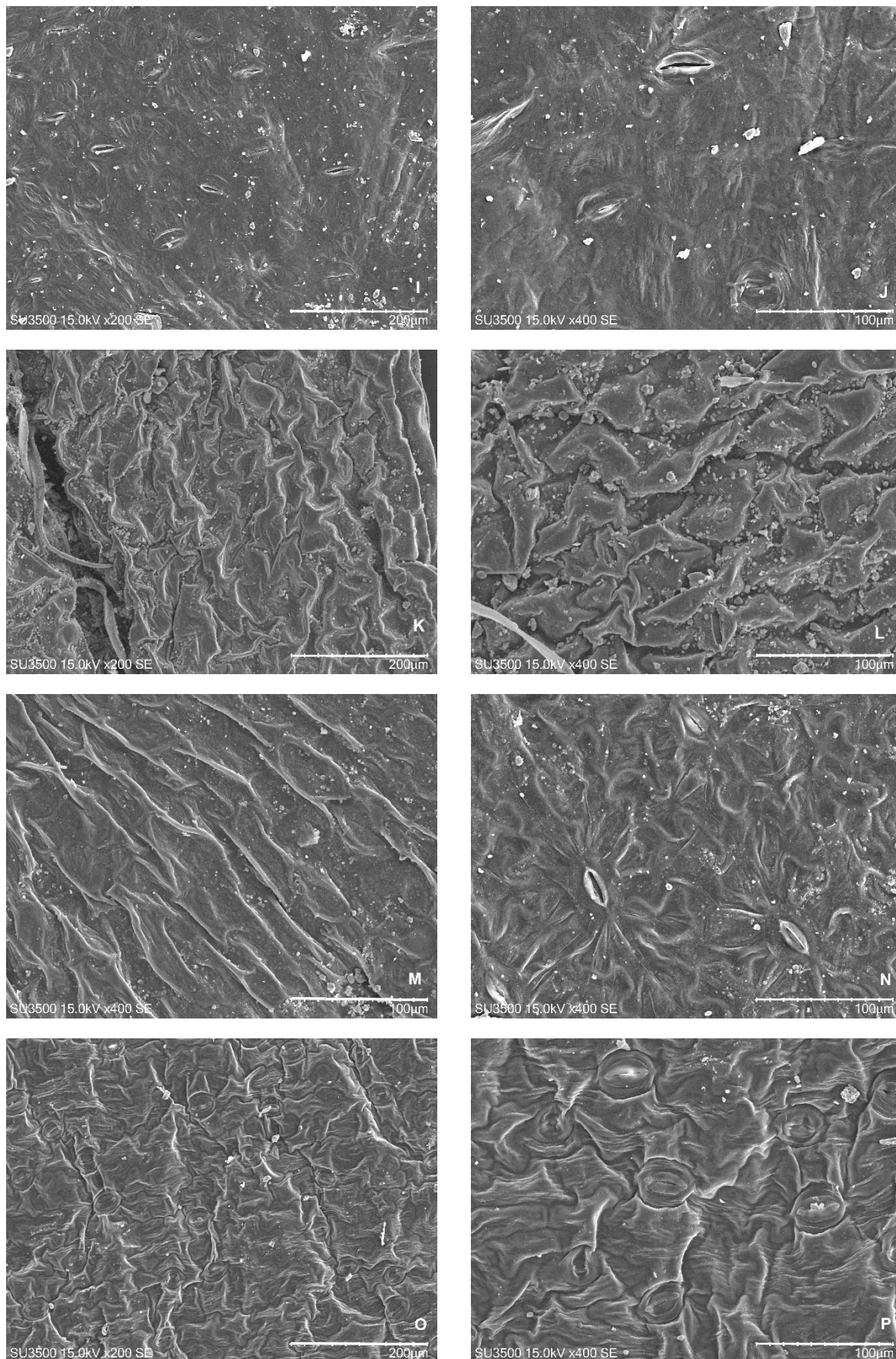
در نهایت در فاصله ۱۱، دو گونه‌ی *A. coronaria* و *A. tschernjaewii* تشکیل یک خوشه را می‌دهند و خوشه‌ی دیگر شامل سه واریته‌ی *A. biflora*، *A. biflora* var. *biflora* و *A. biflora* var. *petiolulosa* تشکیل یک گروه خواهری را می‌دهند در مرحله‌ی بعد با *A. biflora* var. *gortschakowii* نزدیکی نشان می‌دهند (شکل ۴).



شکل ۱: تصاویر برگ در گونه‌های مورد مطالعه در بررسی‌های ریخت‌شناسی. A. *A. albana* A، B. *A. biflora* var. *biflora* B، C. *A. biflora* C، D. *A. biflora* var. *gortschakowii* D، E. *A. tschernjaewii* E، F. *A. cronaria* F، G. *A. blanda* G، H. *A. caucasica* H، I. *A. narcissiflora* I



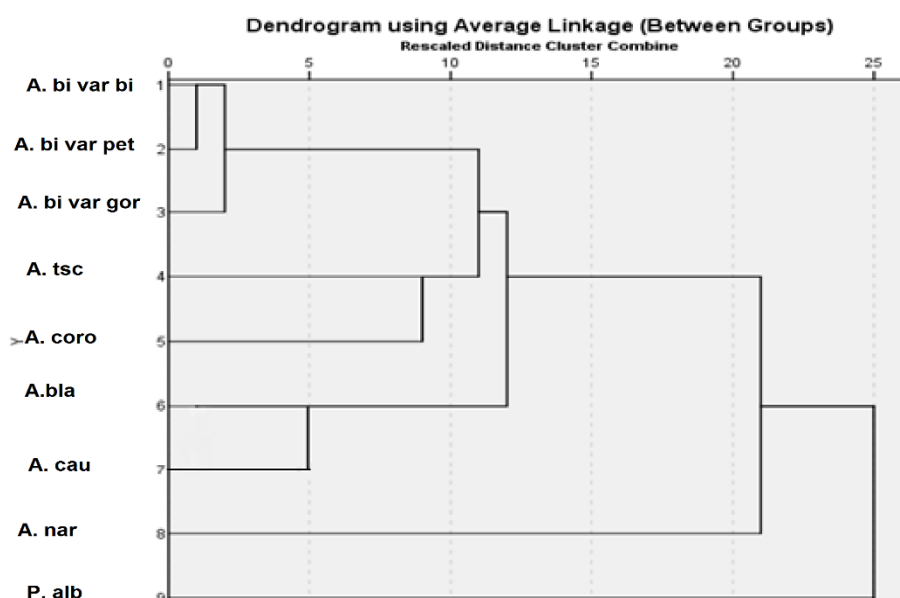
شکل ۲: جزئیات سطح برگ در گونه‌های مورد مطالعه در بررسی‌های SEM. A-B. *(A. albana)* C-D. *(A. biflora var. biflora)* E-F. *(A. biflora var. gortschakowii)* G-H. *(biflora var. petiolulosa)*



شکل ۳: جزئیات سطح برگ در گونه‌های مورد مطالعه در بررسی‌های SEM. I-J. *(A. tschernjaewii)* K-L. *(A. cronaria)* M. *(A. blanda)* N. *(A. caucasica)* O-P. *(A. narcissiflora)*

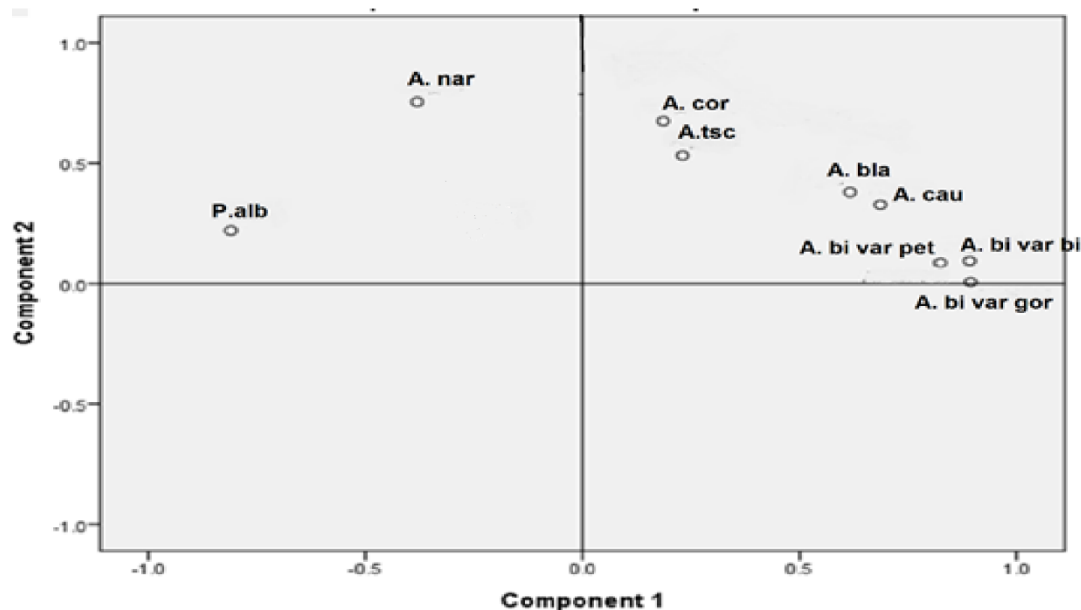
آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) نشان داد که متغیرترین صفات در مؤلفه‌ی اول با درصد واریانس ۴۰ درصد شامل شکل برگ و الگوی اپیدرمی و همچنین متغیرترین صفات در مؤلفه‌ی دوم با درصد واریانس ۲۵ درصد شامل صفات طول و شکل قطعات برگ می‌باشد.

در پلات رسم شده با استفاده از آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) نیز جدایی آرایه‌ها به خوبی دیده می‌شود (مشابه با فنوگرام) و بیشترین فاصله را *P. albana* با سایر آرایه‌ها دارد و واریته‌های *A. biflora* کمترین فاصله و بیشترین نزدیکی را با یکدیگر نشان می‌دهند، از طرفی در میان گونه‌های *Anemone*، گونه‌ی *A. narcissiflora* بیشترین فاصله را با سایر آرایه‌ها دارد که براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (به طور مثال داشتن ریشه‌ی چوبی، گل‌آذین چتر، تعداد گل‌های بیشتر، ارتفاع و اندازه بزرگ‌تر گیاه، وجود کرک و موهای بلند در تمام قسمت‌های گیاه) و ویژگی‌های کاربوتایی کاملاً منطقی به نظر می‌رسد (شکل ۵).



شکل ۴: فنوگرام رسم شده به روش Average linkage بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ نمونه‌های

مورد مطالعه (A. bi var bi: *A. biflora* var. *biflora*, A. bi var pet: *A. biflora* var. *petiolulosa*, A. bi var gor: *A. biflora* var. *gortschakowii*, A. tsc: *A. tschernjaewii*, A. bla: *A. blanda*, A. coro: *A. coronaria*, A. cau: *A. caucasica*, A. nar: *A. narcissiflora*, P. alb: *P. albana*)



شکل ۵: تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) بر اساس داده‌های کمی و کیفی ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ نمونه‌های

مورد مطالعه (A. bi var bi: *A. biflora* var. *biflora*, A. bi var pet: *A. biflora* var. *petiolulosa*, A. bi var gor: *A. biflora* var. *gortschakowii*, A. : A. nar: *A. narcissiflora*, A. tsc: *A. tschernjaewii*, A. bla: *A. blanda*, cor: *A. coronaria*, P. alb: *P. albana*, A. cau: *A. caucasica*)

## نتیجه گیری کلی

تا به امروز سه طبقه‌بندی معتبر برای *Anemone* ارائه شده است. طبقه‌بندی‌های (1995) Tamura و Ziman et al. (2008) مبتنی بر صفات ریخت‌شناسی و طبقه‌بندی (2012) Hoot et al. مبتنی بر داده‌های مولکولی (نواحی ITS و cpDNA) بوده است. تاکسونومیست‌ها براساس تفاوت‌های ریخت‌شناسی، کارپولوژی و سایر مشاهدات جنس‌های متعددی از جنس *Anemone* را جدا کردند از جمله جنس‌های *Pulsatilla*, *Knowltonia*, *Hepatica*, *Barneoudia* و *Oriethales* که این جدایی از طرف بسیاری از محققان کاملاً پذیرفته شده و منطقی به نظر می‌رسد اما (2012) Hoot et al. اعتقاد به ایجاد یک جنس بزرگ و ناهمگن *Anemone* s.l. با حدود ۲۰۰ گونه دارند که جنس‌های مجزا شده از *Anemone* با نام‌های اختصاصی خودشان در درون این جنس جای گرفته‌اند.

در مطالعه‌ی حاضر در جهت بررسی‌های ریخت‌شناسی برگ گونه‌های ایرانی *Anemone* و تک گونه‌ی ایرانی متعلق به جنس *Pulsatilla* یعنی *P. albana*، علی‌رغم اینکه این جنس‌ها در ایران مورد غفلت واقع شده‌اند، علاوه بر صفات میکروسکوپی، از صفات میکروسکوپی نیز استفاده کرده‌ایم که مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) به دلیل دقت بالا و وضوح تصاویر صورت گرفت و نیز در سال‌های اخیر مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته است. تفاوت‌های شاخصی در بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده کردیم حتی بعضی از ویژگی‌ها در بین واریته‌های متعلق به گونه‌ی *A. biflora* که سال‌هاست به‌عنوان کمپکس گونه‌ای معرفی شده‌اند، نیز متفاوت و قابل تشخیص بوده‌اند. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نیز تأیید کننده‌ی

نتایج ما می‌باشند. صفات مورد استفاده در این مطالعه، صفات خوب و دارای ارزش تشخیصی هستند و قابلیت جداسازی گونه‌ها و حتی واریته‌ها را دارند. در بین مطالعاتی که به اهمیت و ارزش صفات برگ در این جنس اشاره کرده‌اند می‌توان به مطالعه‌ی Zhange et al.(2015) و Ziman et al.(2011) اشاره کرد. Zhange et al.(2015) ارزش تشخیصی ویژگی‌های برگ و تقسیمات برگ‌ی در سطح گونه در بخش *Begoniifolia* را نشان داده‌اند هم‌چنین Ziman et al.(2011) در بررسی‌های ریخت‌شناسی و تاکسونومی گونه‌های *Anemone* در ناحیه بالکان به ویژگی‌های برگ‌های اصلی و همسانی برگ‌های اصلی و گریبان توجه کرده‌اند. در بین آرایه‌های ایرانی متعلق به دو جنس *Anemone* و *Pulsatilla* نیز صفات تقسیمات برگ‌ی و همسانی و عدم همسانی برگ‌های اصلی و گریبان نیز دارای ارزش بوده‌اند.

از آنجایی که این مطالعه در واقع مبتنی بر صفات ریخت‌شناسی است در نتیجه هم راستا و منطبق بر طبقه‌بندی‌هایی از همین دست و مؤید مطالعات متعدد گذشته در این زمینه می‌باشد؛ هرچند که روابط بین آرایه‌های متعلق به جنس *Anemone* براساس صفات ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ منطبق بر هر دو نوع طبقه‌بندی است. به طور مثال آرایه‌های *A. biflora* *A. biflora* var. *petiolulosa*، *A. biflora* var. *gortschakowii*، *A. tschernjaewii* و *A. coronaria* در همه‌ی طبقه‌بندی‌ها در یک زیرجنس و بخش قرار گرفته‌اند (جدول ۴) و نزدیکی بیشتری را به هم نشان می‌دهند، در این مطالعه نیز در فنوگرام و پلات در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند.

هم‌چنین گونه‌ی *A. narcissiflora* که در این تحقیق بیشترین تفاوت و فاصله را با سایر آرایه‌های *Anemone* دارد، در همه‌ی طبقه‌بندی‌ها در زیرجنسی کاملاً متفاوت از سایرین قرار گرفته است، قابل ذکر است که در طبقه‌بندی Hoot et al.(2012)، تنها دو زیرجنس معرفی شده‌اند که ارتباط مستقیمی با عدد کروموزومی پایه دارد. *A. narcissiflora* نیز دارای عدد کروموزومی پایه  $(X=7)$  متفاوت از سایر آرایه‌ها  $(X=8)$  می‌باشد.

دو گونه‌ی *A. caucasica* و *A. blanda* در طبقه‌بندی‌های Tamura (1995) و Ziman et al. (2008) در زیرجنس و بخش‌ی متفاوتی از سایر آرایه‌ها قرار گرفته‌اند اما در طبقه‌بندی Hoot et al.(2012)، به دلیل داشتن  $x=8$  در زیرجنس *Anemone* قرار گرفته‌اند (جدول ۴)، در مطالعه‌ی ما هم در یک خوشه قرار گرفته و تشکیل یک گروه خواهری را داده‌اند (شکل ۴).

در ارتباط با جایگاه گونه‌ی *P. albana* که از دیرباز گاهی در جنس *Anemone* و گاهی در جنس *Pulsatilla* قرار داده شده است؛ براساس مطالعات ما با توجه به تفاوت‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی برگ بین این گونه و گونه‌های متعلق به جنس *Anemone* و هم‌چنین نتایج فنوگرام و پلات، می‌توان این گونه را متعلق به جنس *Pulsatilla* دانست و این نتیجه مشابه مطالعات مبین، (۱۳۶۴، Rechinger & Riedl, 1992، Yaprak et al., 2011، Komarov, 1937) است.

جدول ۴: موقعیت آرایه‌های ایرانی *Anemone* در طبقه‌بندی‌های مختلف

| Taxon                                                                                                                                                                                        | Ziman (2008)                                                 | Tamura (1995)                                                | Hoot et al. (2012)                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>A. caucasica</i>                                                                                                                                                                          | Sub gen. <i>Anemonanthea</i><br>sect.                        | Sub gen. <i>Anemonanthea</i><br>sect.                        | Sub gen. <i>Anemone</i>                                     |
| <i>A. blanda</i>                                                                                                                                                                             | <i>Tuberosa</i>                                              | <i>Tuberosa</i>                                              | sect. <i>Anemone</i>                                        |
| <i>A. biflora</i> var. <i>biflora</i><br><i>A. biflora</i> var. <i>petiolulosa</i> <i>A.</i><br><i>biflora</i> var. <i>gortschakowii</i><br><i>A. coronaria</i><br><i>A. tschernjaewii</i> * | Sub gen. <i>Anemone</i><br><br>sect. <i>Anemone</i>          | Sub gen. <i>Anemone</i><br><br>sect. <i>Anemone</i>          | Sub gen. <i>Anemone</i><br><br>sect. <i>Anemone</i>         |
| <i>A. narcissiflora</i>                                                                                                                                                                      | Sub gen. <i>Homalocarpus</i><br>sect.<br><i>Homalocarpus</i> | Sub gen. <i>Homalocarpus</i><br>sect.<br><i>Homalocarpus</i> | Sub gen. <i>Anemonidium</i><br>sect.<br><i>Homalocarpus</i> |

## منابع

- حیدری بالادهی، م. ه. (۱۳۸۶) بررسی تاکسونومیکی جنس‌های *Anemone* L. و *Pulsatilla* Mill. از تیره آلاله (Ranunculaceae) در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد
- شریف نیا، ف. و چلیبیان، ف. (۱۳۸۲) فرهنگ مصور اصطلاحات گیاه‌شناسی (ترجمه)، چاپ دوم، انتشارات آییز، ۲۰۸ صفحه
- مبین، ص. (۱۳۶۴) رستنی‌های ایران، فلور گیاهان آوندی. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۰۱۴ صفحه
- Akrami, S., Nejadsattari, T., Mozaffarian V. and Maassoumi, A. (2011) A new species of *Hedysarum* (Fabaceae) and a new record of *Anemone* (Ranunculaceae) from NW Iran. *Iranian Journal of Botany*, 17: 20-23
- Boissier, E. (1867) *Flora Orientalis*, Vol. 1. Georg, Pp 48-54, Basel
- Chaudhary, R.P. and Trifonova, V.I. (1988) Morphology of fruit and comparative anatomy of pericarp and seed coat in the Nepal species of the genus *Anemone* (Ranunculaceae). *Botanicheskii Zhurnal*, 73: 803–817
- Cheng, X.Y., Liu, M., Shi, C.Q., Zhang, X.X. and Ru, J. (2015) The Phylogenetic Significance of Fruit Structures In: *Ranunculaceae of China*. *Pakistan Journal of Botany*, 47: 453-466
- Christenhusz, M. J. and Byng, J. W. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261:201-217
- Davis, P.H. (1965) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 1. Edinburgh at the University Press. Edinburgh
- Ehrendorfer, F. and Samuel, R. (2009) Contributions to a molecular phylogeny and systematics of *Anemone* and related genera (Ranunculaceae–Anemoninae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 39:293–307
- Hoot, S. (1995) Phylogeny of the Ranunculaceae based on preliminary atpB, rbcL & 18S nuclear ribosomal DNA sequence data. *Plant Systematics & Evolution*, 9: 241-251
- Hoot, S.B., Meyer, K.M. and Manning, J.C. (2012) Phylogeny and Reclassification of *Anemone* (Ranunculaceae), with an Emphasis on Austral Species. *Systematic Botany*, 37:139–152
- International Plant Names Index. (2012) *Anemone biflora* var. *gortschakowii* (Kar. & Kir.) Sinno

- Hoot, S.B., Palmer, J.D. and Reznicek, A.A. (1994) Phylogenetic relationships in *Anemone* based on morphology and chloroplast DNA variation. *Systematic Botany*, 19: 169–200
- Joharchi, M., Ghahremaninejad, F. and Vitek, E. (2011) New plant records for Khorassan province, Iran, IV; with complementary notes to its flora, *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 329-367
- Joharchi, M.R. and Akhiani, H. (2006) Notes on the flora of Iran 6: eight new plant records from Iran collected from Khorasan & Golestan provinces (NE. Iran). *Rostaniha*, 7:1-12
- Komarov, V. L. (1937) Ranals and Rhoadales, *Flora of the U.S.S.R. Vol VII*, (translated from Russian), Smithsonian Institution and the National Science Foundation, Pp.184-219, Washington D.C.
- Lourteig, A. (1951) *Ranunculaceae de Sudamerica templada*. *Darwiniana*, 9:562-604
- Lourteig, A. (1956) *Ranunculaceae de Sudamerica tropical*. *Memoria Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, 16:199-224
- Maciejewska-Rutkowska, I. and Antkowiak, W. (2013) Taxonomic Utility of Achene Morphology & Anatomy In *Anemone L. (Ranunculaceae) Species*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 55: 29–36
- Manning, J. & Goldblatt, P. (2013) A taxonomic review of the dry-fruited species of *Anemone* (Ranunculaceae) in southern Africa. *Bothalia* 43:1–13
- Meyer, K.M., Hoot, S.B. and Arroyo, M.T.K. (2010) Phylogenetic affinities of South American *Anemone* (Ranunculaceae), including the endemic segregate genera, *Barneoudia* and *Oreithales*. *International Journal of Plant Sciences*, 17:323–331
- Parsa, A. (1951) *Flora de Iran, Vol.1*. Tehran university. Tehran
- Rasmussen, H. (1979) The genus *Knowltonia* (Ranunculaceae). *Opera Botanica*, 53: 2–43
- Rechinger, K.H. and Riedl, H. (1992) *Anemone*(Ranunculaceae). In: Rechinger, K H(ed.), *Flora Iranica*. No. 171. Akademische Druck- u Verlagsanstalt. Graz
- Shojaee, M., Sharifnia, F., Assadi, M. and Mehregan, I. (in press) Macro & micro- morphological and anatomical investigation of Iranian *Anemone* and *Pulsatilla* achene. *Rostaniha*
- Sinno -Saoud, N., Knio, K. and Jury, S. (2007) Phenetic analysis of *Anemone coronaria* (Ranunculaceae) and related species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153:417–438
- Starodubtsev, V.N. (1991) *Anemone: Systematics and Evolution*, Pp 1-197, Leningrad: Nauka (in Russian)
- Tamura, M. (1993) Ranunculaceae. In: *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 2. (Eds.): Kubitzki, K., J.G. Rohwer and V. Bittrich. Springer-Verlag, Pp 563-583, Berlin
- Tamura, M. (1995) Angiospermae: Ordnung Ranunculales. *Fam. Ranunculaceae. II. Systematic Part*: 223-519
- Ulbrich, E. (1905/1906) Über die systematische Gliederung und geographische Verbreitung der Gattung *Anemone L.* *Botanische Jahrbucher*, 37:171-334
- Yaprak, A.E., Körüklü, S.T. and Ketenoğlu, A.O. (2011) A synopsis of the genus *Pulsatilla* (Ranunculaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 35:351-355
- Zhang, Y., Kong, Y., Ren, C., Tang, M., Hoot, S.B. and Yang, Q. E. (2015) Palynology, cytology, and molecular systematics of *Anemone* section *Begoniifolia* (Ranunculaceae). *Plant Systematic Evolution*, 301:411-424

- Ziman, S., Bulakh, E.V., Kadota, Y. and Keener, C.S. (2008) Modern view on the taxonomy of the genus *Anemone* L.sensu stricto (Ranunculaceae). *The Journal of Japanese Botany*, 83:127–155
- Ziman, S.N., Bulakh, E. V. and Tsarenko, E. (2011) *Anemone* L. (Ranunculaceae): comparative morphology and taxonomy of the species from the Balkan flora. *Botanica Serbica*, 35:87-97
- Ziman, S.N., Ehrendorfer, F., Keener, C.S., Dutton, B.E., Trifonova, V., Tsarenko, O.N., Moldovanova, E. and Terentjeva, A. (1998) The *Anemone biflora* complex (Ranunculaceae) in Central and South-West Asia: its differentiation and affinities. *Thaiszia*, 8:57–85

## **Leaves Macro and Micro morphological study of Iranian *Anemone* L. and *Pulsatilla* Mill. (Ranunculaceae)**

**M. Shojaee<sup>1</sup>, F. Sharifnia<sup>2\*</sup>, M. Assadi<sup>3</sup>, I. Mehregan<sup>4</sup>**

**Received:2020.4.26**

**Accepted:2020.9.6**

### **Abstract**

In this survey, 9 Iranian taxa of *Anemone* L. and *Pulsatilla* Mill. were studied by their macro and micro-morphological features of leaves to understand the importance of these characteristics in identifying taxa of these genera. For achieving more accurate results the scanning electronic microscope (SEM) was also used. Several features such as size, shape, trichome, epidermal pattern, segment shape and tip of leaf were studied 4 types including Trisect, Palmately trisect, Ternately compound and Pinnaitesec observed based on leaf shape and 4 types which are reticulate, rugos, striate and simple identified based on epidermal pattern. Using Principal Component Analysis, features such as length, shape, epidermal pattern and segment shape of leaf demonstrate the most distinctive characteristics and they can separate the species and even the varieties. Furthermore, the separation of the taxa well observed in the phenogram.

**Keywords:** Epidermal pattern, leaf Shape, SEM, Taxon

---

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

2- Associate Prof., Department of Biology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*( Corresponding author: f\_sharifnia@iau-tnb.ac.ir)

3- Research Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Associate Prof., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran

## بررسی تغییرات ساختار و تجمع پذیری هموگلوبین انسان در حضور سم کارتاپ

مهديه عمادی<sup>۱</sup>، پروانه مقامی<sup>۲\*</sup>، خاطره خرسندی<sup>۲</sup>، رضا حسین زاده<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

### چکیده

هدف این تحقیق بررسی اثر سم کارتاپ بر ساختار و عملکرد هموگلوبین برای تعیین مکانیسم مولکولی اثر سم می باشد. در این پژوهش، اثر کارتاپ بر ساختار و تجمع پذیری هموگلوبین انسانی با روش های طیف سنجی جذب فرابنفش مرئی، حرارتی، فلورسانس و تبدیل فوریه در دو حالت تیتراسیون و انکوباسیونی و در غلظت های متفاوت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طیف سنجی فرابنفش مرئی نشان داد که با افزودن غلظت های مختلف از سم، تغییرات جذب مشاهده می گردد. آنالیز مقادیر اکسی-داکسی و مت هموگلوبین در حضور مقادیر مختلفی از سم کارتاپ، نشان دهنده کاهش گونه های فعال هموگلوبین در حضور سم بود. همچنین تجمع پذیری و همولیز گلبول قرمز با اضافه نمودن غلظت سم افزایش نشان داد. در طیف سنجی فلورسانس تخریب جزئی هم رخ داد و در مادلون قرمز تغییر ساختار دوم هموگلوبین مشاهده نشد.

**واژه های کلیدی:** آفت کش، سلول های قرمز، طیف سنجی، هم، همولیز.

### مقدمه

امروزه یکی از مسائل مورد توجه در محیط زیست و آلودگی منابع آب و خاک، استفاده روزافزون و بی رویه از آفت کش ها و سموم دفع آفات در حفاظت از محصولات زراعی و کشاورزی می باشد. آفت کش های شیمیایی شامل سموم کلره، ارگانو فسفره، کاربامات ها و .. می باشند که برای کنترل جمعیت آفات و حشرات، علف های هرز، عوامل بیماری زا و امثال آن تولید و استفاده می شوند. از آنجا که همه آفت کش ها با نسبت های متفاوت و بسته به مکانیسم و نحوه اثر خود بر روی ارگانیسم ها، اندام ها و فرایندهای حیاتی اثرات مضر و سمی می گذارند، تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با آفت کش ها می تواند باعث بروز بیماری و مرگ گردد، به علاوه خساراتی را به سایر موجودات زنده مانند گیاهان نیز وارد می نمایند. لذا رعایت اصول بهداشتی و پیشگیری می تواند جانداران را در برابر خطرات این سموم محافظت کند. (Ali et al., 2014; Dehghani., 1385; Talebi Jahromi., 1385).

۱- کارشناسی ارشد بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: (maghami@srbiau.ac.ir)

۳- استادیار بیوشیمی، گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- استادیار بیوفیزیک، گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: (r.hoseinzadeh@ut.ac.ir)

کاربامات‌ها در دسته‌حشره‌کش‌ها به‌طور کلی شامل چندین گروه از مواد با خصوصیات شیمیایی و سم شناسی متفاوت و مجزا هستند که دارای سمیت بالادر پستانداران هستند و اندام هدف اصلی آن‌ها مغز، کبد، عضلات اسکلتی، و قلب می‌باشند (Sraylv.,1376). کارتاپ‌هیدروکلراید از گروه سموم کارباماتی، ماده‌ای جامد، کریستالی بی‌رنگ، کمی رطوبت‌پسند، با بوی ملایم می‌باشد و با نام تجاری پادان (Padan) برای مبارزه با آفات چوب کرم ساقه‌خوار نواری برنج و سایر حشرات جونده و مکنده بکار می‌رود. مکانیسم اثر این سم، انسداد انتقال کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی حشرات است و به‌عنوان یک مسدودکننده‌ی عصبی عضلانی در نظر گرفته می‌شود. حشره‌کش کارتاپ با فرمول شیمیایی  $S,S'-(2\text{dimethylaminotrimethylene})$  hydrochloride-bis(thiocarbamate) با اکسیداسیون سم طبیعی nereistoxin (NTX) تشکیل [۴- (دی متیل) -۱,۲- دیتیولان] می‌دهد. متوسط دوز کشنده‌ی  $LD_{50}$  (lethal dose) سم کارتاپ برای پستانداران ۳۴۵-۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و متوسط غلظت کشنده یا  $LC_{50}$  (lethal concentration) برای ماهی ها ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر است. این سم برای پرندگان و ماهی‌ها و دیگر موجودات آبی سمیت بالایی دارد (Motevalian.,1380; Aldridge& Magos., 1978).

در پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، برهمکنش حشره‌کش تیاکلوپراید TL (Thiacloprid) با هموگلوبین گاوی BHB (Bovine Hemoglobin) تحت شرایط فیزیولوژیکی با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی CD (Circular Dichroism Spectroscopy) و مدل‌سازی مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعامل بین TL و BHB یک روند استاتیک می باشد به‌طوری‌که شدت فلورسانس BHB به‌طور منظم با افزایش تدریجی غلظت تیاکلوپراید کاهش یافت و همچنین کمپلکس TL-BHb میتواند به پیوند هیدروژنی و تعاملات آبگریز منجر گردد (Chen *et al.*, 2010). همچنین طی پژوهشی بررسی تاثیرسموم ارگانوکلره آندوسولفان و ارگانوفسفره‌دiazینون بر پارامترهای خونی و سرمی ماهی کپور گزارش شده است که نتایج آن نشان داد آندوسولفان و diazینون سبب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، کاهش غلظت هموگلوبین و کاهش درصد همتوکریت خون در ماهی کپور شدند (Mahdaviasl., 1390). مطالعات مختلف برای بررسی تاثیر سم کارتاپ هیدروکلراید به صورت موردی روی تحریک پوست، سوزش چشم، اثرات تنفسی، تولیدمثل، تریختگی‌زنی، بازدارندگی‌آزیمی و جهش‌زایی و نیز آزمایشات بالینی کوتاه‌مدت و درازمدت بر روی موش، خرگوش و سایر پستانداران انجام گردیده است؛ نتایج مطالعات موردی نشان دهنده‌ی اثر مثبت این سم بر اختلالات باروری در نسل اول(والدی)، مسدود شدن فعالیت‌های عصبی و عضلانی در برخی گونه‌های جانوری و سوزش چشم و تنگی نفس به صورت خفیف و موقتی بود و نتایج حاصل از مطالعات بالینی شامل افزایش نیتروژن و اوره خون، کاهش درصد حجمی گلبول‌های قرمز خون و کاهش فعالیت کولین‌استراز بوده است (inchem., 1978). علاوه بر این، چندین گزارش از مسمومیت کارتاپ در انسان در ژاپن و هند وجود دارد و علائم آن همراه با استفراغ، تشنج، دردشکم، تنگی نفس، ترشح بزاق، اسپاسم و میدریازیس (گشادشدن مردمک) گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2013). (et al., 2013) هموگلوبین یک پروتئین تترامر کروی محلول است و از دو زنجیره یکسان آلفا با ۱۴۱ اسیدآمینو و دو زیرواحد بتا

با ۱۴۶ اسید آمینه تشکیل شده است. هموگلوبین دارای بخش غیرپروتئینی موسوم به هم (heme) است که به آن گروه پروستتیک مولکول هموگلوبین می‌گویند. هم عبارتست از یک حلقه پورفیرینی که یک اتم آهن دوظرفیتی در مرکز آن قرار گرفته است. ماهیت تترامری هموگلوبین برای عملکرد بیولوژیکی آن بسیار مهم است که انتقال اکسیژن به ارگان‌های تنفسی، تنظیم pH خون و درگیری در بسیاری از بیماری‌های بالینی از آن جمله است. از این رو اتصال آفت‌کش‌ها به هموگلوبین اهمیت زیادی دارد (Perutz & Lehmann, 1968; Abbasi-Tejarag *et al.*, 2014).

با در نظر گرفتن اهمیت پروتئین هموگلوبین و نیز اثرات مضر سموم بر سلامت انسان و به‌ویژه بر فاکتورهای خونی و نیز از آنجا که تاکنون پژوهشی درخصوص اثرات مولکولی سم کارتاپ با این پروتئین انجام نشده است، تحقیق حاضر به بررسی تغییرات ساختاری و عملکردی هموگلوبین به عنوان پروتئینی که نقش مهمی در انتقال اکسیژن دارد، در حضور غلظت‌های مختلف سم کارتاپ و با تکنیک‌های مختلف طیف‌سنجی می‌پردازد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مواد مورد استفاده

سم کارتاپ هیدروکلراید گرانوله با خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد. در این مطالعه هموگلوبین از خون فرد سالم و غیر سیگاری طبق پروتکل Austen Riggs<sup>۱</sup> استخراج گردید. روش جدا سازی هموگلوبین به این ترتیب می‌باشد که خون تازه هپارینه شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محتوای پلاسمایی آن جداسازی می‌شود، سپس گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با محلول نمکی ایزوتونیک شستشو داده و به‌دنبال آن سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام می‌شود. اجزای تشکیل‌دهنده‌ی غشای سلولی نیز بوسیله‌ی سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه خارج شدند و در نهایت محلول هموگلوبین حاصل سه مرتبه با محلول بافر فسفات pH=۷ برای مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد (Riggs, 1981). برای تهیه‌ی محلول‌ها از بافر فسفات با pH=۷ استفاده شد و تمامی محلول‌ها در روز آزمایش تهیه گردیدند.

### مطالعات همولیزی روی گلبول قرمز خون

همولیز سلول‌های قرمز خون با کمک شستشو تو سط محلول بافر سالین ایزوتونیک (NaCl ۰/۹ در صد) و همچنین دستگاه سانتریفیوژ دور بالای مجهز به سیستم برودتی Hitachi ساخت کشور ژاپن صورت گرفت. دو نمونه به‌عنوان شاهد صفر درصد و ۱۰۰ درصد نیز آماده شد به‌طوری که در نمونه صفر درصد با استفاده از آب به‌جای آنالیت و نمونه ۱۰۰ درصد لیز سلولی با استفاده از تریتون ۱۰۰ - X تهیه گردید. سپس نمونه برای مدت ۴۵ دقیقه در حمام آبی و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۶۰۰ دور بر دقیقه، فاز فوقانی هموگلوبین جدا گردید و برای اندازه‌گیری در طول

موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش مرئی مورد بررسی قرار گرفت (Ariaeenejad *et al.*, 2014; Hosseinzadeh & Moosavi Movahedi., 2016; Maghami *et al.*, 2014)

### مطالعات طیف‌سنجی فرابنفش مرئی

برای بررسی تغییرات ساختاری از طیف فرابنفش مرئی تهیه شده از محلول هموگلوبین با غلظت یک میلی‌مولار به همراه غلظت‌های مشخص از سم به روش تیتراسیون و انکوباسیونی در فواصل زمانی یک، دو و سه ساعت در ناحیه طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر انجام گرفت توسط دستگاه طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش کری (carry) ساخت کشور استرالیا استفاده شد، طیف‌سنجی تغییرات طیفی به دست آمده برای آنالیز مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه آزمایشات نیز با سه بار تکرار انجام گرفته است.

### مطالعات تجمع‌پذیری پروتئین

بررسی تجمع‌پذیری هموگلوبین در حضور سم کارتاپ با دستگاه طیف‌سنجی حرارتی مدل Ultrascan XE ساخت کشور آمریکا انجام شد. برای بررسی تجمع‌پذیری پروتئین در حضور سم، تغییرات جذب هموگلوبین به تنهایی و در حضور غلظت‌های مختلف از سم کارتاپ در طول موج ۳۶۵ نانومتر در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس در طول مدت ۸۰۰ ثانیه ثبت گردید.

### مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس

برای انجام آزمون‌های طیف‌سنجی فلورسانس نرمال، طیف‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت یک میلی‌مولار به همراه غلظت‌های مشخص از سم به دو روش تیتراسیون و انکوباسیونی در دو طول موج تهییج و نشر ۳۲۱ و ۴۶۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج فلورسانس کری اکلپس ساخت شرکت وریان کشور استرالیا ثبت گردیدند.

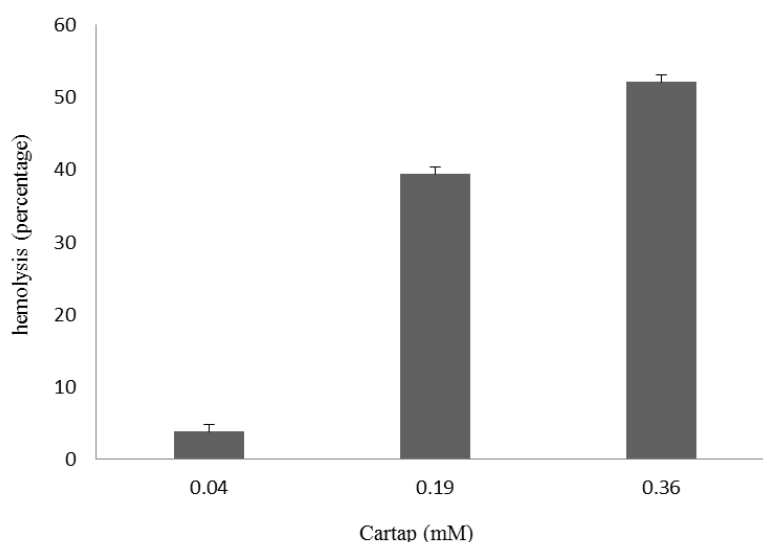
### مطالعات طیف‌سنجی ATR -FTIR

FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy) ATR - (Attenuated Total Reflection) یا طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی و شناسایی ترکیبات آلی به کار می‌رود. برای بررسی تغییرات ساختار دوم هموگلوبین انسانی در اثر برهمکنش با کارتاپ هیدروکلراید از دستگاه مدل Thermo Nicolet NEXUS 670 ساخت کشور آمریکا در ناحیه‌ی عدد موج  $1700-1600$   $\text{cm}^{-1}$  (آمید I) و  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  (آمید II) استفاده گردید. برای انجام کار پنج محلول ATR شامل سم خالص، هموگلوبین خالص، و سه محلول ترکیبی از سم با مقادیر نصف، برابر و دو برابر غلظت هموگلوبین تهیه گردید.

## نتایج و بحث

### بررسی یافته‌های حاصل از اثر همولیزی سم

همولیز در واقع تخریب یا لیز غشای گلبول‌های قرمز و آزاد شدن هموگلوبین به پلاسمای خون است که سبب قرمز شدن پلاسما می‌شود. همولیز ممکن است تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند فشار اسمزی، برخی مواد شیمیایی و یا سموم انجام شود. مطالعه‌ی اثرات همولیتیک آنالیت‌های مختلف بر روی گلبول‌های قرمز یکی از مطالعات مهم در خصوص مواد مختلف است. نتایج بدست آمده از اثر همولیز کارتاپ نشان دهنده‌ی افزایش لیز گلبول قرمز متناسب با افزایش غلظت سم می‌باشد به گونه‌ای که با افزایش ۱۰ برابری غلظت سم کارتاپ درصد همولیز نیز تقریباً ۱۰ برابر شده است. (شکل ۱)



شکل ۱: نمودار اثر همولیزی سم کارتاپ در غلظت‌های مختلف بر روی سلول‌های قرمز خون انسان بالغ سالم

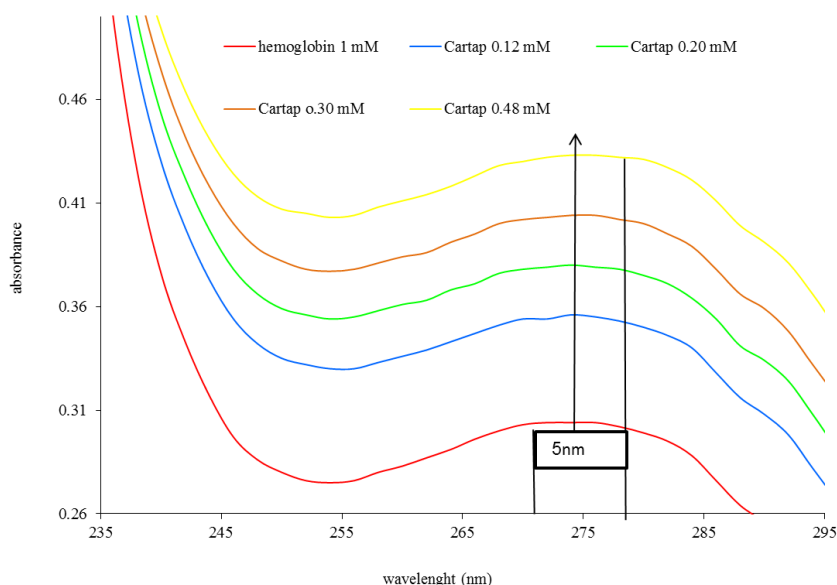
### بررسی یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی فرابنفش مرئی

طیف جذبی هموگلوبین در ناحیه ۸۰۰-۲۰۰ شامل سه منطقه‌ی جذب به ترتیب در ۲۸۵ نانومتر مربوط به گلوبین (جذب تریپتوفان و تیروزین)، ۴۱۵ نانومتر مربوط به سورت یا ناحیه B (کمپلکس پورفیرینی آهن) و ۵۰۰-۶۰۰ مربوط به پیک Q (حالات اکسی و داکسی و مت‌هموگلوبین) می‌باشد. طیف‌سنجی در حضور غلظت‌های مختلف سم کارتاپ و هموگلوبین در دو حالت تیتراسیون و انکوباسیونی در سه ساعت با فواصل زمانی مشخص انجام گردید و در این مقاله حالت انکوباسیونی با کسب نتیجه بهتر در هر ساعت آورده شده است.

شکل (۲) حالت تیتراسیون مربوط به ناحیه طیفی گلوبین را نشان می‌دهد. اضافه کردن غلظت‌های مختلف سم

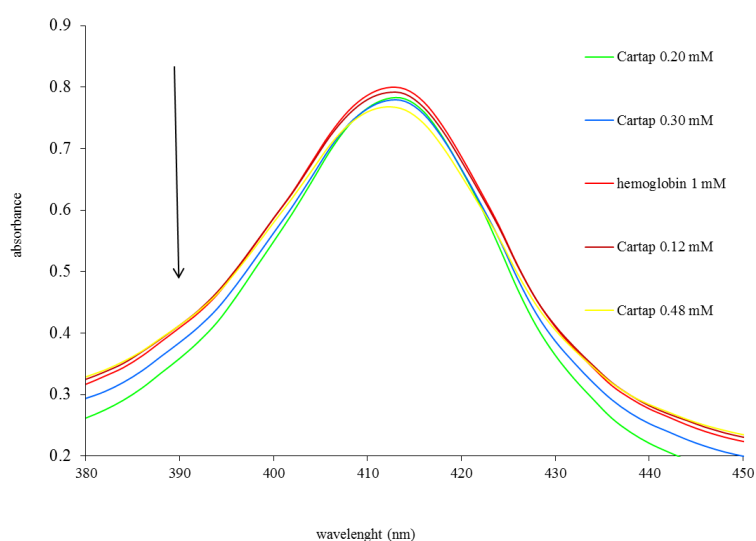
کارتاپ به هموگلوبین در حالت تیتراسیون باعث افزایش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و جابجایی باتوکرومیک

(Bathochromic Shift) (انتقال قرمز و یا Red Shift) می شود در نتیجه پیک جذب به سمت طول موج های بلندتر با انرژی و فرکانس های کمتر می رود، (تغییر حداکثر طول موج جذب در حدود پنج نانومتر از طول موج ۲۷۳ به ۲۷۸ نانومتر) و افزایش جذب در همین طول موج را به همراه دارد.



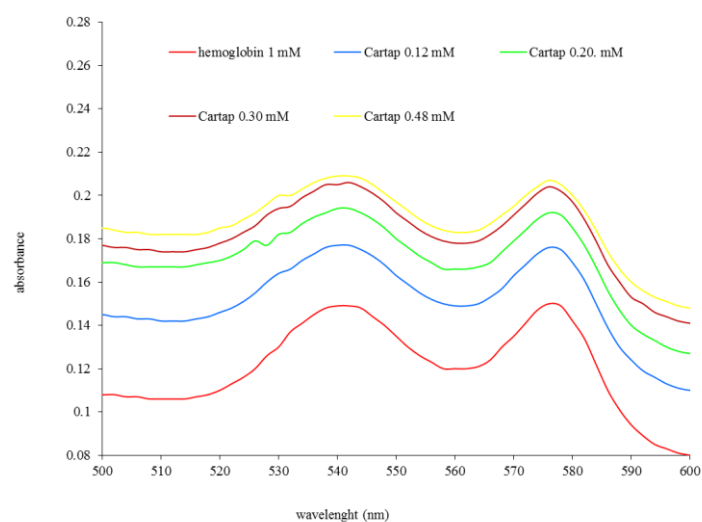
شکل ۲: اثر افزایش غلظت سم کارتاپ بر هموگلوبین در ناحیه طیفی گلوبین.

شکل (۳) حالت تیترا سیونی مربوط به ناحیه طیفی سورت را نشان می دهد. در حالت تیترا سیونی کاهش جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر دیده می شود و در حالت انکوباسیون نیز همان روند مشاهده می گردد ولی می توان نتیجه گرفت که تاثیر سم بر پروتئین در زمان طولانی تر، باعث نفوذ آن به کمپلکس هم یا آهن می شود و می تواند تاثیرات مخرب تری اعمال کند. (نتایج انکوباسیون در این بخش نیامده است).



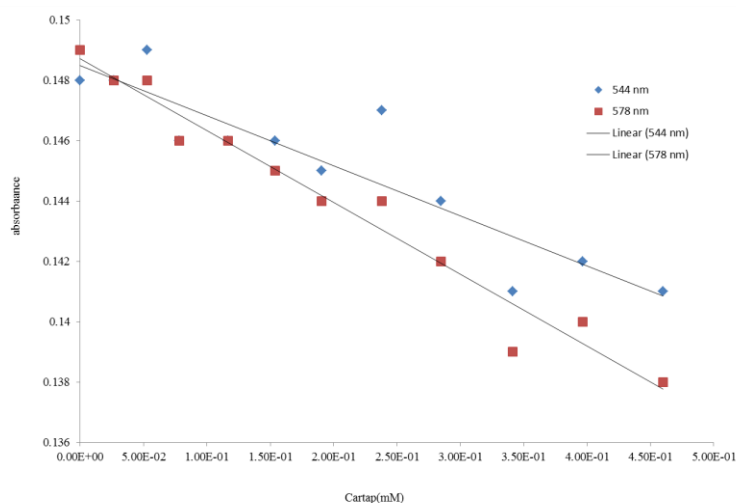
شکل ۳: تغییرات طیفی ناحیه سورت هموگلوبین با افزایش غلظت سم کارتاپ.

شکل (۴) حالت تیترا سیونی مربوط به ناحیه‌ی طیفی باند Q را نشان می‌دهد. این ناحیه بازه میان ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر، با دو پیک مجزا دیده می‌شود که در حال تیترا سیونی جذب آن کاهش یافته است. همچنین می‌توان کاهش گونه‌های فعال هموگلوبین (اکسی و داکسی) و افزایش گونه‌های غیرفعال (مت‌هموگلوبین) را نیز پیش‌بینی نمود که در اینجا رقابت میان سم و گونه‌ها در اکسیژن‌گیری رخ می‌دهد.

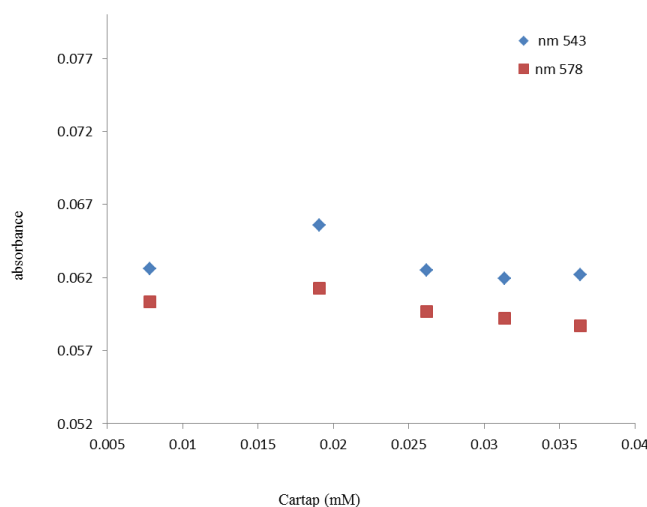


شکل ۴: تغییرات باند Q هموگلوبین با افزایش غلظت سم کارتاپ.

شکل (۵) و شکل (۶) تغییرات طیفی در طول موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر در دو حالت تیتراسیون و انکوباسیونی پس از ساعت دوم را نشان می‌دهد که در این دو حالت با افزایش غلظت سم کارتاپ کاهش جذب در تیتراسیون به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌گردد. در انکوباسیون ساعت دوم روند جذب تقریباً مشابه تیتراسیون است با این تفاوت که ابتدا بصورت افزایشی و بعد کاهشی می‌باشد. این نشانه تاثیر سم بر عملکرد هموگلوبین است. در واقع این تغییرات در دو طول موج معین ادامه بررسی روند گونه‌های فعال و غیرفعال در ناحیه طیفی Q است و بررسی‌های بیشتر برای میزان تغییرات نیز در این پژوهش صورت گرفته است.



شکل ۵: نمودار تغییرات جذب با افزایش غلظت سم کارتاپ در طول موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر (باند Q) در حالت تیتراسیون. غلظت هموگلوبین ۱ میلی مولار است.



شکل ۶: نمودار تغییرات جذب با افزایش غلظت سم کارتاپ در طول موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر (باند Q) در انکوباسیون ساعت دوم. غلظت هموگلوبین ۱ میلی مولار است.

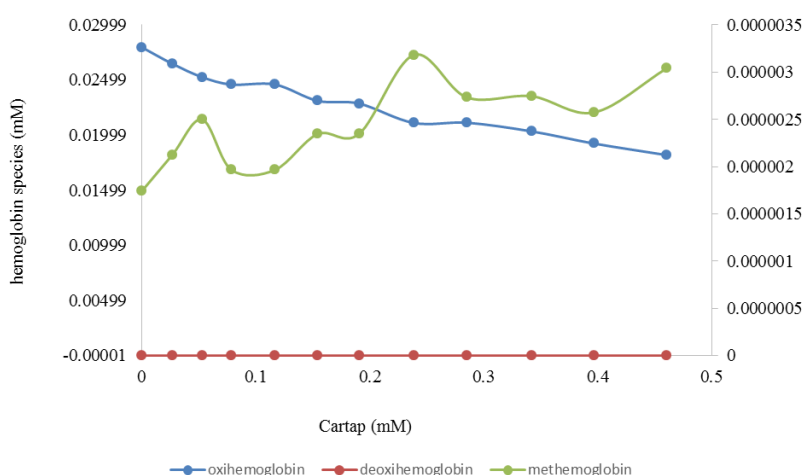
### بررسی گونه‌های مختلف هموگلوبین

با توجه به شکل (۷) که برای بررسی گونه‌های فعال (اکسی) و غیرفعال (داکسی و متهموگلوبین) در حالت تیتراسیون رسم گردیده است، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت سم کارتاپ، غلظت اکسی هموگلوبین کاهش و غلظت متهموگلوبین افزایش می‌یابد. حالت اکسی کمتر اما باز هم غالب است. بنابراین نتایج نشان دهنده احتمال ایجاد تخریب هم می‌باشد. از طرفی با مد نظر قرار دادن تغییرات پیک‌های Qband می‌توان در طول موج‌های ۵۰۰-۶۰۰ گونه‌های فعال هموگلوبین توسط معادله بنش (Bensch) را مورد محاسبه قرار داد (Benesch et al., 1973):

$$\text{اکسی هموگلوبین} = [(1.4747 A_{576} - 0.6820 A_{560} - 0.5329 A_{540}) * 10^{-4}]$$

$$\text{داکسی هموگلوبین} = [(1.4749 A_{560} - 0.2141 A_{576} - 1.1042 A_{540}) * 10^{-4}]$$

$$\text{متهموگلوبین} = [(4.5852 A_{540} - 0.8375 A_{560} - 3.7919 A_{576}) * 10^{-4}]$$

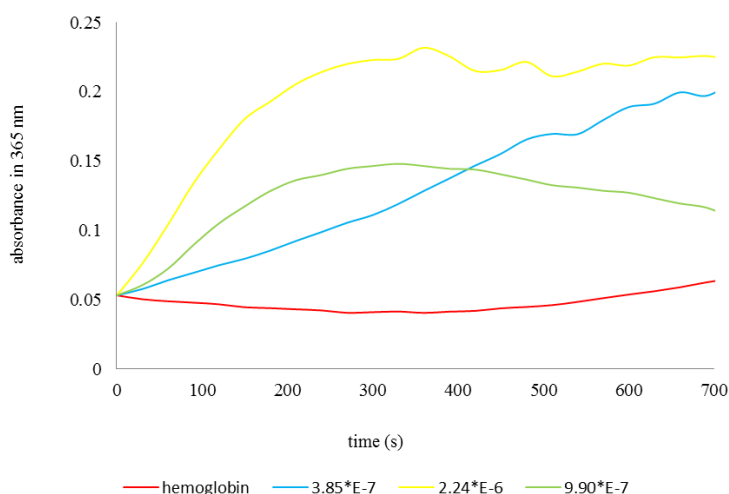


شکل ۷: نمودار گونه‌های فعال و غیر فعال هموگلوبین در تیتراسیون هموگلوبین با سم.

### بررسی یافته‌های حاصل از تجمع پذیری پروتئین

در فرایند تجمع پذیری (aggregation) پاکت‌های هیدروفوب در معرض قرار می‌گیرد و پروتئین‌ها به هم متصل می‌شوند و این اتصال یا برهمکنش برگشت پذیر نیست. غلظت‌های مختلف سم کارتاپ بر تجمع پذیری هموگلوبین نیز با طیف‌سنجی مرئی دمایی مورد بررسی قرار گرفت و نمودار نشان داد که با افزایش غلظت سم میزان تجمع پذیری پروتئین افزایش می‌یابد و زمان تاخیر در شروع تجمع پذیری در زمان‌های کوتاه‌تر رخ می‌دهد که نشان از سمیت بالای کارتاپ هیدروکلراید بر پروتئین هموگلوبین است. بنابراین وابستگی رابطه میان سم و هموگلوبین به خوبی دیده می‌شود. باید این نکته را در نظر گرفت که میزان

تجمع پذیری این سم وابسته به غلظت سم و مدت مجاورت با سم نیز می باشد. بعد از مدت زمانی معین و در طول موج مشخص تجمعات پروتئینی به حالت ثابت می رسد (شکل ۸).

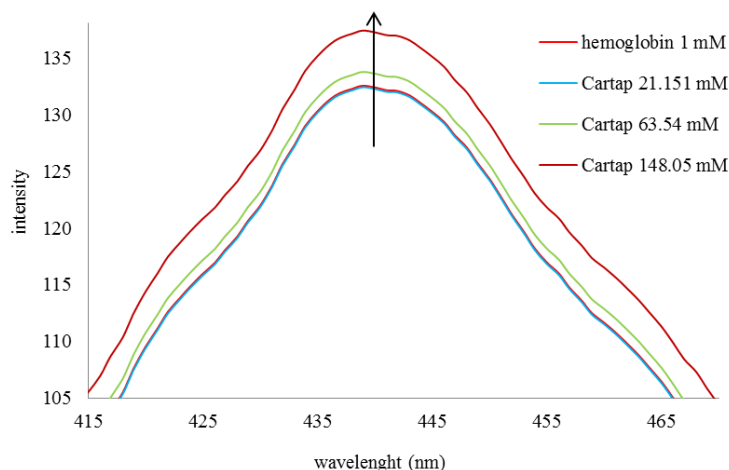


شکل ۸: اثر کینتیک سم در طول موج ۳۶۵ نانومتر و در مدت ۸۰۰ ثانیه نشان دهنده ایجاد تجمعات پروتئینی هموگلوبین در حضور سم کار تاپ با افزایش غلظت است.

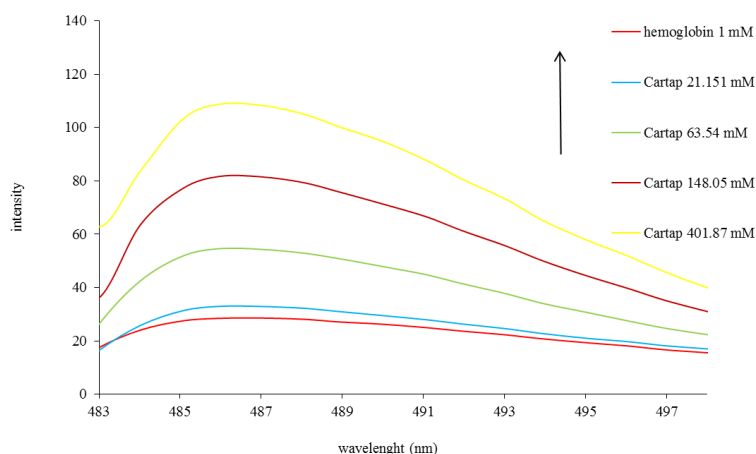
#### بررسی یافته های حاصل از طیف سنجی فلورسانس

به منظور پیگیری ترکیبات حاصل از تخریب هم، دو طیف فلورسانس برای بررسی برهم کنش سم با هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفتند. طیف اول با حداکثر طول موج تهییج در ۳۲۱ نانومتر با نشر در محدوده ۳۳۰-۴۵۰ نانومتر و طیف دوم با حداکثر تهییج در ۴۶۰ نانومتر با نشر در محدوده ۴۶۰-۵۵۰ نشان داده شده است.

شکل (۹) و (۱۰) نشان می دهد که فلورسانس در دو حالت تیتراسیون و انکوباسیون در نواحی تهییج افزایش می یابد. با این وجود با گذشت زمان بیشتر، تغییری در افزایش تخریب هم دیده نمی شود بلکه پس از آن به صورت خطی در می آید و سپس به پایین ترین حد خود می رسد. (نتایج انکوباسیون در این بخش نیامده است).



شکل ۹: طیف نشر فلئوئورسانس هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از کارتاپ. طول موج تهییج ۳۲۱ نانومتر.



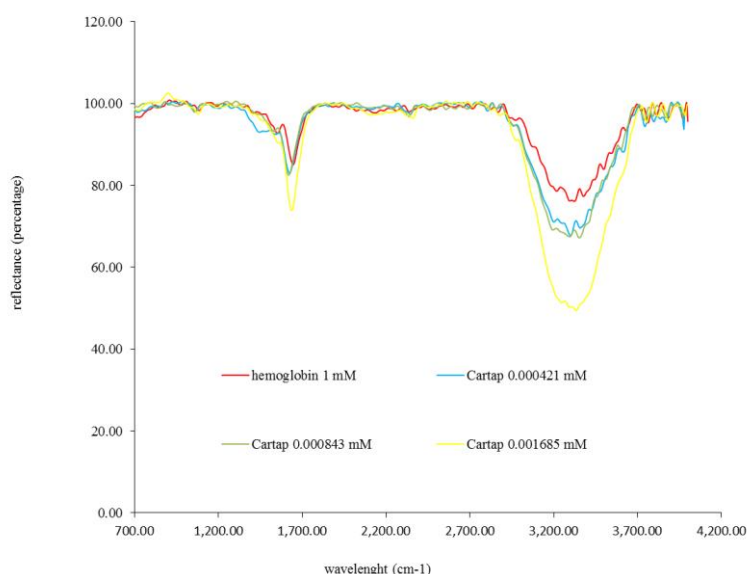
شکل ۱۰: طیف نشر فلئوئورسانس هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از کارتاپ. طول موج تهییج ۴۶۰ نانومتر.

#### بررسی یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی ATR-FTIR

فرکانس تشعشع الکترومغناطیس در ناحیه مادون قرمز (IR) مطابق با فرکانس ارتعاش طبیعی اتم‌های یک پیوند است و پس از جذب امواج مادون قرمز در یک مولکول، باعث ایجاد یک سری حرکات ارتعاشی در آن می‌شود که اساس و مبنای طیف‌سنجی مادون قرمز را تشکیل می‌دهد. ساده‌ترین نوع حرکات ارتعاشی در یک مولکول، حرکات خمشی و کششی است. ساختمان دوم پروتئین هموگلوبین انسانی و تغییرات حاصل از نظر درصد کنفورماسیون مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، ناحیه دو باند طیفی آمید I و II مهم‌ترین طیف‌های به دست آمده هستند. که به ترتیب باند آمید I (در ناحیه  $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ ) عمدتاً مربوط به ارتعاشات کششی ( $\text{C=O}$ ) و به طور مستقیم وابسته به شکل ساختار اصلی و تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشد و

باند آمید II (در ناحیه  $1510-1580\text{ cm}^{-1}$ ) ناشی از ارتعاشات خمشی (N-H) و ارتعاشات کششی (C-N) می باشد (Hadichegani *et al.*, 2015; Goldberg & Chaffotte., 2005).

شکل (۱۱)، طیف ATR-FTIR هموگلوبین به تنهایی در غیاب سم، کارتاپ هیدروکلراید خالص و ترکیب هموگلوبین و محلول کارتاپ با غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در این نمودار در ناحیه‌ی آمید I و II جابجایی مشاهده نشد بنابراین تغییر محسوسی در ساختار دوم هموگلوبین بر اثر برهمکنش با کارتاپ ایجاد نشده است.



شکل ۱۱: طیف ATR به دست آمده از هموگلوبین به تنهایی و در حضور سم کارتاپ

## نتیجه‌گیری

یکی از عواملی که امروزه در تخریب محیط‌زیست نقش زیاد دارد، استفاده بی‌رویه از کودها و سموم شیمیایی در تولیدات کشاورزی است که نه تنها به محیط‌زیست بلکه بر صنایع مختلف آسیب جدی وارد کرده است و سلامت انسان‌ها و حیات جانوران نیز از آثار سوء آن در امان نیستند. در مورد اثرات سموم و فلزات سنگین و دیگر عوامل مسمومیت‌زا به صورت حاد و به خصوص مزمن (بیشتر در مدل‌های حیوانی) مطالعات فراوانی شده است، لذا همچنان به آزمایشات مختلف برای اندازه‌گیری تغییر پارامترهای خونی ناشی از این سموم، نیاز می‌باشد (Talebi Jahromi., 1385). در این تحقیق برای بررسی اثرات بیولوژیکی سم کارتاپ در سطح مولکولی با استفاده از روش‌های مختلف طیف‌سنجی اثرات غلظت‌های مختلف این سم روی هموگلوبین (پروتئین مهم خون که نقش مهمی در اکسیژن‌رسانی دارد) مورد بررسی قرار گرفت. کاربایل در برنامه‌های بهداشت عمومی، دامپزشکی و کشاورزی برای مبارزه با آفات گوناگون به طور گسترده به کار رفته است. در مسمومیت با کاربامات‌ها نیز استیل‌کولین در بدن

انباشته می شود و عملکرد عصب پاراسمپاتیک، افزایش می یابد. کندی نبض، اسهال، استفراغ، انقباضات ماهیچه ای، افزایش ترشحات بدن و... از عوارض ناشی از مسمویت با کاربامات هاست (Risher et al., 1987). نتایج بررسی های همولیزی نشان دهنده ی توانایی بالای این سم برای لیز سلول های قرمز و در معرض قرارگیری هموگلوبین با سم می باشد. طیف فرابنفش مرئی در روش تیتراسیون و انکوباسیونی نشان دهنده ی تغییرات آشکار در جذب هموگلوبین در برهمکنش با کارتاپ هیدروکلراید در نواحی گلوبین و باند سورت می باشد که نشان دهنده ی تغییرات ساختاری القا شده توسط سم می باشد. جابجایی ۵ نانومتر طیف جذبی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به سمت طول موج های بلندتر در ناحیه ی گلوبین (red shift) نشان دهنده ی درگیری سطح پروتئین در برهمکنش با سم و همچنین جابجایی طیف جذبی در طول موج ۴۱۵ نانومتر به سمت طول موج های کوتاه تر در ناحیه ی سورت (blue shift) نشانگر نفوذ سم به پاکت هیدروفوب می باشد (Hosseinzadeh & Moosavi Movahedi., 2016). تغییرات جذب باند Q (گونه های فعال و غیرفعال هموگلوبین) نیز بیانگر این نکته است که سم کارتاپ علاوه بر اثرات ساختاری، اثرات عملکردی نیز بر روی هموگلوبین دارد. بررسی تغییرات جذب در طول موج های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر نیز نشان دهنده ی کاهش فعالیت هموگلوبین بر اثر برهمکنش با سم می باشد. همچنین نتایج حاصل از بررسی گونه های هموگلوبین نشان می دهد که اکسی هموگلوبین کاهش و داکسی هموگلوبین و متهموگلوبین افزایش یافته است. حالت فعال هموگلوبین (اکسی) کم شده و وقتی سم اضافه می شود، رقابت با جایگاه اکسیژن گیری در هموگلوبین اتفاق می افتد. از طرفی، نتایج میزان تجمع پذیری هموگلوبین در حضور سم کارتاپ هیدروکلراید نشان دهنده ی ایجاد تجمعات پروتئینی و القای تغییرات ساختاری و عملکردی بر هموگلوبین می باشد. در نتیجه می توان گفت که افزایش غلظت سم کارتاپ بر هر دو مورد یعنی اثر همولیزی و تجمع پذیری مثبت می باشد و اهمیت این مقاله آشکار کردن مکانیسم اثر برهمکنش این سم با هموگلوبین بوده است. همچنین یافته های ما از بررسی فلورسانس و برهمکنش هموگلوبین با کارتاپ در شرایط آزمایشگاهی نشان می دهد که تخریب محصولات هم ابزار مهمی برای تشخیص و شناسایی سطوح تخریب هموگلوبین تحت شرایط خاص مانند در معرض قرار گرفتن با سموم یا استرس اکسیداتیو می باشد که خود توضیحی بر مسیرهای واکنشی مسئول تخریب هم و نیز سنجش حساسی برای هموگلوبین و سلول های قرمز تحت شرایط پاتولوژیکی در بدن است (Nagababu & Moses Rifkind., 1998). نتایج بدست آمده از بررسی های طیف سنجی تبدیل فوری نشان دهنده این است که جابجایی در نواحی آمید I و آمید II مشاهده نشد، لذا ساختار دوم پروتئین بر اثر برهمکنش با سم تغییر محسوسی نکرده است. (Hadichegeni et al., 2015) با توجه به اینکه سم کارتاپ هیدروکلراید به دلیل وجود مزارع برنج و زمین های کشاورزی در کشور ایران کاربردهای وسیعی دارد برای جلوگیری از اثرات مضر سم، تعیین مکانیسم اثر آن بر پروتئین حائز اهمیت می باشد.

## سپاسگزاری

در پایان از همکاری سرکار خانم آیدا درودیان برای همکاری در انجام این تحقیق قدردانی می‌شود.

## منابع

- Abbasi-Tejarag, KH, Divsalar, A, Saboury, A.A, et.al. (2014) In vitro study of oxali-palladium effect on human hemoglobin. *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences*. Oct, Nov; 16(4): 110-119.
- Aldridge, w.n and Magos, l. (1978) Carbamates, Thiocarbamates, dithiocarbamats. *Health Criteria (Exposure/Effect Relationships)*. Surrey: Medical Research Council Toxicology Unit Carshalton.
- Ali, M, Ghiasi, F, Badakhshan, H. (2014) Acute effects of combined herbicides (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) and (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) on blood factors and ALT and AST liver enzymes in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* ). *Iranian Journal of Health and Environment*. 7 (1):95-104.
- Ariaeenejad, Sh, Moosavi-Movahedi, A.A and Kavousi, K, (2014) The Species and Heme Pocket Properties of Sturgeon Hemoglobins Upon Interaction with N-dodecyl Trimethylammonium Bromide. *Protein & Peptide Letters*, 21.
- Benesch, R.E., Benesch, R., and Yung, S. (1973). Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analytical biochemistry*, 55(9), 245-248.
- Chen, C-Y.Zhao and B.Wang, Z-W. (2010) Interaction of thiacloprid with bovine hemoglobin using spectroscopic and molecular modeling methods. *Spectroscopy* 24: 559-566.
- Dehghani, R. (1385) *Environmental Toxicology*. Kashan University of Medical Sciences.
- Goldberg, M and Chaffotte, A. (2005) Undistorted structural analysis of soluble proteins by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Protein Science*, 14:2781-2792.
- Hadichegeni, Sh, Goliaei, B and Hashemi, M. (2015) Investigation of the Human Serum Albumin (HSA) Protein Structure Change Caused by Remained Diazinon Toxin on the Food Materials. *Journal of Arak University of Medical Sciences*; 18(100): 92-101.
- Hosseinzadeh, R and Moosavi Movahedi, A. A. (2016) Human hemoglobin structural and functional alterations and heme degradation upon interaction with benzene: A spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 157: 41-9.
- Inchem, (1978) CARTAP. JMPR. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v078pr06.htm>
- Kumar, A. Singh, A and Sibia, R.( 2013) a rare case of Cartap poisoning. *Journal of Punjab Academy of Forensic Medicine & Toxicology*. 13(2): 88-89.
- Maghami, p, Valipour, m. et al. (2014) Formation of heme degradadation products during the interaction of human hemoglobin with Methyl Teritary Butyl Ether (MTBE). *Molecular biology research communications*. 3(1):53.
- Mahdavi asl, R. (1390) Effects of sub-lethal concentrations of endosulfan (organochlorine) and diazinon (organophosphate) pesticides on hematological and serum biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio* ). *Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of Animal Science and Fisheries*. Master's thesis, 1-20.
- Motevalian, S.A.( 1380) *Pesticides and their use*, Iran University of Medical Sciences and Health Services.

- Nagababu, E and Moses Rifkind, J. (1998) formation of fluorescent Heme degradation Products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. Biochemical and biophysical research communications; 247: 592-596.
- Perutz, M.F and Lehmann, H. (1968) Molecular pathology of human hemoglobin. Nature; 219(157):902-909.
- Raza, A.N.Aslam., M.Noreen, Z et.al. (2013) spectrophotometric determination of cartap hydrochloride in commercial samples of pesticides by iron (III) complexation. International Journal of Current Pharmaceutical Research, 5(3): 54-58.
- Riggs, A. (1981) Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. Methods Enzymol. 76: 5-29.
- Risher, J.F., Mink, F.L and Stara, J.F.(1987)The toxicologic effects of the Carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. Environmental health perspectives; 72: 267-81.
- Srivastava, R. and Foundation. Saxena, R. C. (1376) Toxicology insects. Translated by Mohammad Hassan Sraylv. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan.
- Talebi Jahromi, Kh. (1385) pesticides Studies, Tehran University Press, second edition, 492.

## The Study of structural and aggregation changes of human Hemoglobin in the presence of Cartap

M. Emadi<sup>1</sup>, P. Maghami<sup>2\*</sup>, kh. Khorsandi<sup>3</sup>, R. Hosseinzadeh<sup>4\*</sup>

Received:2019.3.16

Accepted:2020.7.26

### Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of Cartap hydrochloride on the structure and function of Hemoglobin to determine the molecular mechanism of toxicity of toxin. In this research, the effect of Cartap on the structure and aggregation of human hemoglobin was investigated by UV-visible spectroscopy, thermal spectroscopy, florescent spectroscopy and Attenuated Total Reflection Fourier Transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy in both titration and incubation conditions and with different concentrations of toxic. Based on UV-visible spectroscopy results, revealed that absorption spectra were changed by adding different concentrations of toxin. Analysis of the levels of oxy-deoxy and Met -hemoglobin in presence of various concentration of Cartap showed a decrease in active hemoglobin species. Moreover, the aggregation and hemolysis of red blood cells increased in presence of Cartap. In Florescent spectroscopy minor degradation of Heme happened and second structure of hemoglobin has not been altered in presence of toxin.

**Keywords:** Heme, Hemolysis, Pesticide, Red cells, Spectrophotometry.

---

1- MSC of Biophysics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor of Biophysics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

\*(Corresponding author: maghami@srbiau.ac.ir)

3- Assistant Professor of Biochemistry, Department of Photodynamic, Medical laser research center, YARA institute, ACECR, Tehran, Iran

4- Assistant Professor of Biophysics, Department of Medical laser, Medical laser research center, YARA institute, ACECR, Tehran, Iran

\*(Corresponding author: r.hosseinzadeh@ut.ac.ir)

## تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر عمر گلجایی، برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گل

شاخه بریده رز (*Rosa hybrida* L. cv. Royal Bacara)

مژده فرازمندی<sup>۱</sup>، عباس میرزاخانی<sup>۲\*</sup>، نورعلی ساجدی<sup>۳</sup>، مسعود گماریان<sup>۴</sup>، محمد نصری<sup>۵</sup>.

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۸/۱۹

تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۷/۲۰

### چکیده

گل‌رز از مهمترین گل‌های بریده در جهان است. پژوهشی به منظور بررسی اثرات بنزیل‌آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین جهت کاهش فعالیت‌های تسریع کننده فرایند پیری توسط اتیلن و افزایش ماندگاری گل‌رز رقم رویال باکارا در سال ۲۰۱۷ در منطقه پاکدشت استان تهران انجام گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بود و فاکتورهای مورد بررسی شامل بنزیل‌آدنین در سه سطح صفر (شاهد)، ۷۵ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام و ۱- متیل سیکلوپروپین در سه سطح صفر (شاهد)، یک و دو میکرولیتر بر لیتر بودند. روش نگهداری پس از برداشت گل شاخه بریده به صورت تیمار کوتاه مدت (پالسینگ) بود. نتایج نشان داد که اثر متقابل کاربرد بنزیل‌آدنین و ۱-متیل سیکلوپروپین بر محتوای اتیلن، مارکر زیستی مالون دی‌آلدئید (MDA)، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مارکر زیستی تخریب دی‌تیروزین، درصد نشت یونی غشاء سلول، میزان پتاسیم و عمر گلدانی گل رز معنی‌دار بود. بیش‌ترین میزان آنتی اکسیدان SOD، عمر گلجایی و میزان پتاسیم از تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل‌آدنین با ۲ میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین حاصل شد و این تیمار، کمترین محتوای مارکرها، زیستی تخریب مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین، تولید اتیلن و درصد نشت یونی را داشت که بیانگر تأثیر مثبت بنزیل‌آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر ماندگاری گل شاخه بریده‌ی رز می باشد. نتایج کلی این تحقیق نشان داد که با کاربرد توأم یک یا دو میکرو لیتر در لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر بنزیل‌آدنین می توان ماندگاری گل شاخه بریده‌ی رز را بهبود داد.

**واژه های کلیدی:** بنزیل‌آدنین، رز، سوپراکسید دیسموتاز، مالون دی‌آلدئید، ماندگاری گل، ۱- متیل سیکلو پروپین

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲- استادیار علوم باغبانی گرایش فیزیولوژی و اصلاح گیاهان زینتی، بخش زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران.

\* (نویسنده مسئول: mirz51@yahoo.com)

۳- دانشیار، زراعت و اصلاح نباتات گرایش فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۴- استادیار، زراعت و اصلاح نباتات گرایش فیزیولوژی و اصلاح گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۵- دانشیار، زراعت و اصلاح نباتات گرایش فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، تهران، ایران.

## مقدمه

ایران کشوری چهار فصل و برخوردار از تنوع آب و هوایی و اقلیمی است که استعداد بالقوه‌ی بسیاری برای تولید انواع گیاهان و رونق کشاورزی و باغبانی دارد و بهره‌گیری از این استعداد و مزیت اقتصادی ضروری است. رز یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده صادراتی در جهان است و به‌عنوان گیاه زینتی (بستری، گلدانی و شاخه بریده)، دارویی و غذایی کاربرد دارد (Zhou et al., 2009). امروزه، کوتاه بودن طول عمر گل‌های بریده و برگ‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلات تولید به شمار می‌رود. مورفولوژی و دوام گل گیاهان زینتی، از موارد مهمی است که برای ارزیابی کیفیت گل‌ها، استفاده می‌شود (Iqbal et al., 2012). بنابراین کاربرد روش‌هایی که بتواند عمر گل را افزایش دهد، حائز اهمیت می‌باشد (Janowska and Jerzy, 2008). از بین ترکیبات موثر بر عمر پس از برداشت گل‌رز، می‌توان به کاربرد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آدنین و ماده ۱- متیل‌سیکلوپروپین اشاره نمود (Huang et al., 2014). به‌نظر می‌رسد ۱- متیل‌سیکلوپروپین از اتصال اتیلن تولیدی در گیاه به گیرنده‌های اختصاصی ممانعت می‌کند و از این راه می‌تواند عمر انباری بسیاری از گل‌های بریدنی و گل‌های گلدانی را افزایش دهد (Sisler et al., 2009). علاوه بر این از بیان برخی ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی مراحل رسیدگی مانند *tACS<sub>2</sub>*، *tACS<sub>4</sub>* و *tACO* جلوگیری می‌کند (Batu, 2004). این ترکیب برگ‌های گل‌های شاخه بریده را در وضعیت خوبی نگه داشته و با کاهش درصد افت وزن گل شاخه‌بریده و پیشگیری از آسیب به کلروفیل و کربوهیدرات‌ها، مانع کاهش وزن خشک آنها می‌شود (Serek et al., 2014) و افزایش عمر گلجایی<sup>۱</sup> را به‌دنبال دارد. محققان (Larrigaudiere et al., 2004) گزارش کردند، افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تیمار شده با ۱- متیل‌سیکلوپروپین به‌دلیل کاهش تولید اتیلن و افزایش تجزیه رادیکال آزاد سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن و توانایی این ماده در ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد سلولی است (Saemi et al., 2017).

بنزیل‌آدنین از طریق افزایش تقسیم سلولی و یا حرکت مواد غذایی به محل تیمار شده، باعث رشد گیاه می‌گردد و با توزیع مواد غذایی، تقسیم سلولی و توسعه سلول، باعث بزرگ و نرمال شدن برگ‌ها می‌شود (Carey et al., 2008). کاربرد این ترکیبات بر روی گیاهان، موجب بهبود جذب محلول و حفظ تورژسانس گلبرگ‌ها و کاهش سرعت تنفس، کاهش حساسیت به اتیلن و جلوگیری از تولید اتیلن می‌گردد (Saffari et al., 2004). یکی از مهم‌ترین اثرات سیتوکنین‌های مصنوعی و طبیعی تاخیر در پیری و تسریع انتقال مواد غذایی و مواد آلی است (Shakriet et al., 2005). افزایش طول شاخه‌ها و افزایش قطر غنچه گل در گیاهان تیمار شده با بنزیل‌آدنین گزارش شده است (Patilet et al., 2016). پژوهشگران گزارش نمودند که سرعت تنفس در برگ‌های تیمار شده با بنزیل‌آدنین پایین بوده و این امر موجب کاهش از بین رفتن کربوهیدرات‌ها در گل‌های شاخه بریده می‌شود (Ranwala & Miller, 2013). کاهش میزان پروتئین غشاء در طی روند پیری گل‌های میخک باعث افزایش نفوذپذیری غشاء به

<sup>۱</sup> vase life

مالون‌دی‌آلدئید می‌گردد (Schauenstein *et al.*, 2014). همچنین افزایش معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید گلبرگ‌های داوودی همزمان با پیری گزارش شده است (Debasis *et al.*, 2007 & Bartoli *et al.*, 2015). سایر تغییرات ضمن پیری گلبرگ‌ها شامل افزایش نفوذپذیری غشای سلولی، نشت محتویات واکوئل (Bielecki & Reid, 2012)، کاهش کربوهیدرات گلبرگ‌ها افزایش فعالیت آنزیم‌های اسید فسفاتاز، ریبونوکلئاز و ATPase، تغییر شکل پروتئین‌ها (Mutu, 2011) و افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Van Meeteren *et al.*, 2015) است. تیمارهای مختلف سیتوکینین، تولید مالون‌دی‌آلدئید را به‌عنوان یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپید، در مقایسه با تیمارهای شاهد به میزان چشمگیری کاهش داد (Rabiza-Swider *et al.*, 2004). دلیل این امر می‌تواند تأثیر سیتوکینین بر سامانه‌ی تنفس یاخته‌ای و تأثیر در تنظیم فعالیت‌های جلوگیری از اکسایش و دیگر فعالیت‌های آنزیمی باشد (Nikbakht *et al.*, 2008). بنابراین این آزمایش با هدف افزایش عمر گلجایی و بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گل رز رقم باکارا با استفاده از بنزیل‌آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن در منطقه پاکدشت استان تهران صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر بنزیل‌آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن بر برخی خصوصیات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ماندگاری گل رز رقم رویال باکارا، آزمایشی در سال ۲۰۱۷ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین (پیشوا) اجرا شد. در این آزمایش فاکتور اول شامل بنزیل‌آدنین در سه سطح صفر (شاهد)، ۷۵ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام و فاکتور دوم ۱- متیل سیکلوپروپن در سه سطح صفر (شاهد)، یک و دو میکرولیتر بر لیتر در سه تکرار بر گل شاخه بریده رز رقم رویال باکارا بود. گل‌های شاخه بریده همسن و هم اندازه از گلخانه تجاری در پاکدشت تهیه شد. این گل‌ها با استفاده از قیچی تیز به‌طول ۸۰ سانتی‌متر بریده و در دسته‌های ۲۵ تایی بسته‌بندی و بلافاصله به محل اجرای آزمایش در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین منتقل شدند. در این آزمایش گل‌ها به صورت نیمه باز و قبل از برگشتن لبه گلبرگ‌ها، از بوته‌ها برداشت شد و پس از انتقال به آزمایشگاه برای یکسان کردن اندازه شاخه‌ها با استفاده از قیچی باغبانی به طول ۶۰ سانتی‌متر در زیر آب به‌صورت اریب برش‌مجدد<sup>۱</sup> داده شد. برگ‌های پایین هر شاخه تا محل قرار گرفتن داخل محلول‌ها حذف شد. روش نگهداری پس از برداشت گل‌های شاخه بریده به‌صورت تیمار کوتاه مدت<sup>۲</sup> بود. در این آزمایش برای تهیه غلظت‌های موردنظر ۱- متیل سیکلوپروپن از روش Macnish *et al.* (2000) و Cameron & Reid (2001) استفاده گردید. ۱- متیل سیکلوپروپن مورد استفاده ساخت آمریکا<sup>۳</sup> و بر اساس ادعای شرکت سازنده دارای درجه خلوص ۰/۱۲۷ درصد بود. برای به‌دست آوردن غلظت‌های

<sup>۱</sup> -Recutting

<sup>۲</sup> - pulsing

<sup>۳</sup> - Ethylbloc (Rohm-Haas, Spring House, PA), USA

مورد نظر ۱- متیل سیکلوپروپین، پودر اتیل بلوک، توزین و سپس درون بشرهای کوچک در بسته منتقل گردید و با ۱۰ میلی لیتر آب ۶۰ درجه سانتی گراد و ۱۰ میلی لیتر محلول ۱٪ (KOH: NaOH) ترکیب شد و به داخل بشرهای کوچک حاوی پودراتیل بلوک در غلظت های یادشده اضافه شد، این مراحل در زیر هود آزمایشگاه انجام گردید. حدود ۲۰ ثانیه پس از ترکیب مواد فوق گاز ۱- متیل سیکلوپروپین از پودر اتیل بلوک متصاعدگردید. نمونه ها تحت تاثیر ۱- متیل سیکلوپروپین درون یک جار دهان گشاد با ظرفیت ۵ لیتر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد تیمار شدند. لازم به ذکر هست که دهانه ی جارها پس از اعمال تیمار با یک لایه پوشش پلی پروپیلن مسدود شد، پس از این مدت درب ظروف باز و تهویه انجام شد. بنزیل آدنین<sup>۱</sup> مورد استفاده از شرکت مرک آلمان بود که پس از تهیه غلظت های مورد نظر، گل ها به مدت ۱۲ ساعت در آن قرار گرفتند. تیمار شاهد شامل گل هایی بود که بدون هیچ تیماری در داخل آب مقطر قرار گرفتند و گل های شاخه بریده برای ارزیابی به اتاق استاندارد پس از برداشت با دمای  $1 \pm 22$  درجه سانتی گراد و شدت نور  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  و رطوبت نسبی ۷۰٪ و طول دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شدند. لازم به ذکر است که در هر تیمار از تعداد ۹ گل شاخه بریده استفاده گردید. درهمه ی تیمارها پایان عمر گلجایی<sup>۲</sup> بر اساس پژمردگی بیش از یک سوم گلبرگ ها یا خمیدگی گردن گل مشخص گردید (Liao et al., 2009).

برای اندازه گیری اتیلن، یک شاخه گل در یک ظرف شیشه ای نفوذ ناپذیر در بسته ۳ لیتری در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرارگرفت و بعد از ۲ ساعت توسط یک سرنگ مخصوص، یک میلی لیتر از گاز درون بطری نمونه گیری شد و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) میزان اتیلن موجود در آن یادداشت گردید. محتوای مارکر زیستی تخریب مالون دی آلدئید (پراکسیداسیون لیپید) براساس روش Steven & Joseph (1978) سنجش شد. در این روش عصاره ای از ۰/۵ گرم از گلبرگ آسیاب شده براساس روش تیوباربتوریک اسید با مالون دی آلدئید مورد استفاده قرارگرفت. در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی پنج میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید آسیاب شده و عصاره به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت ۲۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد گذاشته شد و پس از کاهش فوری دمای آن با یخ خرد شده، به مدت پنج دقیقه با همان سرعت قبل سانتریفوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات اضافی، جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ( $A_{600}$ ) قرائت شد و از مقدار جذب آن ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر ( $A_{532}$ ) کم شد. در نهایت میزان مالون دی آلدئید از طریق رابطه محاسبه گردید.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol g FW}^{-1}) = [(A_{532} - A_{600}) / 155.5] \times 1000$$

<sup>۱</sup> - N6-Benzyladenine

<sup>۲</sup> - Vase life

محتوای آنزیم آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز توسط روش Misra & Fridovich (1972) در آزمایشگاه تعیین شد. ابتدا محلول بافرتریس (حاوی فسفات، دی سدیک،  $\text{pH} = 7.2$ ) به همراه  $1/3$  میلی مول EDTA و  $0.1$  میلی مول کربنات منو سدیک تهیه شد و سپس از اپی نفرین با غلظت  $0.25$  میلی مول به عنوان گهرمایه استفاده شد، و  $0.5$  گرم از گلبرگ آسیاب شده به آن اضافه گردید، تغییرات جذب نوری حاصله از اکسیداسیون اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی شد و از آنزیم استاندارد و خالص برای استاندارد نمودن نتایج استفاده گردید که واحد آن قادر به اکسیداسیون  $0.5$  میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه باشد.

اندازه‌گیری نشت یونی براساس روش Poovaiah (1979) انجام شد، نمونه‌های برگ‌ی در ابعاد یک سانتی متر مربع بریده شدند و برای زدودن آلودگی‌های سطحی، سه بار با آب مقطر شسته شدند. نمونه‌ها پس از شست‌وشو، در داخل لوله‌های شیشه‌ای درپوش‌دار حاوی  $10$  میلی لیتر آب مقطر، گذاشته شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق ( $25$  درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. سپس هدایت الکتریکی اولیه ( $\text{EC}_1$ ) با استفاده از دستگاه  $\text{EC}$  متر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در اتوکلاو در دمای  $120$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $20$  دقیقه قرار گرفتند و پس از سرد شدن در دمای اتاق، هدایت الکتریکی ثانویه ( $\text{EC}_2$ ) اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد نشت یونی برگ ( $\text{EL}$ ) برحسب درصد از طریق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{EL}\% = (\text{EC}_1 / \text{EC}_2) \times 100$$

برای اندازه‌گیری مارکر زیستی تخریب دی تیروزین،  $0.5$  گرم از گلبرگ از گیاه استخراج با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در بافر فسفات تریس  $0.16$  مولار با  $\text{pH} = 7.5$  وارد و خرد و هموژن گردید، آنگاه اجازه داده شد حجم مشابه از همان بافر حاوی دی‌جی‌توتین و آنزیم هضم کننده دیواره، فرآیند هضم غشاء دیواره سلول را انجام دهند. در پایان مقدار  $0.5$  میلی لیتر در محلول هموژن برای سنجش توسط روش Steven (1978) برداشته شد همچنین میزان پتاسیم گل شاخه‌بریده با کمک اکسیداسیون مرطوب توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Rabiza-Swider *et al.*, 2004). برای اندازه‌گیری صفات فوق از بافت گلبرگ گل‌ها استفاده گردید. برای بررسی روند تغییرات، صفات بیوشیمیایی  $2$ ،  $4$ ،  $6$  و  $8$  روز پس از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS version 9.1.3 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال  $5$  درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

### آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر ساده تیمارها در سطح احتمال  $5\%$  و اثر متقابل بنزیل‌آدنین و  $1$  - متیل سیکلوپروپن در طی روزهای مختلف بر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال  $1\%$  معنی‌دار شد (جدول ۱).

نتایج اثرات متقابل تیمارها نشان داد در روز دوم، چهارم، ششم و هشتم بیشترین میزان سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۱۵۰ پی پی ام

**جدول ۱: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر محتوای سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی آلدئید گلبرگ**

| منبع تغییر آزادی | درجه | سوپر اکسید دیسموتاز |         |         |         |         |         |          | مالون دی آلدئید |       |
|------------------|------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|-----------------|-------|
|                  |      | روز ۲               | روز ۴   | روز ۶   | روز ۸   | روز ۲   | روز ۴   | روز ۶    | روز ۸           | روز ۸ |
| BA               | ۲    | ۶/۹۵*               | ۶/۰۷**  | ۳۵/۳۳** | ۴۴/۳۸** | ۰/۱۰۷*  | ۰/۱۸*   | ۲۴/۹۳۳** | ۶/۶۴۱*          |       |
| 1-MCP            | ۲    | ۷/۱۰*               | ۵/۹۸*   | ۵۹/۰۱** | ۳/۲۱*   | ۰/۰۶۵*  | ۰/۲۱*   | ۹/۰۸۲*   | ۷/۰۱۲*          |       |
| 1-MCP× BA        | ۴    | ۴۸/۴۲**             | ۲۵/۰۱** | ۴۲/۵۸** | ۲۰/۷۴** | ۲۱/۳۸** | ۴۹/۲۵** | ۵۷/۰۴۲** | ۲۹/۳۷**         |       |
| Error            | ۲۷   | ۱/۲۵                | ۰/۹۹    | ۱/۴۹    | ۰/۵۲    | ۰/۰۱۷   | ۰/۰۳۹   | ۱/۱۸۷    | ۰/۹۸            |       |
| CV (%)           | -    | ۴/۲۵                | ۳/۸۹    | ۵/۱۲    | ۴/۳۳    | ۳/۰۲    | ۴/۱۲    | ۳/۸۱     | ۳/۶۴            |       |

ns و \*\* و \* به ترتیب به معنی عدم معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

**جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر محتوای سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی آلدئید گلبرگ**

| تیمار ها               | سوپر اکسید دیسموتاز<br>(Unit.mg protein.min <sup>-1</sup> ) |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     | مالون دی آلدئید (μmol gFW <sup>-1</sup> ) |                     |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------------|---------------------|
|                        | روز ۲                                                       | روز ۴               | روز ۶               | روز ۸               | روز ۲               | روز ۴               | روز ۶               | روز ۸               | روز ۲                                     | روز ۴               |
| Control                | ۰/۸۰۶ <sup>d</sup>                                          | ۰/۸۱۲ <sup>d</sup>  | ۰/۸۴۷ <sup>e</sup>  | ۰/۷۸۹ <sup>d</sup>  | ۳/۰۳۷ <sup>a</sup>  | ۳/۱۱۶ <sup>a</sup>  | ۳/۰۹۴ <sup>a</sup>  | ۳/۲۴۶ <sup>a</sup>  | ۳/۲۴۶ <sup>a</sup>                        | ۳/۲۴۶ <sup>a</sup>  |
| μl/L 1-MCP 1           | ۰/۸۷۳ <sup>c</sup>                                          | ۰/۹۴۱ <sup>cd</sup> | ۰/۹۷۴ <sup>de</sup> | ۰/۹۲۷ <sup>c</sup>  | ۲/۲۶۹ <sup>ab</sup> | ۲/۴۸۴ <sup>b</sup>  | ۲/۳۲۸ <sup>b</sup>  | ۲/۶۹۱ <sup>b</sup>  | ۲/۶۹۱ <sup>b</sup>                        | ۲/۶۹۱ <sup>b</sup>  |
| μl/L 1-MCP 2           | ۰/۸۹۷ <sup>c</sup>                                          | ۰/۹۹۴ <sup>c</sup>  | ۱/۰۱۳ <sup>d</sup>  | ۰/۹۸۶ <sup>bc</sup> | ۲/۱۲۶ <sup>b</sup>  | ۲/۲۸۱ <sup>bc</sup> | ۲/۱۴۹ <sup>bc</sup> | ۲/۴۱۷ <sup>b</sup>  | ۲/۴۱۷ <sup>b</sup>                        | ۲/۴۱۷ <sup>b</sup>  |
| 75ppm BA               | ۰/۹۰۳ <sup>c</sup>                                          | ۰/۹۵۳ <sup>cd</sup> | ۰/۹۶۶ <sup>de</sup> | ۰/۹۴۸ <sup>c</sup>  | ۲/۱۴۹ <sup>b</sup>  | ۲/۴۰۱ <sup>b</sup>  | ۲/۳۴۱ <sup>b</sup>  | ۲/۵۴۸ <sup>b</sup>  | ۲/۵۴۸ <sup>b</sup>                        | ۲/۵۴۸ <sup>b</sup>  |
| 1 μl/L 1-MCP×75ppm BA  | ۰/۹۲۷ <sup>bc</sup>                                         | ۱/۱۲۸ <sup>bc</sup> | ۱/۲۴۳ <sup>bc</sup> | ۱/۰۹۴ <sup>bc</sup> | ۲/۰۱۱ <sup>bc</sup> | ۲/۱۵۴ <sup>bc</sup> | ۲/۰۴۹ <sup>bc</sup> | ۲/۱۶۹ <sup>bc</sup> | ۲/۱۶۹ <sup>bc</sup>                       | ۲/۱۶۹ <sup>bc</sup> |
| 2 μl/L 1-MCP×75ppm BA  | ۰/۹۶۳ <sup>ab</sup>                                         | ۱/۱۸۶ <sup>b</sup>  | ۱/۲۸۶ <sup>b</sup>  | ۱/۱۲۳ <sup>b</sup>  | ۱/۵۷۸ <sup>c</sup>  | ۱/۷۰۳ <sup>c</sup>  | ۱/۶۹۱ <sup>c</sup>  | ۱/۸۲۹ <sup>c</sup>  | ۱/۸۲۹ <sup>c</sup>                        | ۱/۸۲۹ <sup>c</sup>  |
| 150 ppm BA             | ۰/۹۴۶ <sup>b</sup>                                          | ۱/۱۴۷ <sup>bc</sup> | ۱/۱۸۸ <sup>c</sup>  | ۱/۱۳۱ <sup>b</sup>  | ۱/۹۷۶ <sup>bc</sup> | ۲/۰۴۹ <sup>bc</sup> | ۱/۹۶۳ <sup>bc</sup> | ۲/۲۱۴ <sup>bc</sup> | ۲/۲۱۴ <sup>bc</sup>                       | ۲/۲۱۴ <sup>bc</sup> |
| 1 μl/L 1-MCP×150ppm BA | ۰/۹۷۱ <sup>ab</sup>                                         | ۱/۲۸۴ <sup>ab</sup> | ۱/۳۱۷ <sup>ab</sup> | ۱/۲۴۳ <sup>ab</sup> | ۱/۵۹۳ <sup>c</sup>  | ۱/۷۱۳ <sup>c</sup>  | ۱/۵۶۶ <sup>c</sup>  | ۱/۷۲۴ <sup>c</sup>  | ۱/۷۲۴ <sup>c</sup>                        | ۱/۷۲۴ <sup>c</sup>  |
| 2 μl/L 1-MCP×150ppm BA | ۰/۹۹۶ <sup>a</sup>                                          | ۱/۳۸۶ <sup>a</sup>  | ۱/۴۲۹ <sup>a</sup>  | ۱/۳۰۹ <sup>a</sup>  | ۱/۴۶۶ <sup>c</sup>  | ۱/۵۴۱ <sup>c</sup>  | ۱/۴۲۲ <sup>c</sup>  | ۱/۶۰۳ <sup>c</sup>  | ۱/۶۰۳ <sup>c</sup>                        | ۱/۶۰۳ <sup>c</sup>  |

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار (P<0.05) نمی باشند

بنزیل آدنین همراه با دو میکرو لیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین به ترتیب با متوسط ۱/۳۰۹ و ۱/۴۲۹، ۱/۳۸۶، ۰/۹۹۶ واحد بر

میلی گرم پروتئین در دقیقه است که از نظر آماری با تیمار اثر متقابل ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین و یک میکرو لیتر بر لیتر ۱-

متیل سیکلوپروپین اختلاف معنی داری نداشت. کمترین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را تیمار شاهد با میانگین ۰/۷۸۹ و

۰/۸۴۷، ۰/۸۱۲، ۰/۸۰۶ واحد بر میلی گرم پروتئین در دقیقه به خود تخصیص داد (جدول ۲). گزارش شده است که سیتوکینین با

جلوگیری از فعالیت ریبونوکلاز، تخریب پروتئین ها و مرگ سلولی را به تاخیر می اندازد (Perveen et al., 2011). مطالعات نشان

داد که کاهش فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مرتبط با شروع پیری در گل رز می باشد (Debasis et al., 2007).

پژوهشگران عبدوسی و دانایی (2015) تاثیر بنزیل آدنین ۱۵۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر به همراه ساکارز ۸٪ و همچنین نانوذرات

نقره ۵ پی پی ام و آب مقطر را بر گل شاخه بریده ژربرا را بررسی نمودند و گزارش کردند که فعالیت آنزیم های کاتالاز و

سوپراکسیددیسموتاز در تیمارها نسبت به شاهد (عدم مصرف) با سرعت کمتری کاهش یافت و عمر پس از برداشت ژبراً نیز نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. محققین دیگر (Karimi, 2014) گزارش نمودند که افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گل‌های ژبراً تیمار شده با ۱- متیل سیکلوپروپن مشاهده شد. محققین Larrigaudiere et al. (2008) گزارش کردند، افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تیمار شده با ۱- متیل سیکلو- پروپن ممکن است به دلیل کاهش تولید اتیلن و افزایش تجزیه رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باشد. تحقیقات نشان داد کاربرد ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین بر گل رز به‌طور معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز موثر است (Ezhilmathi, 2008)، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

### مارکر زیستی تخریب مالون‌دی‌آلدئید

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، تأثیر تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن در طی روزهای مختلف بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج نشان داد در روز دوم، چهارم، ششم و هشتم بیش‌ترین میزان بیومارکر تخریب مالون‌دی‌آلدئید در تیمار شاهد بود که با تیمار یک میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپن از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. کم‌ترین میزان بیومارکر تخریب مالون‌دی‌آلدئید را تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین توأم با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپن با میانگین ۱/۴۶۶، ۱/۱۰۴۲۲/۵۴۱، ۱/۶۰۳ میکرو مول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه به خود اختصاص داد (جدول ۲). میزان بیومارکر تخریب مالون‌دی‌آلدئید در روز ششم کاهش جزئی داشت شاید به دلیل تأثیر مثبت بنزیل آدنین و افزایش آنتی اکسیدان سوپراکسیددیسموتاز باشد؛ که نشانگر تأثیر بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن در جلوگیری از روند پیری و افزایش میزان ماندگاری گل رز است، هر چند کاربرد بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن از روند پیری گلبرگ تا حدود زیادی کاست اما میزان بیومارکر تخریب مالون‌دی‌آلدئید در روز هشتم نسبت به روز چهارم، ۴ درصد افزایش داشت (جدول ۲) به نظر می‌رسد دلیل این موضوع کاهش جذب آب می‌باشد که با کاهش عمر گلجایی مرتبط است. پیری سلول یک فرآیند اکسیداتیو است و در آن گونه‌های فعال اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانی دخالت دارد (Dhindsa et al., 2011). تحقیقات نشان داد که تنش اکسیداتیو حاصل از پیری باعث افزایش ۱- متیل سیکلوپروپن در برگ‌های سوسن رقم استارگازر شد (Ranwala & Miller, 2013). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپن در روز هشتم نسبت به تیمار شاهد، اثرات منفی بیومارکر تخریب مالون‌دی‌آلدئید ۵۱ درصد کاهش داشت. گزارش شده است که تیمارهای مختلف سیتوکینین، تولید مالون‌دی‌آلدئید را در مقایسه با تیمار شاهد به میزان چشمگیری کاهش داد؛ دلیل این امر می‌تواند تأثیر بنزیل آدنین بر سامانه‌ی تنفس یاخته‌ای، در تنظیم فعالیت‌های جلوگیری از اکسایش و دیگر فعالیت‌های آنزیمی باشد (Nikbakht et al., 2008).

## مارکر زیستی تخریب دی تیروزین

میزان مارکر زیستی تخریب دی تیروزین تحت تاثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین در طی روزهای مختلف قرار گرفت، اختلافات به وجود آمده از نظر آماری در سطح یک و پنج درصد معنی دار بود (جدول ۳). نتایج اثر متقابل تیمارها نشان داد در روز دوم، چهارم، ششم و هشتم بیشترین میزان دی تیروزین در تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) با متوسط ۱/۹۸۶، ۲/۰۲۱، ۱/۹۸۳، ۲/۰۶۸ میکرو مول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه مشاهده شد. کمترین میزان دی تیروزین را تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین + دو میکرو لیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین با میانگین ۱/۰۶۴، ۱/۲۱۲، ۱/۲۰۴، ۱/۲۱۷ میکرو مول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه به خود اختصاص داد (جدول ۴). تجمع رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول ها می توانند به طور مستقیم به غشای چربی ها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه بزنند و با غیرفعال نمودن فعالیت آنزیم های متابولیکی منجر به مرگ سلولی شوند (Alscher et al., 2006). با شدت گرفتن پیری در گل، رادیکال های آزاد افزایش می یابند و اکسیدکننده ها به پروتئین ها حمله می کنند و باعث تغییرات جزئی در مکان های مخصوص اسیدهای آمینه می شوند؛ مثلاً تریپتوفان به سهولت اتصال می یابد تا فرآورده های دی تیروزین را تشکیل دهد (Davies, 2007). تخریب پروتئین و تخریب کلروفیل برگ های جدا شده گشنیز در اثر تیمار با ۱- متیل سیکلوپروپین به تاخیر افتاد (Jianget al., 2012). نتایج تیمارهای برهمکنش بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین نشان داد تاثیر برهمکنش حداکثر غلظت مصرفی توانست با تغییر باند های گیرنده اتیلن (Sisler et al., 2009)، به صورت رقابتی جلوی اثر اتیلن را بگیرد، میزان رادیکال های آزاد را تحت الشعاع قرار دهد و به طور قابل توجهی از میزان دی تیروزین بکاهد؛ نتایج نشان داد که میزان دی تیروزین در روز هشتم کاهش ۱۴ درصدی در تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین همراه با دو میکرو لیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین نسبت به تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین همراه با عدم مصرف ۱- متیل سیکلوپروپین داشت (جدول ۴). بنزیل آدنین، کمبود آدنین مورد نیاز برای اسید ریبونوکلوئیک را فراهم می نماید و از این طریق موجب بازسازی مولکول می گردد، در نتیجه تجزیه پروتئین ها را به تاخیر می اندازد (Mutu, 2011).

جدول ۳: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر محتوای دی تیروزین و اتیلن

| منبع تغییر | درجه آزادی | دی تیروزین          |                     |        |          |         |           | اتیلن  |        |
|------------|------------|---------------------|---------------------|--------|----------|---------|-----------|--------|--------|
|            |            | روز ۲               | روز ۴               | روز ۶  | روز ۸    | روز ۲   | روز ۴     | روز ۶  | روز ۸  |
| BA         | ۲          | ۰/۰۰۸*              | ۰/۰۰۵ <sup>ns</sup> | ۰/۰۶۱* | ۰/۱۰۲*   | ۰/۰۰۴۱* | ۰/۷۴۲*    | ۰/۰۵۱* | ۰/۲۸۱* |
| 1-MCP      | ۲          | ۰/۳۰۰ <sup>ns</sup> | ۰/۰۰۳ <sup>ns</sup> | ۰/۰۴۹* | ۰/۰۹۶*   | ۰/۰۰۳۷* | ۰/۸۲۹*    | ۰/۰۴۵* | ۰/۳۱۵* |
| 1-MCP× BA  | ۴          | ۱/۱۴۹**             | ۲۱/۳۷**             | ۰/۰۵۶* | ۲۴/۰۱۶** | ۲/۲۱۵** | ۱۲۵/۴۱۲** | ۰/۰۴۸* | ۰/۲۸۷* |
| Error      | ۲۷         | ۰/۰۰۱               | ۰/۰۰۱               | ۰/۰۰۸  | ۰/۰۱۶    | ۰/۰۰۰۵  | ۰/۱۲      | ۰/۰۰۷  | ۰/۰۴۱  |
| CV (%)     | -          | ۲/۳۲                | ۲/۹۵                | ۳/۷۴   | ۳/۲۸     | ۶/۰۴    | ۵/۸۶      | ۷/۴۱   | ۶/۹۴   |

ns و \*\* و \* به ترتیب به معنی عدم معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۴: مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر محتوای دی تیروزین و اتیلن

| تیمار ها            | روز ۲                | روز ۴               | روز ۶               | روز ۸               | روز ۲               | روز ۴                | روز ۶                | روز ۸               | اتیلن (nl/gfw.h) |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| Control             | ۱/۹۸۶ <sup>a</sup>   | ۲/۰۲۱ <sup>a</sup>  | ۱/۹۸۳ <sup>a</sup>  | ۲/۰۶۸ <sup>a</sup>  | ۲/۴۳۱ <sup>a</sup>  | ۲/۶۲۸ <sup>a</sup>   | ۲/۷۸۵ <sup>a</sup>   | ۲/۹۶۳ <sup>a</sup>  |                  |
| ۱μL 1-MCP 1         | ۱/۵۸۴ <sup>ab</sup>  | ۱/۶۹۳ <sup>b</sup>  | ۱/۷۸۴ <sup>a</sup>  | ۱/۷۴۹ <sup>b</sup>  | ۲/۲۸۴ <sup>b</sup>  | ۲/۴۸۱ <sup>b</sup>   | ۲/۶۰۴ <sup>a</sup>   | ۲/۷۴۱ <sup>a</sup>  |                  |
| ۱μL 1-MCP 2         | ۱/۳۸۱ <sup>bc</sup>  | ۱/۵۶۳ <sup>b</sup>  | ۱/۵۰۹ <sup>b</sup>  | ۱/۵۹۷ <sup>bc</sup> | ۲/۱۹۷ <sup>bc</sup> | ۲/۳۷۲ <sup>bc</sup>  | ۲/۵۳۲ <sup>ab</sup>  | ۲/۶۱۱ <sup>ab</sup> |                  |
| 75ppm BA            | ۱/۵۰۶ <sup>ab</sup>  | ۱/۷۲۴ <sup>ab</sup> | ۱/۷۹۴ <sup>a</sup>  | ۱/۸۸۶ <sup>b</sup>  | ۲/۲۵۳ <sup>bc</sup> | ۲/۴۸۶ <sup>b</sup>   | ۲/۵۸۴ <sup>ab</sup>  | ۲/۶۵۸ <sup>ab</sup> |                  |
| 1μL 1-MCP×75ppm BA  | ۱/۴۱۷ <sup>abc</sup> | ۱/۵۲۴ <sup>b</sup>  | ۱/۴۵۲ <sup>b</sup>  | ۱/۵۶۴ <sup>bc</sup> | ۲/۲۱۸ <sup>bc</sup> | ۲/۰۴۱ <sup>cd</sup>  | ۲/۱۹۲ <sup>bc</sup>  | ۲/۳۹۴ <sup>bc</sup> |                  |
| 2μL 1-MCP×75ppm BA  | ۱/۲۲۸ <sup>bc</sup>  | ۱/۳۱۸ <sup>bc</sup> | ۱/۳۰۶ <sup>bc</sup> | ۱/۳۳۹ <sup>c</sup>  | ۲/۱۴۵ <sup>c</sup>  | ۱/۹۲۸ <sup>de</sup>  | ۲/۰۱۱ <sup>c</sup>   | ۲/۱۸۶ <sup>c</sup>  |                  |
| 150 ppm BA          | ۱/۳۴۱ <sup>bc</sup>  | ۱/۳۹۸ <sup>bc</sup> | ۱/۳۶۹ <sup>bc</sup> | ۱/۴۱۳ <sup>bc</sup> | ۲/۱۶۳ <sup>c</sup>  | ۲/۱۸۶ <sup>c</sup>   | ۲/۳۰۴ <sup>abc</sup> | ۲/۴۳۸ <sup>b</sup>  |                  |
| 1μL 1-MCP×150ppm BA | ۱/۱۰۷ <sup>c</sup>   | ۱/۲۹۱ <sup>bc</sup> | ۱/۲۶۵ <sup>c</sup>  | ۱/۳۰۴ <sup>c</sup>  | ۱/۷۴۱ <sup>d</sup>  | ۱/۸۱۹ <sup>cde</sup> | ۲/۰۵۴ <sup>bc</sup>  | ۲/۲۴۱ <sup>bc</sup> |                  |
| 2μL 1-MCP×150ppm BA | ۱/۰۶۴ <sup>c</sup>   | ۱/۲۱۲ <sup>c</sup>  | ۱/۲۰۴ <sup>c</sup>  | ۱/۲۱۷ <sup>c</sup>  | ۱/۶۰۲ <sup>d</sup>  | ۱/۸۷۱ <sup>e</sup>   | ۱/۹۸۷ <sup>c</sup>   | ۲/۰۲۱ <sup>c</sup>  |                  |

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) نمی‌باشند

## اتیلن

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد میزان اتیلن تحت تأثیر تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین در طی روزهای مختلف قرارگرفت، اختلافات به‌وجود آمده از نظر آماری در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

نتایج اثر متقابل نشان داد در روز دوم، چهارم، ششم و هشتم بیش‌ترین میزان اتیلن از تیمار (شاهد) مشاهده شد. کم‌ترین میزان اتیلن را تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین همراه با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین با میانگین ۱/۶۰۲، ۱/۸۷۱، ۱/۹۸۷، ۲/۰۲۱ (نانولیترا/گرم وزن تازه در ساعت) به‌خود تخصیص داد که با تیمار ۷۵ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین توأم با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). هرچند کاربرد بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین از روند پیری گلبرگ تا حدود زیادی کاست، اما میزان اتیلن در روز هشتم افزایش قابل توجهی داشت که آغاز روند پیری سلول بود. تأثیر سیتوکنین‌ها در به تعویق انداختن پیری، به‌علت ایجاد تغییر در مسیر سیگنال‌دهی اتیلن است (Chang *et al.*, 2005). در طی فرآیند پیری، اتیلن باعث سرعت بخشیدن فرآیند تجزیه‌ی سیتوکنین می‌شود (Taverner *et al.*, 1999). اثر مثبت تیمار ۱- متیل سیکلوپروپین در افزایش کیفیت پس از برداشت گل‌های شاخه بریده لاله با ممانعت از اثر اتیلن مشخص گردید (Chutichudet *et al.*, 2010). در این تحقیق تیمار عدم مصرف مواد ضد پیری، بیش‌ترین میزان اتیلن را تولید کرد، ولی با مصرف دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، میزان اتیلن حدود ۱۲ درصد کاهش یافت که در تیمار ۷۵ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین همراه با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، کاهش ۲۶ درصدی داشت، که ممکن است علت آن ساخت دوباره گیرنده‌های اتیلن می‌باشد (Song *et al.*, 2010).

2014). در این پژوهش برهمکنش بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین میزان اتیلن تولیدی توسط گلبرگ‌ها را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد که با گزارش چانگ و همکاران (Cheng et al., 2012) مطابقت دارد.

### درصد نشت یونی در گلبرگ

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد درصد نشت یونی در گلبرگ تحت تاثیر اثرات ساده و متقابل بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین در طی روزهای مختلف قرارگرفت، اختلافات به وجود آمده از نظر آماری در سطح یک و پنج درصد معنی دار بود (جدول ۵). نتایج اثرات متقابل نشان داد در روز دوم، چهارم، ششم و هشتم بیشترین میزان نشت یونی در گلبرگ در تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) به ترتیب با متوسط ۴۸/۲۱، ۶۷/۳۶، ۶۹/۷۳ و ۸۰/۶۲ درصد مشاهده شد. کمترین میزان نشت یونی در گلبرگ را تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین در روزهای مختلف با میانگین ۲۵/۴۳، ۵۰/۲۹، ۵۳/۹۸ و ۵۹/۴۶ درصد به خود اختصاص دادند (جدول ۶). سیتوکینین‌ها با تأخیر در از دست‌دهی آب گلبرگ‌ها و نشت یونی باعث شدند تا وزن تر گل‌های شاخه بریدنی در طول دوره پس از برداشت، دیرتر کاهش یابد (Hutchinson et al., 2010). نتایج این تحقیق نشان داد افزایش نفوذپذیری غشا در طی روند پیری نیز سبب افزایش نشت یونی و از دست‌دهی آب توسط گلبرگ‌ها شد؛ بنابراین کاهش از دست‌دهی آب گلبرگ‌ها توسط تیمارهای مختلف نقش مهمی در تأخیر پیری دارد (Van Meeteren et al., 2015). در واقع تأثیر مثبت بنزیل آدنین با بهبود مواد جامد محلول و محتوای آبی ساقه (دانایی و عبدوسی، ۲۰۱۵) با افزایش کارایی دیواره سلولی و جلوگیری از روند از دست دادن آب توانست میزان نشت یونی را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. نتایج جدول برهمکنش بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین نشان داد که کاهش ۱۸ درصدی با مصرف دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین صورت گرفت و این میزان در تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین همراه با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین به ۲۶ درصد رسید که نشان دهنده اثر قابل توجه بنزیل آدنین در جلوگیری از تخریب پروتئین دیواره سلولی بود. صائمی و همکاران (۲۰۱۷) اظهار داشتند کاهش نشت یونی می‌تواند به پتانسیل و ظرفیت بنزیل آدنین در ارتباط با کنترل رادیکال‌های آزاد و کاهش تخریب اکسیداسیونی غشای سلولی مرتبط باشد.

جدول ۵: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر درصد نشت یونی، میزان پتاسیم و عمر گلجایی گل رز

| منبع تغییر | درجه آزادی | محتوای پتاسیم |          |           |                       | عمر گلجایی |               |
|------------|------------|---------------|----------|-----------|-----------------------|------------|---------------|
|            |            | روز ۲         | روز ۴    | روز ۶     | روز ۸                 | عمر گلجایی | محتوای پتاسیم |
| BA         | ۲          | ۳۸۵۶/۳*       | ۶۵۲۸۳/۳* | ۴۹۰۰۲/۶*  | ۹۲۸۵۱/۵*              | ۶/۸۹*      | ۳۱۲۶۸/۴۷**    |
| 1-MCP      | ۲          | ۱۳۰۰۴/۶*      | ۶۹۸۰۱/۳* | ۴۲۸۰۱/۳*  | ۲۲۸۰۶/۳ <sup>ns</sup> | ۸/۵۲*      | ۵۰۰۱۲/۸۱**    |
| 1-MCP× BA  | ۴          | ۱۴۸۹۲/۴*      | ۷۱۰۲۵/۶* | ۲۲۲۴۵/۷** | ۷۴۴۰۲/۳*              | ۱۱۳/۴۲**   | ۲۳۳۴۵/۲۴**    |
| Error      | ۲۷         | ۲۵۰۱/۹        | ۹۹۸۴/۷   | ۵۹۴۱/۶    | ۱۵۰۴۹/۲               | ۱/۲۵       | ۲۲۹/۴۲        |
| CV (%)     | -          | ۵/۵۳          | ۵/۶۹     | ۶/۱۸      | ۶/۸۴                  | ۷/۶        | ۸/۹           |

ns و \*\* به ترتیب به معنی عدم معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۶: مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر دی تیروزین و اتیلن

| تیمار ها                        | روز ۲                | روز ۴               | روز ۶               | روز ۸               | میزان پتاسیم<br>(درصد) | عمر گلجایی<br>(روز) |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| Control                         | ۴۸/۲۱ <sup>a</sup>   | ۶۷/۳۶ <sup>a</sup>  | ۶۹/۷۲ <sup>a</sup>  | ۸۰/۶۳ <sup>a</sup>  | ۱/۰۶ <sup>d</sup>      | ۸/۰۴ <sup>f</sup>   |
| ۱- MCP 1 $\mu\text{L}$          | ۳۷/۹۳ <sup>bc</sup>  | ۶۱/۳۷ <sup>b</sup>  | ۶۴/۴۳ <sup>b</sup>  | ۷۱/۴۴ <sup>b</sup>  | ۱/۱۷ <sup>cd</sup>     | ۸/۸۲ <sup>e</sup>   |
| ۲- MCP 1 $\mu\text{L}$          | ۳۳/۷۸ <sup>c</sup>   | ۵۸/۰۷ <sup>bc</sup> | ۵۹/۴۹ <sup>bc</sup> | ۶۵/۹۱ <sup>bc</sup> | ۱/۲۲ <sup>c</sup>      | ۹/۶۷ <sup>de</sup>  |
| 75ppm BA                        | ۴۰/۹۴ <sup>b</sup>   | ۶۰/۴۱ <sup>b</sup>  | ۶۱/۲۶ <sup>bc</sup> | ۶۸/۳۲ <sup>ab</sup> | ۱/۱۸ <sup>cd</sup>     | ۹/۷۳ <sup>d</sup>   |
| 1 $\mu\text{L}$ 1-MCP×75ppm BA  | ۳۵/۲۷ <sup>bc</sup>  | ۵۷/۷۲ <sup>bc</sup> | ۵۸/۳۲ <sup>c</sup>  | ۶۴/۲۸ <sup>bc</sup> | ۱/۲۷ <sup>c</sup>      | ۱۰/۱۷ <sup>cd</sup> |
| 2 $\mu\text{L}$ 1-MCP×75ppm BA  | ۳۰/۳۱ <sup>cd</sup>  | ۵۴/۱۸ <sup>c</sup>  | ۵۶/۲۱ <sup>cd</sup> | ۶۱/۹۳ <sup>c</sup>  | ۱/۳۴ <sup>bc</sup>     | ۱۰/۳۶ <sup>c</sup>  |
| 150 ppm BA                      | ۳۱/۶۸ <sup>cd</sup>  | ۵۷/۲۹ <sup>bc</sup> | ۵۸/۲۹ <sup>c</sup>  | ۶۳/۱۱ <sup>b</sup>  | ۱/۲۱ <sup>c</sup>      | ۱۱/۰۸ <sup>bc</sup> |
| 1 $\mu\text{L}$ 1-MCP×150ppm BA | ۲۸/۶۲ <sup>cde</sup> | ۵۳/۴۳ <sup>c</sup>  | ۵۵/۴۷ <sup>cd</sup> | ۶۰/۳۲ <sup>bc</sup> | ۱/۴۲ <sup>b</sup>      | ۱۱/۵۳ <sup>b</sup>  |
| 2 $\mu\text{L}$ 1-MCP×150ppm BA | ۲۵/۴۳ <sup>e</sup>   | ۵۰/۲۹ <sup>c</sup>  | ۵۳/۹۸ <sup>d</sup>  | ۵۹/۴۶ <sup>c</sup>  | ۱/۶۹ <sup>a</sup>      | ۱۲/۸۱ <sup>a</sup>  |

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) نمی‌باشند

## محتوای پتاسیم گل شاخه بریده

بر اساس نتایج تجزیه‌ی واریانس اثرات تیمارهای بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین صفت درصد پتاسیم گل شاخه بریده رز تأثیر معنی‌داری داشت و اختلافات به‌وجود آمده از نظر آماری در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج برهمکنش تیمارها بر میزان پتاسیم گل شاخه بریده نشان داد، بیش‌ترین و کمترین میزان پتاسیم به‌ترتیب از تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین با میانگین ۱/۶۹ درصد و تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) با متوسط ۱/۰۶ درصد حاصل شد (جدول ۶). برهمکنش تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین همراه با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، موجب افزایش ۳۷ درصدی پتاسیم نسبت به تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) شد. نتایج حاکی از تفاوت ۲۸ درصدی بین تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین و تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بنزیل آدنین توام با عدم مصرف ۱- متیل سیکلوپروپین است و عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین نسبت به تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، کاهش ۱۳/۱ درصدی داشت، که اهمیت ۱- متیل سیکلوپروپین در افزایش پتاسیم را نشان می‌دهد (جدول ۶). این امر موجب افزایش پایداری غشای سلولی، فعال نگاه داشتن شدن پمپ پتاسیم و جلوگیری از تخریب دیواره سلولی و ممانعت از آغاز روند پیری می‌شود (Nasri & Khalatbari, 2016). محققان با کاربرد همزمان بنزیل آدنین و نیتروژن بر گیاه تنباکو، نتیجه گرفتند جذب پتاسیم و سرعت انتقال مواد غذایی در آوند چوبی افزایش پیدا کرد (Zhou et al., 2009) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

## عمر گلجایی

نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین و اثرات متقابل آنها بر صفت عمر گلجایی از نظر آماری در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۵). نتایج اثر متقابل کاربرد بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر عمر گلجایی نشان داد بیشترین و کمترین میزان عمر گلجایی به ترتیب از تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، با میانگین ۱۲/۸۱ روز و تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) با متوسط ۸/۰۴ روز حاصل است (جدول ۶). نتایج این تحقیق نشان داد اثرات بنزیل آدنین تاثیر بیشتری نسبت به کاربرد ۱- متیل سیکلو پروپین بر عمر گلجایی داشت. تیمار کاربرد ۱۵۰ و ۷۵ پی پی ام بنزیل آدنین در شرایط عدم مصرف ۱- متیل سیکلوپروپین دارای عمر گلجایی بیشتری نسبت به عدم مصرف بنزیل آدنین (صفر) و مصرف دو و یک میکرولیتر در لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین بود؛ به نظر می رسد کاربرد بنزیل آدنین سبب کاهش اتیلن و افزایش عمر گلجایی شد. بهترین نتیجه از مصرف توام بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین با بالاترین غلظت به دست آمد، به نظر می رسد که هر دو این مواد ضد پیری با روش بازدارندگی رقابتی، کار اتیلن را مختل می کنند و باعث افزایش گلجایی می شوند. علت ماندگاری گل های شاخه بریده، می تواند به علت افزایش سطح کربوهیدرات باشد (Argueso *et al.*, 2009). تیمار گل های زنبق با مواد بازدارنده سنتز پروتئین مانند سیکلو هگزامید باعث جلوگیری از وقوع پیری گردید (Sultan & Farooq, 2004). ۱- متیل سیکلوپروپین، برگ های گیاهان (گل های بریدنی) را در وضعیت خوبی نگه داشت و با افت درصد کاهش وزن آنها و پیشگیری از آسیب به کلروفیل و کربوهیدرات ها (Lay-Yee *et al.*, 2003)، مانع کاهش وزن خشک آنها (Sereket *et al.*, 2014) و افزایش عمر گل جایی شد. مشخص گردید ۱ - متیل سیکلوپروپین به روش بازدارندگی رقابتی از فعالیت اتیلن جلوگیری می کند؛ به بیانی دیگر، به طور غیر قابل برگشت به گیرنده های اتیلنی می چسبد و از این راه می تواند عمر انباری بسیاری از گل های بریدنی و گل های گلدانی را افزایش دهد (Sisler *et al.*, 2009) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در گل رز کاهش جذب آب با کاهش عمر گلجایی آن مرتبط است (Paul & Goo, 2005) گل های تیمار شده با ۱- متیل سیکلو پروپین، جذب آب بیشتری نسبت به شاهد داشت که در این تحقیق مشهود است.

## نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد کمترین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد) به دست آمد که البته روند آن از روز دوم تا روز هشتم کاهشی بود و تیمار ۱۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین توام با دو میکرولیتر بر لیتر ۱- متیل سیکلوپروپین، بیشترین میزان را به خود تخصیص داد و روند افزایشی از روز دوم نسبت به روز هشتم داشت که نشانگر اثرات مثبت بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین بر جلوگیری از پیری گل رز بود. بررسی میزان بیومارکر تخریب مالون دی آلدئید و دی تیروزین نشان داد بیشترین مقدار از تیمار عدم مصرف بنزیل آدنین و ۱- متیل سیکلوپروپین (شاهد)

به‌دست آمد و با گذشت تعداد روز شاخه گل بریده، افزایش داشت ولی با مصرف بنزیل‌آدنین و ۱-متیل‌سیکلوپروپن از میزان بیومارکرهای تخریب کاسته شد که علت آن را می‌توان نقش آنها در جلوگیری از پیری دانست؛ نتایج نشان داد نشت یونی، با کاربرد بنزیل‌آدنین و ۱-متیل‌سیکلوپروپن کاهش یافت. نتایج کلی این تحقیق بیانگر بهبود ماندگاری گل شاخه بریده رز با استفاده از کاربرد توام یک یا دو میکرو لیتر در لیتر ۱-متیل‌سیکلوپروپن و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر بنزیل‌آدنین می‌باشد که توانست عمر گلجایی گل رز را به میزان ۴/۷۷ روز نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد.

## منابع

- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath L.S. (2006). Role of SOD in cot rolling Oxidative stress in Plant. *Journal of experimental Botany*, 186, 162- 166.
- Amling, J.W., Keever, G. J., Kessler, J. R. J. and Eakes, D. J. (2015). Benzyl adenine (BA) promotes remit formation in *Hemerocallis itrina*. *Journal of Environmental Horticulture*, 25(1), 9-12.
- Argueso C.T., Ferreira F. J., and Kieber J. J. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environmental*, 32, 1147-1160.
- Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Guamet, J., Montaldi, E. and Puntarulo, S. (2015). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* petals. *Plant Science*, 214, 101 - 108.
- Batu, A. (2004). Determination of acceptable firmness and color values of tomatoes. *Journal of food Engineering*, 61(3), 471-475.
- Bieleski, R.L. and Reid, M.S. (2012). Physiological changes accompanying senescence in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology*, 176, 1042-1049.
- Cameron, A.C. and Reid, M.S. (2001). 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 169-177.
- Carey, D.J. Whipker, B.E., Mc Call, I. and Buhler, W. (2008). Benzyladenine foliar sprays increase offsets in *Sempervivum* and *Echeveria*. *Journal of Horticultural Science*, 53, 19-21.
- Chang, H., Jones, M.L., Banowetz, G.M. and Clark, D. G. (2005). Over production of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*, 132, 2174-218.
- Cheng, Y., Dong, Y., Ge, W., Shen, Ch., Yan, H., Gune, J. and Liu, L. Y. (2012). Effects Of 1-MCP On chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of chinese pear fruits in storage. *Food Chemistry*, 135(2), 415-422.
- Chutichudet, P., Chutichudet, B. and Boontiang, K. (2010). Effect of 1-MCP fumigation on vase life and other postharvest qualities of siam tulip (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) cv. laddawan. *International Journal of Agricultural Research*, 5(1), 1-10.
- Cook, D., Rasche, M. and Eisinger, W. (2005). Regulation of ethylene biosynthesis and action in cut carnation flower senescence by cytokine's. *Journal American Society Horticulture Science*, 14(2), 109-114.
- Danayi, A., Mostofi, Y., Moradi, P. and AziziNezhad, R. (2012). Effect of benzyl adenine, ethanol and sucrose on vase life and quality characteristics of gerbera (Good timing) cut flower. *Iranian Journal of Plant and Ecosystem*, 25: 59-67. (InFarsi).

- Danayi, A. and Abdousi, V. (2015). Effect of benzyl adenine and silver nano particles in post-harvest phase on enzyme activity and durability of gerbera life of Dun cultivar. 9th Iranian Horticultural Science Congress. (inFarsi).
- Davies, K. J. A. (2007). Protein damage and degradation by oxygen radicals. *Journal of Biological chemistry*, 262, 9895-9901.
- Debasis, C., Chatterjee, J. and Datta, S.K. (2007). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in chrysanthemum florets. *Plant Growth Regulation*, 53: 107 - 115.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhinds, D. and Thorpe, T. A. (2011). Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid per oxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2745-2749.
- Ezhilmathi, K. (2008). Physiological and biochemical studies of senescence in Rosa Spp. Indian Agricultural Research Institiue, New Delhi-L. 100BL-India.
- Huang, K. L., Liao L. J., Shen R. S., Chen W.S. and Lin, Y. H. (2014). The -synergetic effect of Maleic Hydrazide (1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione) and Sucrose on vase life of cut roses. *Australian Journal of Experimental Agriculture*.42, 637-641.
- Hutchinson, M. J., Chebet, D. K. and Emongor, V.E. (2010). Effect of accel, sucrose and silver thiosulphate on substrate utilization in cut tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) flowers. *Jomokeniatta University of Agriculture and Technology*, 12(2), 20-34.
- Iqbal, D., Habib, U., Abbasi, N.A. and Chaudhry, A.N. (2012). Improvement in postharvest attributes of Zinnia (*Zinnia elegans* cv. Benarys Giant) cut flowers by the application of various growth regulators. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 1091-1094.
- Janowska, B. and Jerzy, M. (2008). Effect of Gibberllic acid on the postharvest Flower Longevity of *Zantedeschia elliottiana* (W.Wats) Engl. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorumcultus*, 28, 345-348.
- Jiang, W., Sheng, Q., Zhou, X., Yhang, M. and Liu, X. (2012). Regulation of detached coriander leaf senescence by 1-methylcyclopropene and ethylene. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 339-345.
- Karimi, M. (2014). Effect of low temperature and ethylene inhibitory treatments on the activity of antioxidant and ethylene enzymes produced in miniature cloves (*Dianthus caryophyllus*L.). *Journal of Process and Plant Function*, 3 (10), 59-68. (In Farsi).
- Larrigaudiere, C., Vilaplana, R., Soria, Y. and Recasens, I. (2004). Oxidative behavior of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1871-1877.
- Lay-Yee, M., Stead, A. D. and Reid M.S. (2012). Flower senescence in daylily *Hemerocallis*. *Physiological Plant*, 236, 135-139.
- Li, K. T., Lakso, A. N., Piccioni, R. and Robinson, T. (2003). Summer pruning reduces whole canopy carbon fixation and transpiration in apple trees. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 749-754.
- Liao, L. J., Huang, K. L. Chen, W. S. and Cheng, Y. M. (2009). Postharvest life of cut rose flowers as affected by silver thiosulfate and sucrose. *Botanical Bulletin- AcademiaSinica Taipei*, 41, 299-303.
- Macnish, A. J., Simons, D. H., Joyce, D. C., Faragher, J. D. and Hofman, P. J. (2000). Response of native Australian cut flowers to treatment to 1-metylcylopropene and ethylene. *Horticulture Science*, 35, 254-255.

- MacLean, D.D., Murr, D.P. and De Ell, J. R. (2003). A modified total ox radical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 183–194.
- Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of biology chemistry*. 247:6960-6962
- Mutu, T.M. (2011). Effect of Accel on the vase life and postharvest quality of *Rosa* spp cut flowers. *American Journal Science Technology*, 36, 96-99.
- Nasri, M. and Khalatbari, M. (2016). Evaluation of effect of different ranges of *Thiobacillus* bacteria on bio chemical characteristics of grain corn (*Zea mays* L. var. *Maxima*) under water deficit stress in Varamin Region. *Quarterly Journal of Plant Growth Physiology*, Islamic Azad University, Ahwaz Branch, 8, (29), 89-103. Spring 2016. (In Farsi).
- Nikbakht, A., Kafi, M., Babalar, M., Xia, Y.P., Luo, A. and Etemadi, N.A. (2008). Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake and postharvest life of gerbera. *Journal of Plant Nutrition*, 31, 2155-2167.
- Patil, H.G., Ravindran, C., Jayachandran, K.S. and Jaganath, S. (2016). Influence of Ba and GA3 on the postharvest quality off greenhouse roses (*Rosa* hybrid L.) cultivars Poison. *Acta Horticulturae*, 789: 215-219.
- Paull, R.E. and Goo, T. (2005). Ethylene and water stress in the senescence of cut rose flowers. *Journal American Society, Horticulture Science*, 110, 84-88.
- Perveen, S., Vershney, A., Anis, M. and Aref, I.M. (2011). Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbeck*. *Journal Forest Research*, 22, 47- 52.
- Poovalah, B.W. (1979). Increased levels of calcium in nutrient solution improves the postharvest life of potted roses. *Journal American Society Horticulture Science*, 104, 164-166.
- Rabiza-Swider, J., Lukaszewska, A., Shutnik, E. and Leszko, M. (2004). Ammonium and proline accumulation in senescing cut leaves of *Zantedeschia*. *Physiol Plantarum*, 26, 417-422.
- Ranwala, A. P. and Miller W. B. (2013). Preventive mechanisms of gibberellin4+7 and light on low-temperature-induced leaf senescence in *Lilium* cv. *Stargazer*. *Postharvest Biological and Technology*, 19, 85-92.
- Saemi, N., Nazarideljou, M. J. and KhezriNejad, N. (2017). Effect of essential oil of Ajowan on antioxidant capacity, flower longevity and resistance to gray mold of rose cut flower (*Rosa* × *hybrida* cv. *Angelina*). *Crops Improvement (Journal of Agricultural Crops Production)*. Vol. 19, No. 4, Winter 2017. (inFarsi).
- Saffari, V. R., Khalighi, A., Lesani, H., Babalar, M. and Obermaier, J. F. (2004). Effects of different plant growth regulators and time of pruning on yield components of *Rosa damascene* Mill. *International Journal Agriculture and Biology*, 6(6), 1040-1042.
- Sahi, B. G. (2009). Effect of cycocel spray and BA on the growth and flowering of *Rosa* hyblida L. Cool water. *Journal. Duhok University*, 12, 39-43.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H. and Zoller, H. (2014). Aldehydes in biological systems: Their natural occurrence and biological activities. Pion Press. London.U.K..
- Serek, M., Sisler, E. C. & Reid M. S. (2014). 1-methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor of ethylene action, improves the life of fruits, cut flowers and potted plants. *Acta Horticulturae*, 596, 887-892.
- Shakri, F., Ebrahimzadeh, A. and Ismail, B. (2005). *Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture*. University Press, Zanjan.

- Sisler, E. C., Serek, M. and Dupille, E. (2009). Comparison of cyclopropene, 1- methylcyclopropene, and 3, 3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. *Plant Growth Regulation*. 18, 164-174.
- Song, J., Fan, L., Hughes, T., Palmer Campbell, L., Li, L. and Li, X. H. (2014). Quantitative proteomic investigation on the effect of 1-methylcyclopropene treatments on postharvest quality of selected cut flowers. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC 2014), 1104, 311- 318.
- Steven, A. K. and Joseph, M.H. (1978). Lipid peroxides in sample as measured by liquid chromatography separation. *Elin. Chemestri*, 32, 217-220.
- Sultan, S.M. and Farooq, S. (2004). Effect of cycloheximide on some physiological changes associated with senescence of detached flowers of *Iris germanica* L. *Acta Physiology plantarum*, 45, 325-329.
- Taverner, E., Letham, D. S., Wang, J., Cornish, E. and Willcocks, D. (1999). Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia corolla* senescence. *Phytochemistry*, 51, 341-347.
- Van Meeteren, U., Van Gelder, H. and Van Ieperen, W. (2015). Reconsideration of the use of deionized water as vase water in postharvest experiments on cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 139 - 141.
- Wang, Y.T. (2009). Cytokinin and light intensity regulate flowering of *Easterlily*, *HortScience*. 98, 432- 436.
- Zhou, Z.Q., Bao, W. K. and Wu, N. 2009. Dormancy and germination in *Rosa*. *Scientia Horticulturae*, 119, 434-441.

## Effects of plant growth regulators on vase life, some physiological and biochemical characteristics of rose cut flower (*Rosa hybrida* L. cv. Royal Bacara)

M. Farazmandi<sup>1</sup>, A. Mirzakhani<sup>2\*</sup>, N.A. Sajedi<sup>3</sup>, M. Nasri<sup>4</sup>, M. Gomariyan<sup>5</sup>.

Received: 2019.11.10

Accepted: 2020.10.11

### Abstract

In order to investigate the application effects of different levels of Benzyl adenine (BA) and 1-Methylcyclopropene (1-Mcp) on some bio-chemical characteristics and vase life of Rose (*Rosa hybrid* L. cv. Royal Bacara), an experiment was carried out as factorial based on completely randomized design with three replications in Pakdasht city of Tehran province during 2017. Experimental factors included BA in three levels of 0, 75, and 150 ppm, and 1-Mcp in three concentrations of 0, 1, and 2 ( $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). The results showed that the interaction of BA and 1-Mcp was significant on the biochemical characteristics and the vase life of Roses. The highest antioxidant rate SOD, K and vase life in the treatment of 150 ppm BA along with 2  $\mu\text{L.L}^{-1}$  1-Mcp was achieved. This treatment was allocated the lowest rate MDA, DT and Ec. This results indicated that BA and 1-Mcp have effect on durability of Rose. In general, the results showed that application of 1 or 2  $\mu\text{L.L}^{-1}$  1-Mcp along with 150 ppm AB was improves some physiological and biochemical characteristics and vase life of Rose cut flower.

**Keywords:** Benzyl adenine, Malondialdehyde, 1- Methylcyclopropane, Rose, Superoxide dismutase, vase life

---

1- Ph.D Student of Horticultural Science, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

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

\*(corresponding author; mirz51@yahoo.com)

3- Associate Prof. Department of Agronomy and plant Breeding, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

4- Associate Professor, Department of Agronomy and plant Breeding, Arak Branch, Islamic Azad University (Varamin Branch) Varamin, Tehran, Iran.

5- Assistant prof. Department of Agronomy and plant Breeding, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

## تأثیر پیش تیمار کربنات کلسیم در دماهای مختلف بر کاهش سمیت سولفات مس در ماهی کپور

معمولی (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758)

اکرم قاسم زاده<sup>۱</sup>، معصومه بحر کاظمی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

### چکیده

استفاده از سولفات مس به عنوان جلبک کش در مزارع پرورش ماهیان می تواند موجب مسمومیت در ماهیان شود و بر رشد و سلامتی آن ها تأثیر منفی داشته باشد. به دلیل تأثیر مقدار کلسیم آب بر سمیت سولفات مس، در این تحقیق تأثیر پیش تیمار هفت روزه کربنات کلسیم بر کاهش سمیت مس در کپور معمولی (Cyprinus carpio) در دو دمای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا نیمی از کپور ماهیان به مدت یک هفته در آبی که ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم به آن افزوده شد پرورش یافتند. سپس تمام ماهی ها به مدت ۶۰ روز در معرض غلظت های صفر، ۱/۵ و ۳ میلی گرم در لیتر سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه ی سانتی گراد پرورش یافتند. بر اساس نتایج با افزایش میزان مس و درجه حرارت وزن گیری و شاخص وضعیت کاهش معنی دار و درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی دار یافت ( $P < 0.05$ ). در هر دو گروه از ماهیان با افزایش غلظت سولفات مس و درجه حرارت، تعداد گلبول های قرمز و سفید و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت کاهش و مقادیر MCH و MCV افزایش یافت. اما در مورد MCHC روند مشخصی مشاهده نشد. همچنین اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس تنها در مورد تلفات و گلبول های سفید معنی دار نشد ( $P > 0.05$ ). بنابراین افزایش سولفات مس به ویژه در دمای ۲۷ درجه ی سانتی گراد می تواند بر بازده رشد و تغذیه و بازماندگی ماهیان تأثیرگذار باشد و پیش تیمار با کربنات کلسیم می تواند در رقابت با مس تا حد قابل توجهی اثر منفی سولفات مس را تعدیل نماید. تأثیر سه متغیر پیش تیمار با کربنات کلسیم، سولفات مس و دما بر شاخص های رشد و تغذیه بسیار مشهودتر از پارامترهای خونی بود. افزایش میزان سولفات مس باعث بروز کم خونی و کاهش ایمنی ماهیان گشت و پیش تیمار با کربنات کلسیم به ویژه در غلظت ۱/۵ میلی گرم/لیتر سولفات مس در دمای ۲۷ درجه ی سانتی گراد موثر بود. لذا پیش تیمار ۷ روزه ماهیان با ۲۰۰ میلی گرم/لیتر کربنات کلسیم به ویژه تا غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس حتی در شرایط افزایش دما توصیه می شود.

واژه های کلیدی: خون شناسی، سولفات مس، کپور معمولی، کربنات کلسیم

۱- کارشناسی ارشد، گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران.

۲- استادیار، گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

\* (نویسنده مسئول: m.bahrekazemi@qaemiau.ac.ir)

## مقدمه

برخی از ترکیبات مانند سولفات مس که در صنایع پرورش ماهی تحت عنوان جلبک کش و قارچ کش مورد استفاده قرار می گیرند دارای مقادیری از فلزات سنگین هستند (Takasusuki et al., 2004). بر اساس گزارش موجود استفاده از سولفات مس برای کنترل جمعیت فیتوپلانکتون ها، به ندرت باعث ایجاد مسمومیت برای ماهیان می شود اما باعث کشته شدن تعداد زیادی از بی مهرگان مانند روتیفرها، کلاوسرها و کپه پودا می شود که به عنوان غذای آبزیان مطرح هستند (Boyd, 1990)؛ البته غلظت مس بیش از مقدار مشخص می تواند برای ماهیان پرورشی مانند آزاد ماهیان، کپورماهیان و گربه ماهیان سمی باشد (Perschbacher & Wurts, 1999). اثر مس نسبت به جیوه، سرب و سایر فلزات سنگین بر روی آبشش ها خیلی بیش تر است (تا ۳ برابر) (Pagenkopf, 1983). این ماده فضاهای بین رشته های آبششی را پر می کند و در نتیجه آب دمی نمی تواند به سلول های آبششی برسد، همچنین تحرک رشته های آبششی کاهش و کار مؤثر قلب به نصف تقلیل می یابد یا متوقف می شود (Abdel-Tawwab et al., 2007). پژوهش ها نشان داده اند که استفاده ی مناسب از سولفات مس بدون ایجاد حالت سمیت برای آبزیان به سختی و قلیائیت آب وابسته است (Takasusuki et al., 2004). غلظت بالای کلسیم آب که یکی از اجزای سختی آب است می تواند سمیت مس را کاهش دهد، کلسیم این کار را از طریق بهبود مکانیسم تبادل یونی در آبشش ها در برابر اثرات مخرب مس انجام می دهد (Abdel-Tawwab & Mousa, 2005). همچنین سختی ناشی از کلسیم در مقایسه با منیزیم در کاهش مسمومیت مس در گربه ماهی روگامی (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818) کارایی بیشتری داشته است (Perschbacher & Wurts, 1999). در مطالعه ی ۱۰۰ روزه در قزل آلا ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss walbaum*, 1792) ثابت شد که منیزیم نقش چندانی در کاهش سمیت فلز کادمیوم ندارد (Davies et al., 1993).

پیش تیمار با اکسید کلسیم موجب کاهش سمیت مس در تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) گشت (Abdel-Tawwab et al., 2007)؛ فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳). در گونه ی *Synechogobius hasta* (Temminck & Schlegel, 1845) پیش تیمار با کلسیم توانست سمیت کادمیوم را کاهش دهد (Song et al., 2013). پیش تیمار با کلسیم توانایی کاهش سمیت مس در گونه ی *Pelteobagrus fulvidraco* را نیز دارد (Chen et al., 2012). بر اساس مطالعه ی دیگری کلسیم توانست میزان آسیب های بافتی را در تیلاپای نیل که در تماس با سرب قرار گرفت کاهش دهد (Singhadach et al., 2009). همچنین در گله ماهی *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766) سمیت کادمیوم در آب با میزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کلسیم کاهش یافت و تماس اولیه با کلسیم توانست میزان بازماندگی ماهیان را در آب آلوده به کادمیوم افزایش دهد (Gill & Eppl, 1992). بر اساس گزارش موجود افزودن کربنات

کلسیم به آب به منظور تامین آهک باعث برگشت پذیری تغییرات ایجاد شده در خون گونه‌ی *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) در تماس با آرسنیک گشت (Abdel-Hameid, 2009).

مطالعات نشان می‌دهد که غلظتی از آلاینده‌ها و فلزات سنگین که در درجه حرارت پایین و متوسط غیر فعال است، می‌تواند با افزایش دمای آب برای ماهیان کشنده باشد (Mehta, 2017). در گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) با افزایش درجه حرارت آب در فصل بهار سمیت مس افزایش می‌یابد (Boyd, 1990). در گونه‌ی *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)، ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دما سبب افزایش میزان سمیت مس شد (Carvalho et al., 2004). در دامنه‌ی حرارتی ۱۰ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با افزایش درجه حرارت آب، میزان سمیت فلزات سنگین در بی‌مهرگان آبزی افزایش یافت (Bat et al., 2000). همچنین سمیت کادمیوم، مس، و روی در خرچنگ دراز آب شیرین (*Orconectes immunis* Hagen, 1870) با افزایش دما از ۲۰ به ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد حدود ۷ درصد افزایش یافت (Khan et al., 2006).

بنابراین با توجه به استفاده فراوان از سولفات مس به عنوان جلبک‌کش قوی در مزارع پرورش ماهیان و تأثیر میزان کلسیم و همچنین درجه حرارت آب در بروز سمیت آن، در تحقیق حاضر تأثیر پیش تیمار هفت روزه با کربنات کلسیم در کاهش سمیت سولفات مس در غلظت‌های مختلف در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

این پژوهش به مدت ۶۷ روز در مرکز تحقیقات ماهیان زینتی جهاد دانشگاهی واحد مازندران در منطقه چیکرود جویبار انجام شد. ۱۰۰۰ قطعه کپور معمولی با میانگین وزن  $6 \pm 0.5$  گرم از مرکز پرورش بچه ماهیان گرم آبی شهرستان ساری تهیه و به محل آزمایش منتقل گردیدند. پس از سازگاری اولیه بچه ماهیان با شرایط کارگاه به مدت یک هفته، نیمی از ماهیان (۵۰۰ قطعه) به مدت هفت روز در یک استخر گرد بتنی (قطر ۴ متر و عمق ۱/۵ متر با عمق آبیگری ۱ متر) که ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم (مرک-آلمان) به آن اضافه شده بود و نیمی دیگر از بچه ماهیان (۵۰۰ قطعه) در استخر دیگری بدون افزودن کربنات کلسیم نگهداری شدند. سپس از هر دو گروه بچه ماهیان تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی پس از زیست‌سنجی به طور کاملاً تصادفی در ۳۶ آکواریوم با ابعاد ۱/۵×۰/۸×۰/۵ متر و حجم آبیگری ۱۴۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند و به مدت ۶۰ روز در آب حاوی غلظت‌های مزمن سولفات مس با مقادیر ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و یک گروه شاهد در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد پرورش یافتند. این آزمایش شامل ۱۲ تیمار و هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ بچه ماهی بود (جدول ۱).

جدول ۱: تیمارهای آزمایش شامل بچه ماهیان با دریافت (+) و عدم دریافت (-) پیش تیمار کربنات کلسیم در معرض سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی گراد در کپور معمولی

| ۲۷  |     |     |    |     |    | ۲۲ |     |    |    |     |    | درجه حرارت (درجه‌ی سانتی گراد)    |
|-----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|-----------------------------------|
| T12 | T11 | T10 | T9 | T8  | T7 | T6 | T5  | T4 | T3 | T2  | T1 | نام تیمار                         |
| +   | +   | +   | -  | -   | -  | +  | +   | +  | -  | -   | -  | پیش تیمار/ عدم پیش تیمار با کلسیم |
| ۳   | ۱/۵ | ۰   | ۳  | ۱/۵ | ۰  | ۳  | ۱/۵ | ۰  | ۳  | ۱/۵ | ۰  | غلظت سولفات مس (میلی گرم / لیتر)  |

مبنای انتخاب پیش تیمار هفت روزه با کربنات کلسیم نتایجی بود که توسط مولف به دست آمد و در آن تأثیر مثبت پیش تیمار ۴ روزه با اکسید کلسیم در کاهش سمیت سولفات مس در کپور معمولی به اثبات رسید (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳). با توجه به تأثیر کمتر کربنات کلسیم از اکسید کلسیم، در تحقیق حاضر از پیش تیمار هفت روزه کربنات کلسیم استفاده شد. غلظت‌های استفاده شده در این تحقیق و دوره ۶۰ روزه آزمایش نیز بر اساس تحقیق‌های انجام شده توسط Gill و Epple (۱۹۹۲) در گله ماهی، Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۷) در تیلاپپای نیل و فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) در کپور معمولی انتخاب شدند.

آب مورد استفاده در این تحقیق، آب چاه بود که پس از هوادهی وارد مجموعه پرورش بچه ماهیان می‌شد و شرایط فیزیکی - شیمیایی آن در جدول ۲ آمده است. در طول تحقیق آب تمام اکواریوم‌ها روزانه به میزان یک سوم از کف سیفون می‌شد و همان میزان آب تمیز که حاوی غلظت‌های عنوان شده از سولفات مس بود به آن‌ها اضافه می‌شد. برای غذادهی بچه ماهیان نیز از غذای بیومار (فرانسه) که شامل ۴۲/۳۲ درصد پروتئین، ۱۲/۵ درصد چربی، ۸ درصد خاکستر و ۳ درصد فیبر بود استفاده شد. در طول دوره‌ی آزمایش، غذادهی به بچه ماهیان بر اساس بیوماس ماهیان (۴ درصد) در سه نوبت انجام شد (NRC, 1993).

جدول ۲: پارامترهای فیزیکی- شیمیایی آب چاه ذخیره سازی شده در اکواریوم‌های پرورش بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار کربنات کلسیم در غلظت‌های مختلف سولفات مس به مدت ۶۰ روز

| پارامتر | pH      | اکسیژن<br>(mg/L) | سختی کل<br>(mg/L) | قلیائیت<br>(mg/L) | کلسیم<br>(mg/L) | منیزیم<br>(mg/L) | مس<br>(mg/L) |
|---------|---------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------|
| مقدار   | ۷/۵±۰/۳ | ۱۰/۱±۰/۱۹        | ۱۵۹/۰۰±۰/۱۸       | ۱۴۰/۰۲±۰/۶۱       | ۱۴۴             | ۱۱۵/۲            | ۰/۱۲         |

پس از پایان دوره ۶۰ روزه آزمایش، به منظور سنجش فاکتورهای خونی، از هر تکرار ۴ قطعه ماهی به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۱ گرم در لیتر)، از ساقه دمی خون‌گیری شدند (Nikbaksh & Bahrekazemi, 2017). نمونه‌های خون به لوله‌های هپارینه منتقل و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند (Mckenzie & Williams, 2014). شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با ۲۰۰ بار رقیق سازی خون با محلول نات و هریک و به روش

هموسیتومتر ثنویار انجام شد. درصد همتوکریت با پر کردن لوله های میکروهماتوکریت به میزان دو سوم لوله از خون و سانتریفوژ کردن لوله به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور با روش میکروهماتوکریت (Rehulka, 2003) و میزان هموگلوبین با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر به روش سیان مت هموگلوبین، تعیین شد (Blaxhall & Daisley, 1973). برای ارزیابی شاخص های حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)، و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) نیز از فرمول های زیر استفاده شد (جمال زاده و همکاران، ۱۳۸۱):

حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) (فمتولیتتر): (درصد همتوکریت / تعداد گلبول های قرمز)  $\times 10$

میزان متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) (پیکوگرم): (میزان هموگلوبین / تعداد گلبول های قرمز)  $\times 10$

غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) (درصد): (میزان هموگلوبین / درصد همتوکریت)  $\times 100$

همچنین برای ارزیابی شاخص های رشد و تغذیه از فرمول های زیر استفاده شد (Abdel-Tawwab *et al.*, 2007):

افزایش وزن بدن (گرم): وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

شاخص وضعیت (درصد): وزن ماهی (گرم) / طول کل ماهی (سانتی متر)  $\times 100$

میزان تلفات (درصد): تعداد ماهیان تلف شده / تعداد کل ماهیان  $\times 100$

ضریب تبدیل غذایی: غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن ماهی (گرم)

برای انجام این تحقیق از طرح فاکتور - یل استفاده شد. در ابتدا نرمال بودن داده ها توسط آزمون کلموگروف- اسمیرنوف بررسی گردید. تجزیه و تحلیل داده ها از طریق آنالیز واریانس سه طرفه (Three way- ANOVA) و مقایسه ی میانگین بین تیمارها (به دلیل معنی دار شدن تفاوت ها در هر سه سطح) براساس آزمون چند دامنه بونفرونی انجام شد. در ادامه در مورد پارامترهایی که در هر سه سطح اختلاف معنی دار داشتند برای شفاف تر شدن اختلاف بین تیمارها، مقایسه دما و غلظت های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت های سولفات مس به تفکیک دما از طریق آنالیز واریانس دو طرفه (Two way- ANOVA) انجام شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. داده ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند.

## نتایج

تأثیر پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت های متفاوت سولفات مس و دما بر پارامترهای رشد و تغذیه

بر اساس نتایج جدول ۳ در هر یک از دو گروه ماهیان (Ca<sup>+</sup> و Ca<sup>-</sup>) با افزایش غلظت سولفات مس در آب، میزان

افزایش وزن و شاخص وضعیت، کاهش معنی دار و درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی دار یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین در مقایسه دو گروه ماهیان با یکدیگر، افزایش میزان وزن گیری و شاخص وضعیت و کاهش درصد تلفات و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان پیش تیمار شده با کلسیم در مقایسه با گروه دیگر مشاهده شد. در مقایسه‌ی دو دمای پرورش نیز مقادیر تمام شاخص‌های رشد و تغذیه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بهتر از دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود که به‌ویژه از نظر افزایش وزن و شاخص وضعیت اختلاف در تمام تیمارها معنی دار شد ( $P < 0.05$ ). نتایج جدول ۳ همچنین نشان داد که بر خلاف درصد تلفات، تأثیر معنی دار و اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس در مورد افزایش وزن ماهیان، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در مورد سه شاخص عنوان شده در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما که از طریق آنالیز واریانس دو طرفه انجام شد نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد ( $\alpha = 0.008$ ). در واقع در بررسی اثرات متقابل متغیرها، اثر متقابل کلسیم × دما بر تمام شاخص‌ها به‌جز درصد تلفات، اثر متقابل کلسیم × سولفات مس بر تمام شاخص‌ها به‌جز وضعیت و اثر متقابل دما × سولفات مس بر تمام شاخص‌ها به‌جز ضریب تبدیل غذایی معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۳).

#### تأثیر پیش تیمار با کربنات کلسیم و غلظت‌های متفاوت سولفات مس و دما بر پارامترهای خون شناسی

بر اساس نتایج جداول ۴ و ۵ در هر یک از دو گروه ماهیان (Ca- و Ca+) با افزایش غلظت سولفات مس و دما، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و همینطور مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت، کاهش و مقادیر MCV و MCH، افزایش یافت. در مورد MCHC روند مشخصی مشاهده نشد اما در هر دو دمای پرورش تغییرات در ماهیان بدون پیش تیمار کربنات کلسیم معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ) (جدول ۵). همچنین تیمارهای پیش تیمار شده با کربنات کلسیم در مقایسه با گروه دیگر دارای تعداد بیشتر سلول‌های خونی و میزان هموگلوبین و هماتوکریت و میزان کمتر MCV، MCH و MCHC بودند. در مقایسه نتایج مربوط به دو دما نیز تعداد سلول‌های خونی و میزان هموگلوبین و هماتوکریت در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود درحالی‌که در مورد MCV و MCH نتایج عکس حاصل شد. در ماهیان پیش تیمار شده با کلسیم از نظر مقدار MCHC در مقایسه‌ی دو دما روند یکسانی مشاهده نشد اما در گروه دیگر MCHC در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. در مقایسه اختلاف دو دمای پرورش تنها مقدار هموگلوبین در تمام تیمارها تفاوت معنی دار نشان داد. نقطه مقابل آن، گلبول‌های سفید بودند که این معنی داری تنها در ماهیان پیش تیمار شده با کربنات کلسیم و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم/لیتر سولفات مس به‌دست آمد ( $P < 0.05$ ). نتایج جداول ۴ و ۵ نشان داد که تأثیر

معنی دار و اثر متقابل مثبت هر سه پارامتر پیش تیمار با کربنات کلسیم، درجه حرارت و غلظت سولفات مس تنها در مورد تعداد گلبول های سفید معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ). در بررسی با سه آنالیز واریانس دو طرفه نیز نتایج نشان داد که اثر متقابل دما × سولفات مس بر تمام پارامترهای خونی به جز تعداد گلبول های سفید اثر معنی دار داشت ( $P < 0/05$ ). در ارتباط با گلبول های سفید تنها اثر متقابل کلسیم × سولفات مس معنی دار بود و دما اثر معنی داری بر تعداد گلبول های سفید خون نداشت. از بین سایر شاخص های خونی تنها در مورد مقدار هموگلوبین، اثرات متقابل کلسیم × دما، کلسیم × سولفات مس و دما × سولفات مس معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) (جدول ۴، ۵).





جدول ۵: پارامترهای خون شناسی مرتبط با گلبول‌های قرمز در بچه ماهیان کپور معمولی با و بدون پیش تیمار با کرنات کلسیم پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس در دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ روز

| سولفات مس<br>(میلی‌گرم / لیتر) |                         | پیش تیمار کلسیم |   | MCV ( $10^{-6} \times$ ) فمتولیترا |                          | MCH ( $10^{-6} \times$ ) پیکوگرم |                            | MCHC (درصد)               |                 |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------|---|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|
| دما                            |                         |                 |   | ۲۷°C                               | ۲۲°C                     | ۲۷°C                             | ۲۲°C                       | ۲۷°C                      | ۲۲°C            |
| ۰                              | ۱/۹۳±۰/۱۱ <sup>aA</sup> | -               | - | ۲/۵۳±۰/۱۵ <sup>abB</sup>           | ۰/۴۹±۰/۰۱۵ <sup>dA</sup> | ۰/۵۷±۰/۰۳۰ <sup>cB</sup>         | ۲۲/۷۸±۴/۳۹۶ <sup>CA</sup>  | ۲۹/۰۶±۲/۵۳۲ <sup>CB</sup> | ۲۷°C            |
| ۱/۵                            | ۲/۱۷±۰/۱۵ <sup>aA</sup> | -               | - | ۲/۹۰±۰/۳۸ <sup>bA</sup>            | ۰/۶۲±۰/۰۰۶ <sup>eA</sup> | ۰/۶۵±۰/۰۴۰ <sup>CA</sup>         | ۲۲/۱۹±۰/۲۰۰ <sup>CA</sup>  | ۲۳/۸۵±۲/۹۶ <sup>cbA</sup> | ۲۲°C            |
| ۳                              | ۲/۸۳±۰/۳۵ <sup>bA</sup> | -               | - | ۲/۹۳±۰/۲۳ <sup>bA</sup>            | ۰/۶۶±۰/۰۸۱ <sup>fA</sup> | ۰/۶۷±۰/۰۵۰ <sup>CA</sup>         | ۲۲/۷۹±۱/۱۱۵ <sup>CA</sup>  | ۲۵/۴۴±۱/۲۴۰ <sup>CA</sup> | ۲۷°C            |
| ۰                              | ۱/۸۰±۰/۳۰ <sup>aA</sup> | +               | + | ۱/۹۷±۰/۰۶ <sup>aA</sup>            | ۰/۱۸±۰/۰۳۵ <sup>aA</sup> | ۰/۳۵±۰/۰۱۱ <sup>AB</sup>         | ۹/۳۰±۰/۷۸۸ <sup>aA</sup>   | ۲۰/۲۶±۰/۷۳۰ <sup>bB</sup> | ۲۷°C            |
| ۱/۵                            | ۱/۹۷±۰/۱۵ <sup>aA</sup> | +               | + | ۲/۳۷±۰/۰۶ <sup>abB</sup>           | ۰/۳۵±۰/۰۱۱ <sup>bA</sup> | ۰/۳۸±۰/۰۰۶ <sup>AB</sup>         | ۱۷/۳۸±۰/۳۲۹ <sup>bCA</sup> | ۱۵/۱۸±۰/۸۵۲ <sup>bA</sup> | ۲۲°C            |
| ۳                              | ۲/۳۳±۰/۱۵ <sup>aA</sup> | +               | + | ۲/۶۷±۰/۱۱ <sup>bA</sup>            | ۰/۳۰±۰/۰۳۰ <sup>CA</sup> | ۰/۴۷±۰/۰۴۵ <sup>BB</sup>         | ۱۵/۹۵±۰/۰۶۰ <sup>BA</sup>  | ۱۰/۴۲±۰/۷۹۵ <sup>aA</sup> | ۲۷°C            |
| P-value                        |                         |                 |   |                                    |                          |                                  |                            |                           |                 |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | Three-way ANOVA |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | کلسیم           |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | دما             |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | سولفات مس       |
|                                |                         |                 |   | ۰/۱۹۳                              | ۰/۰۰۸                    | ۰/۰۰۸                            | ۰/۰۰۸                      | ۰/۰۰۸                     | کلسیم × دما     |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۱۳۹                    | ۰/۱۳۹                            | ۰/۱۳۹                      | ۰/۱۳۹                     | کلسیم × سولفات  |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۸                              | ۰/۰۰۸                    | ۰/۰۰۸                            | ۰/۰۰۸                      | ۰/۰۰۸                     | مس              |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | دما × سولفات مس |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | کلسیم × سولفات  |
|                                |                         |                 |   | ۰/۰۰۱                              | ۰/۰۰۱                    | ۰/۰۰۱                            | ۰/۰۰۱                      | ۰/۰۰۱                     | مس × دما        |

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون حروف کوچک متفاوت، تفاوت معنی‌دار را در غلظت‌های متفاوت سولفات مس در گروه پیش تیمار با کرنات کلسیم (+) و بدون پیش تیمار با کرنات کلسیم (-) با یکدیگر نشان می‌دهد. در حالی که حروف بزرگ متفاوت در ردیف‌ها، تفاوت معنی‌دار بین دو دمای ۲۲ و ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد را در مورد هر پارامتر در تیمارهای مختلف آن نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ). اثر متقابل سه‌گانه با آزمون بونفرونی نیز بررسی شد و تغییرات خاصی ایجاد نشد ( $\alpha = 0.08$ ). در مورد شاخص‌هایی که اثر متقابل سه‌گانه آن‌ها معنی‌دار شد برای شفاف‌تر شدن اختلاف‌ها در مقایسه دما و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک پیش تیمار با عدم پیش تیمار با کرنات کلسیم، مقایسه دما و پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کرنات کلسیم به تفکیک غلظت‌های سولفات مس و مقایسه پیش تیمار یا عدم پیش تیمار با کرنات کلسیم و غلظت‌های سولفات مس به تفکیک دما از آنالیز واریانس دو طرفه نیز استفاده شد و اصلاحات آن در جدول اعمال شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق افزایش غلظت مس و درجه حرارت آب تأثیر منفی بر بازده رشد و تغذیه در کپور ماهیان داشت. فلز مس بر حس بویایی ماهیان تأثیر می‌گذارد و باعث تغییر اشتها ماهی می‌شود که ممکن است باعث کمبود مواد غذایی در ماهی و تضعیف رشد شود (Abdel-Tawwab *et al.*, 2007)؛ همچنین به دلیل ایجاد شرایط استرس‌زا نیاز به اکسیژن را بیشتر کرده و مصرف انرژی را افزایش می‌دهد (Khan *et al.*, 2006). افزایش دما نیز علاوه بر کاهش اکسیژن محلول در آب، موجب بروز پاسخ‌های استرسی ناشی از کمبود اکسیژن در ماهی می‌شود که مهمترین پیامد آن افزایش میزان متابولیسم یا انرژی مصرفی است. همراه شدن این افزایش دما با یک عامل استرس‌زای دیگر مانند آلودگی فلزات سنگین باعث افزایش چند برابری مصرف انرژی در ماهی می‌شود که تأثیر منفی بر بازده رشد خواهد داشت. مجموع این عوامل موجب افزایش ضریب تبدیل غذایی می‌شوند و بازده تغذیه را نیز کاهش می‌دهند. لازم به ذکر است که در تیمارهای دریافت کننده کلسیم در هر دو درجه حرارت، بازده رشد و تغذیه بهتر از تیمارهایی بود که پیش تیمار با کلسیم را دریافت نکردند. اثر متقابل مثبت کلسیم × سولفات مس × دما بر افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی نیز موید این مطلب است.

یون کلسیم از طریق اتصال به آبشش نفوذپذیری آن را کنترل می‌کند و هم‌زمان با یون‌های مس در اتصال به آبشش رقابت می‌کند (Pagenkopf, 1983; Playle *et al.*, 1993). نتایج این تحقیق مشابه نتایج فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) است که تأثیر مثبت پیش تیمار با اکسید کلسیم در کاهش سمیت مس و افزایش بازده رشد در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را گزارش کردند. در گونه‌ی *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) پیش تیمار با کلسیم موجب کاهش میزان جذب کادمیوم شد (Wicklund & Runn, 1988). همچنین در گونه‌ی کپور معمولی که در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهک قرار داشتند، LC50 کادمیوم از ۱۶۵ به ۲۳۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت (Dutta & Kaviraj, 1996). بر اساس گزارش موجود افزایش ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم می‌تواند سمیت حاد مس را در لارو تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) کاهش دهد (Abdel-Tawwab & Mousa, 2005). در تحقیق دیگری که به بررسی نقش سختی آب ناشی از کلسیم بر میزان سمیت حاد فلزات روی و مس در گونه‌ی *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) پرداخت، میزان سمیت این دو فلز با کاهش سختی آب افزایش یافت (Pourkhabbaz *et al.*, 2011). نتایج مشابهی در ارتباط با نقش حفاظتی کربنات کلسیم در برابر سمیت آرسینیک در گربه ماهی نیل (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) گزارش شده است (Abdel-Hameid, 2009). تأثیر منفی افزایش دمای پرورش در سایر آبزیان پرورشی نیز گزارش شده است. در خرچنگ دراز آب شیرین (*Orconectes immunis*) افزایش ۳-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد دما میزان سمیت مس را ۷ درصد و میزان مصرف اکسیژن را ۳۴ درصد افزایش داد. در همین تحقیق افزایش ۷ درجه‌ای دما (از ۲۰ به ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) میزان مصرف اکسیژن را ۵۴ درصد افزایش داد (Khan *et al.*, 2006).

در مطالعه حاضر درصد تلفات با افزایش غلظت مس و همین‌طور افزایش دمای پرورش افزایش یافت اما پیش تیمار با کلسیم درصد تلفات را کاهش داد و موجب بازماندگی کامل در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد شد. البته معنی‌دار نشدن اثر متقابل کلسیم × سولفات مس × دما و کلسیم × دما بر درصد تلفات عمدتاً به دلیل بازماندگی ۱۰۰ درصد در دو گروه شاهد بود که نشان داد در صورت عدم آلودگی با سولفات مس، بچه ماهیان قادر به بقاء در دماهای بالاتر هستند هر چند میزان رشد آنها کاهش می‌یابد، اما هم‌زمان شدن افزایش دمای پرورش با آلودگی سولفات مس میزان بقاء را کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق مشابه نتایج بدست آمده در گونه‌ی *Synechogobius hasta* است که درصد بازماندگی آن در غلظت‌های مساوی از کلسیم، با افزایش میزان کادمیوم آب کاهش و با افزایش میزان کلسیم آب افزایش یافت (Song *et al.*, 2013). همچنین در گونه‌ی *Fundulus heteroclitus* میزان سمیت کادمیوم با افزایش غلظت کربنات کلسیم تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت و تماس اولیه با کلسیم طول مدت زنده‌مانی در آب حاوی کادمیوم را افزایش داد (Gill & Eppl, 1992). در گونه‌ی *Prochilodus scrofa* (Agassiz, 1829) درصد تلفات در اثر تماس با سولفات مس در pH= ۴/۵ با افزایش دما از ۲۰

به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. در حالی که در  $pH=8$  میزان تلفات در دو دما تفاوت معنی‌دار نداشت. این امر بیان‌کننده تأثیر سایر پارامترهای کیفی آب در میزان سمیت سولفات مس است (Carvalho & Fernandes, 2006; Witeska, 2003). در این تحقیق با افزایش غلظت سولفات مس و دمای پرورش، تعداد گلبول‌های قرمز و به دنبال آن میزان هماتوکریت و هموگلوبین کاهش و مقدار MCH و MCV افزایش یافت. کاهش گلبول‌های قرمز و به دنبال آن میزان هموگلوبین یکی از شاخص‌های بارز کم‌خونی در ماهیان است. همچنین افزایش مقدار MCH و MCV می‌تواند نشان‌دهنده بروز اختلال در عملکرد طحال، کبد، مسمومیت و کم‌خونی باشد (Munker et al., 2007). لازم به ذکر است که در هر دو دمای پرورش در تیمارهای دریافت‌کننده پیش تیمار کلسیم تا حدودی کم‌خونی ماهیان بهبود یافت که البته بیشتر در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مشهود بود. اثر متقابل مثبت کلسیم × سولفات مس × دما بر شاخص‌های عنوان شده نیز موید این مطلب است. نتایجی مشابه این تحقیق در کپور معمولی در ارتباط با کاهش گلبول‌های قرمز و هموگلوبین و افزایش مقدار MCH و MCV با افزایش میزان نانو ذرات اکسید مس تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۴ روز گزارش شده است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). در گونه‌ی *Heteropeneustes fossilis* (Bloch, 1794) نیز غلظت تحت‌کشنده سولفات مس موجب کم‌خونی در ماهیان گشت (James & Sampath, 1995). کم‌خونی می‌تواند به دلیل تجمع گلبول‌های قرمز در آبشش و یا در اثر تخریب گلبول‌های قرمز خون و یا به دلیل ممانعت از ساخته شدن آن‌ها توسط فلزات سنگین حاصل شود (خبازی و همکاران، ۱۳۹۴). به هر حال برخی نتایج عکس نیز گزارش شده است؛ به عنوان مثال در گونه‌ی *Prochilus scrofa* تماس با مس موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین و هماتوکریت شد (Carvalho & Fernandes, 2006). دلیل این امر تخلیه گلبول‌های قرمز از اندام‌های ذخیره‌کننده آن مانند طحال عنوان شده است زیرا حجم متوسط سلول‌ها بدون تغییر ماند. بر اساس گزارش‌های موجود مسمومیت با فلزات سنگین در مقادیر کم (سولفات مس در حد میکروگرم در لیتر) و یا در زمان کم، در راستای اثرات آدرنرژیک (Adrenergic effects) در پاسخ به استرس، سبب تحریک طحال و آزاد سازی گلبول‌های قرمز جوان در جریان خون برای افزایش اکسیژن رسانی به بافت‌ها می‌شود (خبازی و همکاران، ۱۳۹۴). در صورتی که زمان تماس و یا غلظت فلزات سنگین در آب افزایش یابد، افزایش گلبول‌های قرمز متوقف می‌شود و ماهیان دچار کم‌خونی می‌گردند (Val et al., 2004). همچنین در کپور معمولی افزایش ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد درجه حرارت (از ۲۴ به ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ روز موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز شد که دلیل تفاوت آن با نتایج این تحقیق مقادیر کمتر افزایش دما و طول بیشتر مدت تحقیق است (Ahmad et al., 2011).

تأثیر مثبت پیش تیمار با کلسیم بر شاخص‌های خونی در این تحقیق مشابه گونه تیلاپیای نیل بود که سلول‌های خونی در تیمارهای دریافت‌کننده پیش تیمار کلسیم افزایش یافتند (Abdel-Tawwab et al., 2007). یادگار و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیق خود در باره‌ی ماهی بنی *Barbus sharpeyi* (Günther, 1874) که در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم

در لیتر سولفات مس قرار داده شدند، روند کاهشی در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و مقدار هموگلوبین و هماتوکریت را گزارش کردند. کاهش چشمگیر در تعداد سلول‌های خونی و کم‌خونی حاصل از آن در اثر تماس با فلز روی نیز در گونه‌ی *Heteropeustes fossilis* گزارش شده است (Goel et al., 1985). تأثیر منفی افزایش دما بر میزان شاخص‌های خونی در تحقیق حاضر مشابه تأثیر درجه حرارت بر میزان سمیت مس و شاخص‌های خونی در گونه‌ی *Prochidodu scrofa* در دو pH اسیدی و قلیایی بود که نشان داد با افزایش ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دمای آب از ۲۰ به ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، در هر دو محیط اسیدی و قلیایی تعداد گلبول‌های قرمز و مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت (Carvalho & Fernandes, 2006).

در تحقیق حاضر نتایج مربوط به گلبول‌های سفید قدری متفاوت از سایر شاخص‌ها بود. اگرچه تعداد گلبول‌های سفید با افزایش غلظت سولفات مس و دما در هر دو گروه از ماهیان روند کاهشی نشان داد اما این تفاوت در بسیاری از تیمارها معنی‌دار نبود و تنها غلظت سولفات مس و اثر متقابل کلسیم × سولفات مس بر تعداد گلبول‌های سفید محسوس بود. بر اساس نتایج، افزایش دمای آب تا ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بر تعداد گلبول‌های سفید تأثیر چشمگیری نداشت و مثبت نبودن اثر متقابل کلسیم × دما، سولفات مس × دما و کلسیم × سولفات مس × دما موید این مطلب است؛ بر خلاف نتایج این تحقیق در مطالعه Ahmad و همکاران (۲۰۱۱) افزایش ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد دما به مدت یک ماه موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید شد که می‌تواند به دلیل نیاز به آنتی‌بادی بیشتر برای کمک به زنده‌مانی ماهیان باشد؛ نتیجه‌ای که در تحقیق حاضر حاصل نشد و موجب تلفات معنی‌دار بچه‌ماهیان در دمای ۲۷ نسبت به دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد شد. براساس گزارش‌های موجود افزایش تعداد گلبول‌های سفید معمولاً در ساعات و یا روزهای اولیه پس از مواجهه‌ی ماهیان با عوامل استرس‌زا اتفاق می‌افتد که ماهی تلاش می‌کند سیستم ایمنی بدن را تقویت کند و با شرایط سازگار شود (Mazon et al., 2002). نتیجه‌ای که در کپور معمولی تا ۱۴ روز پس از تماس با غلظت نیمه مزمن اکسید مس نیز گزارش شده است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). در صورت طولانی شدن زمان مواجهه با عامل استرس‌زا مانند آلودگی فلزات سنگین و یا افزایش درجه حرارت، تعداد گلبول‌های سفید کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تخریب در عملکرد اندام‌های تولیدکننده آن‌ها مانند کلیه و طحال و لکوسیتوپنی (Leukocytopenia) یا کاهش تعداد لکوسیت‌ها باشد (Ellis, 1981). البته نتایج تحقیق حاضر مشابه گزارش‌های موجود در گونه‌ی تیلاپپای نیل (Abdel- Tawwab et al., 2007) و ماهی بنی (یادگار و همکاران، ۱۳۹۰) بود که کاهش تعداد گلبول‌های سفید با افزایش میزان سولفات مس را گزارش کردند.

## نتیجه‌گیری کلی

در نتیجه، استفاده از سولفات مس به‌عنوان جلبک‌کش در مزارع پرورش کپور معمولی به‌ویژه در زمان افزایش دمای آب می‌تواند بر بازده رشد و تغذیه و بازماندگی ماهیان تأثیرگذار باشد، به‌گونه‌ای که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و

دما ۲۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین تأثیر منفی را بر شاخص‌های عنوان شده داشت. پیش تیمار با کربنات کلسیم می‌تواند در رقابت با مس تا حد قابل توجهی اثر منفی سولفات مس را تعدیل نماید که به‌ویژه بر زنده‌مانی بچه‌ماهیان در تیمار ۱/۵ گرم در لیتر سولفات مس و دما ۲۲ درجه سانتی‌گراد موثر بوده است. همچنین تأثیر سه متغیر پیش تیمار/عدم پیش تیمار با کربنات کلسیم، سولفات مس و دما بر شاخص‌های رشد و تغذیه و بازماندگی بسیار مشهودتر از پارامترهای خونی بود. در مورد شاخص‌های خونی به دلیل پیچیدگی‌های تأثیر فیزیولوژیک سه متغیر فوق تفاوت بین برخی تیمارها معنی‌دار نشد. اما در یک نتیجه‌گیری کلی افزایش میزان سولفات مس باعث بروز کم‌خونی و کاهش ایمنی ماهیان گشت و تأثیر پیش تیمار با کربنات کلسیم به‌ویژه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم/لیتر سولفات مس در دما ۲۷ درجه سانتی‌گراد موثرتر بود. با توجه به تأثیر بیشتر کلسیم به‌عنوان یکی از اجزای سختی آب در مقایسه با منیزیم، پیش تیمار ۷ روزه ماهیان با ۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر کربنات کلسیم به‌ویژه تا غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس حتی در شرایط افزایش دما توصیه می‌شود. پیشنهاد می‌شود تأثیر افزایش غلظت کربنات کلسیم و یا مدت پیش تیمار در تعدیل اثرات منفی سولفات مس در غلظت‌های بیشتر از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بررسی شود.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات ماهیان زینتی جهاد دانشگاهی واحد مازندران بویژه آقای مهندس نیک بخش تقدیر و تشکر می‌شود.

## منابع

- احمدی، ح.، سادات نعیمی، ا.، نظر حقیقی، ف.، غفوری، ح. (۱۳۹۵) اثرات نیمه مزمون نانو ذره اکسید مس بر برخی پارامترهای خونی و بافت آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۰(۴): ۱-۱۴.
- جمال زاده، ح.ر.، کیوان، ا.، جمیلی، ش.، عریان، ش.، سعیدی، ع.ا. (۱۳۸۱) بررسی برخی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۱۱(۱): ۲۵-۳۴.
- خبازی، م.، هرسیج، م.، هدایتی، ع.ا.، گرامی، م.ح.، جعفری، ح. (۱۳۹۴) تأثیر غلظت تحت کشنده فلز مس بر پارامترهای خون‌شناسی در قزل‌آلای رنگین کمان. مجله بوم‌شناسی آبیان، ۴(۴): ۱-۷.
- فرهادی، م.ت.، بحرکاملی، م.، یوسفیان، م. (۱۳۹۳) تأثیر کلسیم به‌عنوان عامل محافظت‌کننده در برابر سمیت مس محیط در بچه ماهی کپور معمولی. فن‌آوریهای نوین در توسعه آبی‌پروری، ۸(۱): ۷-۱۸.
- یادگار، ن.، جواهری بابلی، م.، ستاری، ب.، سلاطی، ا.پ. (۱۳۹۰) تأثیر سولفات مس و فرمالین بر پارامترهای خون‌شناسی در ماهی بنی. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، ۳(۲): ۱۰۹-۱۱۶.

- Abdel-Tawwab, M. and Mousa, M.A.A. (2005) Effect of calcium pre-exposure in acute copper toxicity to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Zagazig Veterinary Journal*, 33 (1):80-87.
- Abdel-Tawwab, M., Mamdouh, A.A., Mohamad, H. and Saleh, F.M. (2007) The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 264 (1-4):236- 246.
- Ahmad, S.M., Shah, F.A., Bhat, F.A., Bhat, J.I.A. and Balkhi, M.H. (2011) Thermal adaptability and disease association in common carp *Cyprinus carpio communis* acclimated to different (four) temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 36 (8):492-497.
- Bat, L., Akbulut, M., Oulha, M., Gundogdu, A. and Satilmis, H.H. (2000) Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and lead to the fresh water Amphipod *Gammarus pulex pulex*. *Turkish Journal of Zoology*, 24 (2000): 409-415.
- Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. (1973) Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5 (6): 771-782.
- Boyd, C.E. (1990) *Water quality in ponds for Aquaculture*. Birmingham Publishing. Birmingham. 482 Pp. Alabama. USA.
- Carvalho, C.S. and Fernandes, M.N. (2006) Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251 (1): 109-117.
- Carvalho, C.S., Araujo, H.S.S. and Fernandes, M.N. (2004) Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137 (2004): 225-235.
- Chen, Q.L., Luo, Z., Zheng, L., Li, X.D., Liu, X.Y., Zhao, H. and Gong, Y. (2012) Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76 (2):126-134.
- Davies, P.H., Gorman, W.C., Carlson, C.A. and Brinkman, S.F. (1993) Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 5(2): 67-77.
- Dutta, T.K. and Kaviraj, A. (1996) Effects of lime acclimation on the susceptibility of two fresh water teleosts and one oligochaet worm to metabolic pollutant cadmium. *Folia Biologica (Krakow)*, 44 (3-4): 143-148.
- Ellis, A.E. (1981) *Stress and the modulation of defense mechanisms in fish*. Academic Press. 367 Pp. London. England.
- Gill, T.S. and Epple, A. (1992) Impact of cadmium on the mummichog, *Fundulus heteroclitus* and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology*, 101 (3): 519-523.
- Goel, K.A., Mishra, B.P., Gupta, K. and Wadhwa, S. (1985) A comparative hematological study on a few fresh water teleost. *Indian Journal of Fisheries*, 31 (3): 108-112.
- James, R. and Sampath, K. (1995) Sublethal effects of mixtures of copper and ammonia on selected biochemical and physiological parameters in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 55 (2): 187-194.

- Khan, M.A., Ahmed, S.A., Catalin, B., Khodadoust, A., Ajayi, O. and Vaughn, M. (2006) Effect of temperature on heavy metal toxicity to juvenile crayfish, *Orconectes immunis* (Hagen). *Environmental toxicology*, 21 (5): 513-520.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinteiro, G.H. and Fernandes, M.N. (2002) Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish (*Prochilodus scrofa*). *Brazilian Journal of biology*, 62 (4): 621-631.
- Mckenzie, SH. B. and Williams, L. (2014) *Clinical Laboratory, Hematology*. 3rd Edition. Pearson Clinical Laboratory Science. Pp: 253-256. USA.
- Mehta, K. (2017) Impact of temperature on contaminants toxicity in fish fauna: a review. *Indian Journal of Science and Technology*, 10 (18): 1-6.
- Munker, R., Hillwe, E., Glass, J. and Paquette, R. (2007) *Modern Hematology: Biology and Clinical Management*, Second Edition, Humana Press Inc. 513 p.
- Nikbakhsh, J. and Bahrekazemi, M. (2017) Effect of Diets Containing Different Levels of Prebiotic Mito on the Growth Factors, Survival, Body Composition, and Hematological Parameters in Common Carp *Cyprinus Carpio* Fry. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 3 (1):1-6.
- NRC (National Research Council). (1993) *Nutrient Requirements of Fish*. Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture. National Research Council. National Academy Press. 128 Pp. Washington DC, USA.
- Pagenkopf, G.K. (1983) Gill surface interaction model for trace metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environmental Science and Technology*, 17 (6): 342-347.
- Perschbacher, P.W. and Wurts, W.A. (1999) Effect of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish, *Ictalurus Punctatus*. *Aquaculture*, 172 (3-4): 275-280.
- Playle, R.C., Dixon, D. and Burnison, K. (1993) Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligand. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50 (12): 2667-2677.
- Pourkhabbaz, A., Ebrahimpour Kasmani, M., Kiyani, V. and Hosynzadeh, M.H. (2011) Effects of water hardness and Cu and Zn on LC50 in *Gambusia holbrooki*. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 23 (4): 224-228.
- Rehulka, J. (2003) Hematological analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) affected by viral hemorrhagic septicaemia (VHS). *Diseases of Aquatic Organisms*, 56 (3): 185-193.
- Singhadach, P., Jiraungkoorsku, W., Tansatit, T., Kosa, P. and Ariyasrijit, C. (2009) Calcium pre-exposure reducing histopathological alteration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after lead exposure. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4 (5): 228-237.
- Song, Y.F., Luo, Z., Chen, Q.L., Liu, X., Liu, C.X. and Zheng, J.L. (2013) Protective effects of calcium pre-exposure against waterborne cadmium toxicity in *Synechogobius hasta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65 (1):105–121.
- Takasusuki, J., Araujo, M.R.R. and Frenandes, M.N. (2004) Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (*Prochilodontidae*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72 (5): 1075-1082.
- Val, A.L., Silva, M.N.P. and Val, V.M. (2004) *Physiological stress in fish-adjustments and organic disorders: health of aquatic organisms*. Editora Varela. 758 Pp. Sao Paulo.

- Wicklund, A. and Runn, P. (1988) Calcium effects on cadmium uptake, redistribution, and elimination in minnows, *Phoxinus phoxinus*, acclimated to different calcium concentrations. *Aquatic Toxicology*, 13 (2): 109-121.
- Witeska, M. (2003) The effects of environmental factors on metal toxicity to fish (Review). *Fresenius Environmental Bulletin*, 12 (8):824-829.

## The effect of Calcium Carbonate pretreatment at different temperatures on reducing the toxicity of Copper Sulfate in common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)

Akram Qasemzadeh<sup>1</sup>, Masoumeh Bahrekazemi<sup>2\*</sup>

Received:2020.6.15

Accepted:2020.7.26

### Abstract

The use of Copper Sulfate as an algacide in fish farms can cause poisoning in fish and harm their growth and health. Due to the effect of water Calcium amount on reducing Copper Sulfate toxicity, in this study, the effect of seven-day Calcium Carbonate pretreatment on reducing Copper toxicity in common Carp (*Cyprinus carpio*) was studied at two different temperatures. Initially, the half number of Carp were placed in water which 200 mg / L of Calcium Carbonate was added to for one week. Then, all fish were farmed at concentrations of 0, 1.5 and 3 mg / L of Copper Sulfate at 22 and 27 °C for 60 days. Based on the results, weight gain and condition factor decreased and the percentage of mortality and feed conversion ratio increased significantly, with increasing the amounts of Copper and temperature ( $P<0.05$ ). In both groups of fish, the numbers of red and white blood cells, and the amounts of hemoglobin and hematocrit decreased with increasing Copper Sulfate concentration and temperature but MCV and MCH increased. But in the case of MCHC, no clear trend was observed. Also, the positive interaction of all three parameters of pretreatment with Calcium Carbonate, temperature, And Copper Sulfate concentration was not significant except in the case of white blood cells and mortality ( $P>0.05$ ). Therefore, increased Copper Sulfate can decrease the growth efficiency, nutrition, and survival of fish, especially at 27 ° C, and pretreatment with Calcium Carbonate can significantly reduce the negative effect of Copper Sulfate in competition with Calcium. The effect of three variables of pretreatment with Calcium Carbonate, Copper Sulfate, and temperature on growth and nutrition indices was much more obvious than blood parameters. An increased amount of Copper Sulfate caused anemia and immune deficiency in fish and the effect of pretreatment with Calcium Carbonate was especially effective in reducing the poisonous effect of Copper Sulfate at the concentration of 1.5 mg / L at 27 °C. So, seven-day pretreatment of fish with 200 mg / L of Calcium Carbonate is recommended, especially up to a concentration of 1.5 mg / L of Copper Sulfate, even at elevated temperature.

**Keywords:** Calcium Carbonate, Copper Sulfate, Common Carp, Hematology

---

1-M.SC..Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

2-Assistant Professor, Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

\*(Corresponding Author:m.bahrekazemi@qaemiau.ac.ir)

## بررسی فلور، شکل زیستی، پراکنش جغرافیایی و دانش بومی گیاهان دارویی تفت

امیرعباس مینایی فر<sup>۱\*</sup>، سعیده دهقانپور فراشاه<sup>۲</sup>، سعیده سادات میرزاده واقفی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

### چکیده

یکی از زمینه‌های کاربردی علم سیستماتیک شناخت گونه‌های گیاهی هر منطقه است، این شناخت منجر به مدیریت صحیح عرصه‌های زیست‌محیطی می‌شود که خود یکی از پیش‌نیازهای اساسی در دستیابی به توسعه پایدار است. پس از تعیین مناطق مختلف رویشگاهی شهرستان تفت، گیاهان دارویی و اطلاعات افراد بومی در مورد خواص درمانی گیاهان جمع‌آوری شدند و اطلاعات گردآوری، مرتب و بازنویسی شدند و همچنین نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده مورد شناسایی قرار گرفتند. در این پژوهش ۹۱ گونه گیاه دارویی شناسایی شد و نتایج حاصل از دانش بومی نشان می‌دهد این گونه‌ها عمدتاً در درمان مشکلات گوارشی، تنفسی و دستگاه ادراری مورد استفاده می‌باشند. امید است پژوهش‌هایی از این نوع، علاوه بر نشان دادن اهمیت رشته گیاه‌شناسی در پژوهش‌های کاربردی، منجر به برنامه‌ریزی صحیح زیست‌محیطی و زمینه‌ساز بهره‌برداری پایدار از این منابع ارزشمند شوند.

### واژه‌های کلیدی: توسعه پایدار، شکل زیستی، گیاه‌شناسی کاربردی

### مقدمه

فلور ایران به علت وسعت و تنوع شرایط اقلیمی بسیار غنی می‌باشد، از آنجا که یکی از پیش‌نیازهای اساسی در دستیابی به توسعه پایدار، مدیریت صحیح عرصه‌های طبیعی است، به دست آوردن اطلاعات پایه از راه برآورد و تهیه فهرست پوشش گیاهی هر منطقه و شناخت انواع پوشش‌های گیاهی، جوامع و گونه‌ها در برنامه‌های مدیریتی امری ضروری است. بررسی فلوربستیکی هر منطقه مانند شناسنامه‌ای وجود گیاهان و وضعیت آنها را نشان می‌دهد (Asri et al., 2000; Yarri et al. 2018). شناسایی و معرفی گیاهان یک منطقه به‌طور اختصاصی و محلی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این نوع شناخت می‌توان برای دسترسی به گونه‌های گیاهی خاص در مکان و زمان مشخص استفاده نمود. از

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

\* (نویسنده مسئول: aaminaeifar@pnu.ac.ir)

۲- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

دیگر مزایای آن می‌توان به تعیین پتانسیل و قابلیت‌های رویشی هر منطقه، شناخت گونه‌های مقاوم و مهاجم، گونه‌های درحال انقراض و شناسایی عوامل مخرب رویشگاه‌های منطقه اشاره نمود (Qalassimoud *et al.*, 2006). هر روزه گیاهی به لیست گیاهان نادر و در معرض انقراض افزوده می‌شود، بررسی و شناخت این گونه‌ها به منظور جلوگیری از نابودی آنها بسیار مهم است. در این میان بسیاری از گونه‌های دارویی نیز در مناطق مختلف کشور رویش دارند، هرچند ممکن است در معرض خطر انقراض نباشند ولی دانش بومی مربوط به ارزش و کاربرد دارویی آنها به واسطه‌ی تغییر سبک زندگی انسان امروزی و فاصله‌ی بین نسلها به سرعت در حال نابودی است. گیاهان دارویی در طول تاریخ بشر همیشه با انسان همراه بوده‌اند و آثار درمانی و اهمیت استفاده آنها بر هیچکس پوشیده نیست. طبیعت سرشار از گونه‌های گیاهی است که بسیاری از آنها از لحاظ ارزش دارویی هنوز شناخته نشده‌اند. کشف خواص درمانی تک تک گیاهان با دانش نوین امروزی به سالها زمان نیاز دارد زیرا در بسیاری از نقاط جهان گیاهان دارویی وجود دارند که به صورت محلی برای درمان برخی بیماری‌ها از آنها استفاده می‌شود ولی این خواص درمانی برای علوم جدید هنوز ناشناخته هستند (Martin, 1995). امروزه اهمیت مطالعه در مورد دانش بومی و محلی مناطق مختلف جهان و ثبت این دسته از اطلاعات بیش از پیش مشخص شده است (Amiri & Shahwali, 1999)، علاوه بر این انسان همواره در جستجوی منابع مختلفی برای رفع نیازهای خود می‌باشد و از جمله مهمترین منابع حیاتی، داروهای گیاهی هستند، از اینرو افزایش جمعیت انسان همواره تهدیدی برای منابع طبیعی بوده و هست، به طوری که امروزه مهمترین چالش زیستی، حفاظت از تنوع زیستی است (Hawkes *et al.*, 2000). برای حفظ تنوع گونه‌ها و منابع طبیعی و همچنین بهره‌برداری صحیح و پایدار از منابع موجود ابتدا باید درکی از موجودیت و پراکنش منابع طبیعی و ارتباط آن با جوامع انسانی وجود داشته باشد، شناخت گیاهان دارویی هر منطقه عاملی است در جهت شناخت بهتر منابع طبیعی ارزشمند و تجدید شونده که زمینه‌ی توسعه و بهره‌برداری پایدار از این منابع ارزشمند طبیعی را فراهم می‌نماید (Emadi and Abbasi, 1998). مطالعات متعددی روی پوشش گیاهی استان یزد و منطقه‌ی تفت در سالهای گذشته صورت گرفته است، به عنوان مثال مظفریان و همکاران اقدام به شناسایی گیاهان استان یزد نموده و نتایج کار خود در قالب کتاب فلور یزد منتشر نموده‌اند (Mozaffarian *et al.*, 2000)، قوچانی در قالب پایانامه کارشناسی ارشد به مطالعه‌ی فلور و جوامع گیاهی منطقه‌ی خضرآباد پرداخته است (Ghouchani, 2004)، زارعی و همکاران طی بررسی پوشش گیاهی منطقه‌ی ابرکوه در استان یزد، ۱۵۸ گونه از ۳۰ تیره‌ی گیاهی را گزارش نموده‌اند (Zareei *et al.*, 2008)، باغستانی و همکاران در مطالعه‌ی فلورستیکی حوزه‌ی آبخیز خود-نیوک ۲۵۵ گونه از ۴۴ خانواده‌ی گیاهی را جمع‌آوری و شناسایی نموده‌اند (Baghestani *et al.*, 2010). بر اساس مطالعه‌ی زارع زاده و همکاران در دره‌ی دامگاهان ۱۷۵ گونه از ۴۶ خانواده‌ی گیاهی گزارش شده است (Zarezadeh *et al.*, 2007).

شناسایی گونه‌های اندمیک و دارای ارزش حفاظتی ویژه، در منطقه شیرکوه توسط ایرانژاد در سال ۱۳۹۱ انجام شده (Irannejad parizi, 2012) و همچنین طرح‌های تحقیقاتی برای جمع‌آوری، شناسایی و تشکیل هرباریوم گیاهان استان در مرکز

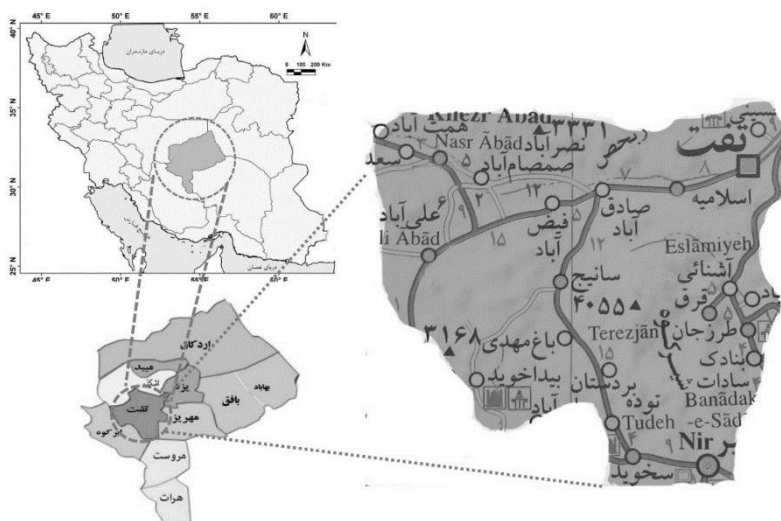
تحقیقات جهاد کشاورزی استان یزد صورت گرفته است (Zarezadeh, 2000; Baghestani, 2000)، اما در هیچکدام از طرح‌ها، پایان‌نامه‌ها، کتب و مقالات به بحث دانش بومی و استفاده از گیاهان دارویی خودرو پرداخته نشده است. ایران سرزمینی کهن با تنوع گونه‌های گیاهی قابل توجه است، قدمت زندگی بشر در این سرزمین به همراه تنوع زیستگاه و تنوع گونه‌های گیاهی منجر به شکل‌گیری دانش بومی ارزشمندی در خصوص استفاده از گیاهان دارویی در هر گوشه از این سرزمین شده است. در این مقاله سعی شده است ضمن بررسی فلور، تیپ رویشی و کروتیپ گیاهان دارویی شهرستان تفت تا حد امکان دانش بومی گیاهان دارویی خودرو که بازتابی از قابلیت‌های اکوسیستم‌های بومی هر منطقه هستند جمع‌آوری و ثبت گردد.

## مواد و روش‌ها

شهرستان تفت با وسعتی حدود ۵۹۴۵ کیلومتر مربع، در کنار ارتفاعات شیرکوه بین ارتفاع ۱۲۰۰ تا ۴۰۷۵ متر از سطح دریا واقع شده است، این شهرستان از شمال به شهرستان یزد، از غرب به شهرستان‌های یزد و ابرکوه، از جنوب به شهرستان‌های ابرکوه، خاتم و مهریز و از شرق به شهرستان‌های یزد و مهریز محدود می‌شود (شکل شماره ۱). شهرستان تفت در بلندترین نقطه‌ی استان واقع شده است، بیشترین نزولات جوی استان در محدوده‌ی این شهرستان صورت می‌گیرد. مهمترین و اصلی ترین ارتفاعات منطقه‌ی تفت شیرکوه با ارتفاع ۴۰۷۵ متر، بلندترین کوه استان یزد محسوب می‌گردد. مهمترین قله این شهرستان عبارتند از کوه تلخستان (۲۹۲۰ متر)، کوه قوچان (۲۸۹۶ متر)، کوه مسجد (۳۱۳۳ متر)، کوه زربند (۳۰۹۹ متر)، کوه بادآسمان (۲۵۵۲ متر)، کوه کاسه (۱۶۰۶ متر)، کوه چاه‌میل (۲۶۰۰ متر)، کوه بازرگان (۲۴۴۷ متر)، کوه چاه‌ریز (۲۴۰۰ متر)، کوه برفخانه (۳۹۹۰ متر) و کوه لახسه (۳۸۷۳ متر) (Dashtakian and Baghestani, 2001). متوسط بالاترین درجه‌ی حرارت، در تابستان ۳۴ و کمترین آن در زمستان ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد است. میانگین بارندگی سالیانه برف ۷۰ سانتی‌متر و باران تا ۶۰ سانتی‌متر است. میزان نزولات در ارتفاعات ۳۰۰ تا ۳۵۰ میلی‌متر و در دامنه‌ها به ۲۵۰ میلی‌متر می‌رسد (Talebi *et al.*, 2010).

این تحقیق از دو بخش پرسشگری محلی و جمع‌آوری گیاهی تشکیل شده است، در ابتدا پس از شناسایی روستاها و راه‌های ارتباطی و تهیه نقشه‌ی منطقه بر اساس نقشه‌ها و اطلاعات موجود (Zarezadeh, 2000; Baghestani, 2000; Entekhabi *et al.*, 2008)، مناطق مختلف رویشگاهی شهرستان تعیین شد و در فصل‌های رویشی (از ابتدای اسفند ماه تا اوایل خردادماه، وابسته به ارتفاع و اقلیم مناطق مختلف) عملیات جمع‌آوری گیاهان دارویی شروع می‌شد و تا پایان فصل رویش ادامه می‌نمود. در هر دوره‌ی جمع‌آوری، اطلاعات مربوط به تاریخ و مکان جمع‌آوری و سایر اطلاعات گیاهان ثبت شد، همزمان با جمع‌آوری گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی، افراد مطلع هر منطقه نیز شناسایی شدند و از طریق تکمیل پرسشنامه اطلاعات کاربردی گیاهان شامل؛ نام محلی، نوع کاربرد گیاه، اندام مورد استفاده و

نحوه استفاده افراد بومی از آن گیاه ثبت شد، همچنین برای جلوگیری از حذف اطلاعات احتمالی محلی به دلیل عدم همکاری کافی در تکمیل پرسشنامه خصوصاً توسط افراد مسن و با سطح سواد پایین، ۸ مصاحبه‌ی گروهی نیز انجام گرفت، سپس از گیاهان دارویی جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های استاندارد علمی نمونه‌های هرباریومی تهیه شد (Jones and Luch Singer, 2004). نمونه‌های آماده شده در هرباریوم دانشگاه پیام نور یزد با استفاده از کلیدهای شناسایی و منابع معتبر گیاه‌شناسی نظیر فلور رنگی ایران، فلور ترکیه، فلور شوروی سابق و فلور ایران (Assadi *et al.*, 2013; Ghahreman, 1978; Komarov and Shishkin, 1974; Davis, 1985) شناسایی و تعیین نام شدند. اسامی فارسی گیاهان نیز استخراج و تعیین شد (Mozaffarian, 1998). به منظور تعیین اشکال زیستی گیاهان منطقه از روش رانکیه استفاده شد. کروتیپ گیاهان منطقه نیز با استفاده از منابع موجود تعیین شد (Raunkiaer, 1934; Zohary, 1973). طبقه‌بندی ارایه شده در این تحقیق بر اساس روش کرانکوئیست می‌باشد. (Takhtajan, 1986; Leonard & White 1991).



شکل ۱: نقشه‌ی موقعیت شهرستان تفت و منطقه‌ی مورد بررسی (برگرفته از نقشه‌ی موسسه‌ی کارتوگرافی گیتاشناسی ایران)

## نتایج

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ۹۱ گونه گیاه دارویی متعلق به ۳۱ تیره که مورد استفاده بومی دارد و خودرو بودند جمع‌آوری و شناسایی شد. از کل گونه‌های جمع‌آوری شده، تیره کاسنیان (Asteraceae) با ۲۰ گونه (۲۱/۹ درصد)، تیره نعنائیان (Lamiaceae) با ۱۰ گونه (۱۰/۹۸ درصد) و تیره کرفسیان (Brassicaceae) با ۸ گونه (۸/۷۹ درصد)، بیشترین گونه‌های گیاهی را در میان گیاهان دارویی جمع‌آوری شده به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۲). مشخصات این گونه‌ها شامل نام علمی، محل رویش، بخش‌های مورد استفاده و کاربرد درمانی آنها در جدول شماره ۲ مشخص شده است. در بررسی دوره رویشی گیاهان دارویی این منطقه مشخص شد که ۴۷ گونه (۵۱/۶۴ درصد) یکساله، ۴۲ گونه (۴۶/۱۵ درصد) چندساله و دو

گونه (۲/۱۹ درصد) دو ساله هستند، از لحاظ شکل زیستی تروفیت‌ها (Therophytes) با ۳۸ گونه (۴۱/۷۵ درصد) رایج‌ترین شکل زیستی است و اشکال زیستی همی کریپتوفیت (Hemicryptophytes) با ۳۱ گونه (۳۴/۰۶ درصد)، کاموفیت (Chamaephytes) با ۱۱ گونه (۱۲/۰۸ درصد)، ژئوفیت (Geophytes) با ۶ گونه (۶/۵۹ درصد) و فانروفیت (Phanerophytes) با ۵ گونه (۵/۴۹ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفته‌اند. بررسی کروتیپ (Chorotype) گیاهی منطقه نشان می‌دهد که گونه‌های دارویی متعلق به ناحیه‌ی ایرانی و تورانی (Irano-Turanian region) با ۳۸ گونه (۴۲/۸۵ درصد) بیشتر از سایر کروتیپ‌ها در منطقه حضور دارند و کمترین حضور مربوط به کروتیپ اروپا و سیبری (Euro-Siberian region) و همچنین صحرا و سندی (Saharo-Sindian region) با ۱/۰۹ درصد می‌باشد (شکل ۳). بر اساس نتایج حاصل از اطلاعات بومی و دارویی منطقه این گونه‌ها به‌طور عمده در درمان ناراحتی‌های گوارشی، تنفسی و دستگاه ادراری مورد استفاده می‌باشند، رایج‌ترین شکل مصرف به‌صورت دمنوش بوده است، بیشترین اندام مورد استفاده برگ‌ها و کمترین بخش‌های مورد استفاده ریزوم‌ها هستند (شکل ۴).

جدول ۱: جدول اطلاعات هرباریومی نمونه‌های جمع‌آوری شده

| شماره هرباریومی | * محل جمع‌آوری              | جمع‌آوری کننده | نام علمی                                                                      | خانواده       |
|-----------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| ۳۹۴۱۲۸۲         | 31°38' 53" N<br>54°01'34" E | مینایی فر      | <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.                                           | Adiantaceae   |
| ۳۹۵۰۳۸۷         | 31°38' 27" N<br>54°08'26" E | دهقان          | <i>Pistacia atlantica</i> sub sp. <i>Mutica</i> (Fisch. & C.A. Mey.) Rech. F. | Anacardiaceae |
| ۳۹۵۰۱۱۷         | 31°44' 51" N<br>54°10'32" E | مینایی فر      | <i>Ammi majus</i> L.                                                          |               |
| ۳۹۵۰۳۵۸         | 31°39' 13" N<br>53°49'57" E | مینایی فر      | <i>Echinophora platyloba</i> D.C.                                             |               |
| ۳۹۵۰۳۵۹         | 31°39' 30" N<br>53°52'60" E | مینایی فر      | <i>Eryngium Bungei</i> Boiss.                                                 | Apiaceae      |
| ۳۹۵۰۳۶۱         | 31°39' 29" N<br>53°52'35" E | مینایی فر      | <i>Falcaria vulgaris</i> Bernh                                                |               |
| ۳۹۵۰۳۶۰         | 31°35' 17" N<br>54°06'24" E | شیخعلیشاهی     | <i>Ferula assa-foetida</i> L.                                                 |               |
| ۳۹۵۰۳۷۱         | 31°34' 39" N<br>54°06'07" E | فلاح و عسکری   | <i>Heracleum persicum</i> Desf. ex Fischer.                                   |               |
| ۳۹۵۰۲۲۳         | 31°45' 37" N<br>53°52'12" E | مینایی فر      | <i>Achillea santolinoides</i> subsp. <i>wilhelmsii</i> (K.Koch) Greuter       |               |
| ۳۹۵۰۳۶۲         | 31°35' 17" N<br>54°09'19" E | حدادی          | <i>Artemisia persica</i> Boiss.                                               |               |
| ۳۹۵۰۳۶۹         | 31°38' 58" N<br>53°52'32" E | زارع           | <i>Artemisia scoparia</i> Waldst & Kit.                                       |               |
| ۳۹۵۰۳۷۰         | 31°39' 06" N<br>53°52'15" E | زارع           | <i>Artemisia sieberi</i> Besser.                                              |               |
| ۳۹۵۰۱۱۶         | 31°43' 23" N<br>54°06'47" E | مینایی فر      | <i>Carthamus oxyacantha</i> M.B.                                              |               |
| ۳۹۵۰۲۲۴         | 31°38' 45" N<br>54°09'51" E | مینایی فر      | <i>Centaurea depressa</i> M.B.                                                | Asteraceae    |
| ۳۹۵۰۲۲۵         | 31°38' 42" N<br>54°09'36" E | مینایی فر      | <i>Cichorium intybus</i> L.                                                   |               |
| ۳۹۵۰۲۲۶         | 31°38' 17" N<br>54°08'34" E | مینایی فر      | <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.                                             |               |
| ۳۹۵۰۲۲۷         | 31°37' 15" N<br>54°07'25" E | مینایی فر      | <i>Echinops Aucheri</i> Boiss.                                                |               |
| ۳۹۵۰۲۲۸         | 31°37' 15" N<br>54°07'25" E | مینایی فر      | <i>Echinop ilicifolius</i> Bung.                                              |               |
| ۳۹۵۰۲۲۹         | 31°36' 15" N<br>54°06'42" E | مینایی فر      | <i>Echinops jesdiantus</i> Boiss. & Buhse.                                    |               |

|                 |                                                                |                   |                             |         |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------|
|                 | <i>Gundelia tourenfortii</i> L.                                | مینایی فر         | 31°34' 58" N<br>54°05'21" E | ۳۹۵۰۲۳۰ |
|                 | <i>Hertia intermedia</i> (Boiss.) O. Kuntze                    | مینایی فر و مرادی | 31°38' 59" N<br>53°52'33" E | ۳۹۵۰۲۳۱ |
|                 | <i>Lactuca serriola</i> L.                                     | مینایی فر         | 31°45' 29" N<br>54°51'55" E | ۳۹۵۰۱۲۲ |
|                 | <i>Sonchus maritimus</i> L.                                    | محمدی و دهقانی    | 31°35' 18" N<br>54°09'39" E | ۳۹۵۰۳۸۸ |
|                 | <i>Sonchus oleraceus</i> L.                                    | زارع بیدکی        | 31°37' 05" N<br>54°10'19" E | ۳۹۴۰۱۲۱ |
|                 | <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Schultz – Bip.                | برزگر             | 31°34' 43" N<br>54°05'53" E | ۳۹۵۰۳۶۸ |
|                 | <i>Tanacetum persicum</i> (Boiss.) Mozaff.                     | برزگر             | 31°34' 41" N<br>54°06'13" E | ۳۹۵۰۳۶۷ |
|                 | <i>Taraxacum microcephaloides</i> Van.Soset.                   | مینایی فر         | 31°44' 04" N<br>54°06'08" E | ۳۹۵۰۱۱۸ |
|                 | <i>Xanthium strumarium</i> L.                                  | مینایی فر         | 31°43' 39" N<br>54°06'22" E | ۳۹۵۰۱۱۹ |
| Berberidaceae   | <i>Berberis integririma</i> Bunge.                             | سیف الهی          | 31°35' 42" N<br>54°05'12" E | ۳۹۵۰۳۶۳ |
| Boraginaceae    | <i>Anchusa italica</i> Retz.                                   | مینایی فر         | 31°29' 38" N<br>54°08'06" E | ۳۹۵۰۲۵۶ |
|                 | <i>Asperugo procumbens</i> L.                                  | شیخعلیشاهی        | 31°38' 04" N<br>54°00'17" E | ۳۹۵۰۲۳۲ |
|                 | <i>Allysum minus</i> var. <i>micranthum</i> (C.A.Mey.) Dudley. | مینایی فر         | 31°30' 07" N<br>54°07'28" E | ۳۹۵۰۲۳۳ |
|                 | <i>Cardaria Draba</i> (L.) Desv.                               | مینایی فر         | 31°43' 58" N<br>54°54'16" E | ۳۹۵۰۲۳۴ |
|                 | <i>Descurinia Sophia</i> (L.) Webb & Berth.                    | مینایی فر         | 31°39' 50" N<br>54°49'41" E | ۳۹۵۰۲۳۵ |
| Brassicaceae    | <i>Eruca sativa</i> Miller.                                    | مینایی فر         | 31°40' 09" N<br>54°50'24" E | ۳۹۵۰۲۳۶ |
|                 | <i>Lepidium latifolium</i> L.                                  | زارعی             | 31°45' 42" N<br>54°51'12" E | ۳۹۵۰۳۶۴ |
|                 | <i>Raphanus Raphanistrum</i> L.                                | فلاح              | 31°36' 55" N<br>54°05'12" E | ۳۹۵۰۲۳۷ |
|                 | <i>Sisymbrium irio</i> L.                                      | فلاح              | 31°35' 08" N<br>54°07'25" E | ۳۹۵۰۳۶۵ |
|                 | <i>Sisymbrium Loeselii</i> L.                                  | فلاح              | 31°34' 50" N<br>54°06'55" E | ۳۹۵۰۳۶۶ |
| Capparidaceae   | <i>Capparis spinosa</i> L.                                     | مینایی فر         | 31°39' 07" N<br>53°52'39" E | ۳۹۵۰۱۲۰ |
| Caryophyllaceae | <i>Acanthophyllum glandulsum</i> Bunge.                        | دهقان             | 31°37' 22" N<br>54°05'28" E | ۳۹۵۰۳۷۲ |
|                 | <i>Acanthophyllum squarrosum</i> Boiss.                        | دهقان             | 31°37' 19" N<br>54°05'51" E | ۳۹۵۰۳۷۳ |
| Convolvulaceae  | <i>Convolvulus arvensis</i> L.                                 | دهقانپور          | 31°44' 02" N<br>54°06'23" E | ۳۹۵۰۳۷۴ |
| Cucurbitaceae   | <i>Bryonia aspera</i> stev. ex Ledeb.                          | برزگر             | 31°34' 42" N<br>54°06'10" E | ۳۹۵۰۲۵۵ |
| Cuscutaceae     | <i>Cuscuta europaea</i> L.                                     | دهقانپور          | 31°37' 22" N<br>54°05'28" E | ۳۹۵۰۳۷۵ |
| Cyperaceae      | <i>Cyperus rotundus</i> L.                                     | دهقانپور          | 31°45' 37" N<br>53°51'32" E | ۳۹۵۰۳۷۶ |
| Ephedraceae     | <i>Ephedra procera</i> Fish & Mey                              | فلاح              | 31°35' 03" N<br>54°02'45" E | ۳۹۵۰۴۹۱ |
| Euphorbiaceae   | <i>Ephorbia helioscopia</i> L.                                 | مینایی فر         | 31°39' 07" N<br>54°00'08" E | ۳۹۵۰۳۷۷ |
|                 | <i>Ricinus communis</i> L.                                     | دهقانپور          | 31°43' 58" N<br>54°09'44" E | ۳۹۵۰۴۹۸ |
|                 | <i>Alhagi persarum</i> Boiss & Buhse.                          | مینایی فر         | 31°44' 26" N<br>54°02'45" E | ۳۹۵۰۳۷۹ |
| Fabaceae        | <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.                                   | مینایی فر         | 31°44' 20" N<br>54°11'25" E | ۳۹۵۰۳۸۰ |
|                 | <i>Melilotus indicus</i> (L.) All.                             | مینایی فر         | 31°44' 22" N<br>54°11'45" E | ۳۹۵۰۳۸۱ |

|                  |                                                           |            |                             |          |
|------------------|-----------------------------------------------------------|------------|-----------------------------|----------|
| Fumariaceae      | <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.                   | مینایی فر  | 31°35' 39" N<br>54°07'25" E | ۳۹۶۰۲۱۶  |
|                  | <i>Trifolium pratense</i> L.                              | مینایی فر  | 31°44' 26" N<br>54°02'45" E | ۳۹۵۰۳۸۲  |
|                  | <i>Fumaria parviflora</i> Lam.                            | مینایی فر  | 31°45' 31" N<br>53°51'18" E | ۳۹۵۰۲۵۳  |
|                  | <i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.                         | مینایی فر  | 31°43' 57" N<br>53°53'32" E | ۳۹۵۰۲۵۴  |
|                  | <i>Marrubium vulgare</i> L.                               | مینایی فر  | 31°30' 51" N<br>53°08'05" E | ۳۹۵۰۲۳۸  |
|                  | <i>Menthe longifolia</i> (L.) Hudson.                     | مینایی فر  | 31°34' 49" N<br>54°09'52" E | ۳۹۵۰۲۳۹  |
|                  | <i>Nepeta Persica</i> Boiss.                              | سالاری     | 31°46' 18" N<br>53°48'31" E | ۳۹۵۰۲۵۲  |
| Lamiaceae        | <i>Salvia sclarea</i> L.                                  | شیخعلیشاهی | 31°35' 44" N<br>54°07'42" E | ۳۹۵۰۲۴۶  |
|                  | <i>Satureja bachtiarica</i> Bunge.                        | فلاح       | 31°34' 03" N<br>54°09'12" E | ۳۹۵۰۴۹۵  |
|                  | <i>Teucrium chamaedrys</i> L.                             | دهشیری     | 31°34' 28" N<br>54°09'29" E | ۳۹۵۰۴۹۷  |
|                  | <i>Teucrium polium</i> L.                                 | زارعی      | 31°34' 13" N<br>54°07'41" E | ۳۹۵۰۴۹۶  |
|                  | <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss & Hohen.                  | زارع       | 31°47' 15" N<br>53°46'32" E | ۳۹۵۰۴۹۸  |
|                  | <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.                      | مینایی فر  | 31°35' 13" N<br>54°09'11" E | ۳۹۵۰۲۴۰  |
|                  | <i>Ziziphora tenuior</i> L.                               | مینایی فر  | 31°35' 07" N<br>54°08'51" E | ۳۹۵۰۲۴۱  |
| Liliaceae        | <i>Allium schoenoprasum</i> L.                            | یوسفی      | 31°32' 22" N<br>54°07'47" E | ۳۹۵۰۲۴۸  |
|                  | <i>Colchicum Persicum</i> Baker.                          | مینایی فر  | 31°39' 18" N<br>53°51'05" E | ۳۹۵۰۲۴۹  |
| Loranthaceae     | <i>Viscum album</i> L.                                    | مینایی فر  | 31°45' 28" N<br>53°51'37" E | ۳۹۵۱۲۱۳۱ |
| Malvaceae        | <i>Alcea fasciculiflora</i> Zohary.                       | مینایی فر  | 31°39' 18" N<br>53°51'05" E | ۳۹۵۰۲۴۲  |
|                  | <i>Malva sylvestris</i> L.                                | مینایی فر  | 31°38' 17" N<br>54°09'51" E | ۳۹۵۰۲۴۳  |
| Papaveraceae     | <i>Glaucium oxylobum</i> Boiss & Buhse.                   | مینایی فر  | 31°39' 30" N<br>54°10'45" E | ۳۹۵۰۲۵۷  |
|                  | <i>Papaver tenuifolium</i> Boiss & Honen.                 | مینایی فر  | 31°39' 34" N<br>54°10'41" E | ۳۹۵۰۱۱۵  |
| Plantaginaceae   | <i>Plantago lanceolata</i> L.                             | مینایی فر  | 31°38' 44" N<br>54°00'53" E | ۳۹۵۰۴۹۳  |
|                  | <i>Plantago major</i> L.                                  | مینایی فر  | 31°38' 39" N<br>54°00'55" E | ۳۹۵۰۴۹۴  |
| Poaceae          | <i>Arundo Dunax</i> L.                                    | زارع       | 31°44' 46" N<br>53°53'03" E | ۳۹۵۰۳۸۶  |
|                  | <i>Avena sativa</i> L.                                    | مینایی فر  | 31°43' 48" N<br>54°06'43" E | ۳۹۶۰۱۰۷  |
|                  | <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.                        | مینایی فر  | 31°43' 38" N<br>54°06'41" E | ۳۹۶۰۱۰۸  |
|                  | <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex steud.        | مینایی فر  | 31°39' 05" N<br>53°52'34" E | ۳۹۶۰۲۱۲  |
|                  | <i>Polygonum avicular</i> L.                              | مینایی فر  | 31°39' 49" N<br>53°50'26" E | ۳۹۵۰۲۴۴  |
| Polygonaceae     | <i>Rumex obtusifolius</i> L.                              | مینایی فر  | 31°38' 03" N<br>53°59'10" E | ۳۹۵۰۲۴۵  |
| Portulacaceae    | <i>Portulaca oleracea</i> L.                              | دهقانی     | 31°43' 26" N<br>54°06'23" E | ۳۹۶۰۲۱۵  |
| Resedaceae       | <i>Reseda lutea</i> L.                                    | مینایی فر  | 31°38' 35" N<br>54°01'06" E | ۳۹۵۱۲۱۲۹ |
| Rubiaceae        | <i>Gallium aparine</i> L.                                 | مینایی فر  | 31°37' 59" N<br>54°10'11" E | ۳۹۵۱۲۱۳۰ |
| Scrophulariaceae | <i>Verbascum songaricum</i> schrenk ex fisch and C.A.May. | مینایی فر  | 31°39' 28" N<br>53°53'02" E | ۳۹۵۰۴۹۲  |

|                |                                                      |              |                             |         |
|----------------|------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------|---------|
|                | <i>Veronica Anagallis-aquatica</i> L.                | دهقان        | 31°34' 42" N<br>54°06'08" E | ۳۹۶۰۲۱۳ |
|                | <i>Datura innoxia</i> Miller.                        | فلاح و برزگر | 31°38' 58" N<br>54°00'21" E | ۳۹۵۰۳۸۵ |
|                | <i>Datura stramonium</i> L.                          | مینایی فر    | 31°43' 47" N<br>54°10'06" E | ۳۹۵۰۲۵۰ |
|                | <i>Solanum nigrum</i> L.                             | مینایی فر    | 31°31' 39" N<br>53°50'31" E | ۳۹۵۰۲۵۱ |
| Verbenaceae    | <i>Vitex pseudo-negundo</i> (Hausskh.)<br>Hand. -Mzt | مینایی فر    | 31°39' 30" N<br>53°52'29" E | ۳۹۶۰۲۱۴ |
|                | <i>Peganum harmala</i> L.                            | مینایی فر    | 31°39' 43" N<br>53°53'04" E | ۳۹۵۰۳۸۳ |
| Zygophyllaceae | <i>Tribulus terrestris</i> L.                        | مینایی فر    | 31°41' 05" N<br>53°54'35" E | ۳۹۵۰۳۸۴ |

\*کلیه‌ی نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه پیام نور نگهداری می‌شوند.

## جدول ۲: فهرست، گیاهان دارویی خودرو، شناسایی شده در شهرستان تفت (طبقه‌بندی شده بر اساس روش کرانکوئیست)

| تیره          | نام علمی                                                                   | نام فارسی - نام بومی    | کروتیپ  | فرم | استفاده دارویی                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------|-----|-------------------------------------------------------------------|
|               |                                                                            |                         |         |     | رویشی                                                             |
| Adiantaceae   | <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.                                        | پرسیاوشان -<br>پرسیوشوم | IT      | Ge  | همه اندام های گیاه:<br>ضدسرفه، خلط آور، ضد<br>سرماخوری            |
| Anacardiaceae | <i>Pistacia atlantica subsp. Mutica</i><br>(Fischer & C.A.Meyer) Rech.fil. | پنه - پسته کوهی         | IT      | Ph  | صمغ: مدر                                                          |
|               | <i>Ammi majus</i> L.                                                       | آمی - شود هرز           | IT      | Th  | دانه: مدر، ضد حساسیت                                              |
|               | <i>Echinophora platyloba</i> DC.                                           | خوشاریزه -<br>خوشاریزه  | IT      | He  | ساقه و برگ: خوشبو کننده و<br>طعم دهنده، ضد رفلاکس<br>معدة         |
|               | <i>Eryngium Bungei</i> Boiss.                                              | زول - زول               | IT      | He  | اندام های هوایی: بصورت عرق<br>گیری شده کاهش دهنده قند<br>خون      |
| Apiaceae      | <i>Ferula assa-foetida</i> L.                                              | آنگوزه - آنگوزه         | IT      | Ch  | صمغ: ضد عفونی کننده و ضد<br>نفخ، مسهل، مقوی رحم                   |
|               | <i>Falcaria vulgaris</i> Bernh.                                            | غاز ایاغی - پاکلاغ      | IT,M,ES | Th  | برگ و ریشه: رفع اسهال و<br>سوزش ادرار                             |
|               | <i>Heracleum persicum</i> Desf. ex Fischer.                                | گلپر - گلپر             | IT,ES   | He  | بذر: تقویت کننده معده و ضد<br>نفخ                                 |
|               | <i>Achillea santolinoides subsp. wilhelmsii</i><br>(K.Koch) Greuter        | بومادران - بومادران     | IT      | Th  | بخش های هوایی: خلط آور،<br>باد شکن، درمان ضعف<br>گوارش، قاعده آور |
|               | <i>Artemisia persica</i> Boiss.                                            | درمنه ایرانی - درنه     | IT      | Ch  | برگها و سرشاخه ها: مقوی،<br>تب بر و ضد کرم                        |
|               | <i>Artemisia scoparia</i> Waldst & Kit.                                    | درمنه شرقی - درنه       | IT      | Ch  | اندامهای هوایی: ضد انگل                                           |
|               | <i>Artemisia sieberi</i> Bess.                                             | درمنه - درنه            | IT      | Ch  | سرشاخه های گلدار: کرم کش                                          |
|               | <i>Carthamus oxyacantha</i> M.Bieb.                                        | گلرنگ وحشی -<br>خارخرون | IT      | Th  | بذر: روغن بذر در درمان<br>زخمها و خارش پوستی                      |
|               | <i>Centaurea depressa</i> M.Bieb.                                          | گل گندم - گل گندم       | Cosm    | Th  | گل ها: تقویت کننده اعصاب و<br>بذر ها: ملین                        |
|               | <i>Cichorium intybus</i> L.                                                | کاسنی - کاسنی           | Cosm    | He  | ریشه و برگ: صفرا بر،<br>ضدالتهاب، درمان زردی                      |
|               | <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.                                          | کنگر صحرا - کنگر        | IT      | He  | ریشه: مقوی معده و اشتها آور                                       |
|               | <i>Echinops Aucheri</i> Boiss.                                             | شکر تیغال - شکر<br>تغال | IT      | He  | اندام های هوایی: مدر و معرق                                       |
| Asteraceae    | <i>Echinops ilicifolius</i> Bung.                                          | شکر تیغال - شکر<br>تغال | IT      | He  | لانه ساخته شده توسط گونه<br>ای سوسک از شیرابه این گیاه            |

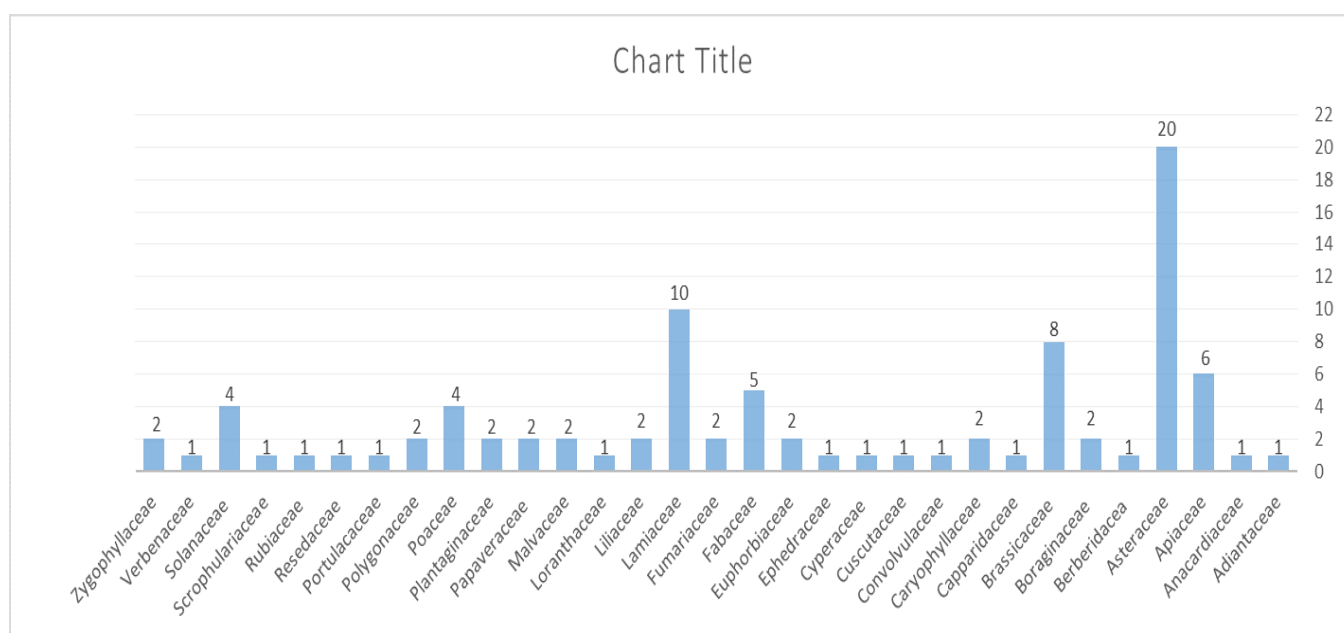
|                 |                                                                   |                            |               |    |                                                                      |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------|----|----------------------------------------------------------------------|
|                 | <i>Echinops jesdianus</i> Boiss. & Buhse.                         | شکر تیغال - شکر<br>تغال    | IT            | He | و خاک، برای درمان سرفه<br>علایم سرماخوردگی استفاده<br>می شود         |
|                 | <i>Gundelia tourenfortii</i> L.                                   | کنگر علوفه ای -<br>کنگر    | IT, M         | He | برگ های تازه و ساقه های<br>جوان: مغذی                                |
|                 | <i>Hertia intermedia</i> Kuntze                                   | کرقیچ - کرقیچ              | IT            | Ch | برگ ها: درمان کورک، تاول و<br>جوش                                    |
|                 | <i>Lactuca serriola</i> L.                                        | کاهو خاردار - کاهو<br>وحشی | IT, M, ES     | Th | برگ ها: خواب آور، ضد سرفه،<br>تب بر، مسکن                            |
|                 | <i>Sonchus maritimus</i> L.                                       | شیر تیغک -<br>خارشیره      | IT, M, ES     | Ch | اندام های هوایی و ریشه:<br>درمان سرفه های سخت و<br>آسم               |
|                 | <i>Sonchus oleraceus</i> L.                                       | شیر تیغک -<br>خارشیره      | IT, M, ES     | Ch | همه اندام های گیاه: مقوی و<br>تب بر، مسکن، ملین، درمان<br>زردی       |
|                 | <i>Tanacetum parthenium</i> Sch.Bip.                              | مخلصه - بابونه             | IT, ES        | He | اندام های هوایی: تب بر، قاعده<br>آور، آسان کننده زایمان              |
|                 | <i>Tanacetum persicum</i> (Boiss.) Mozaff.                        | مخلصه - بابونه             | IT            | He | اندام های هوایی: تب بر، قاعده<br>آور، آسان کننده زایمان              |
|                 | <i>Taraxacum microcephaloides</i> Soset.                          | قاصدک - خبر کشک            | IT            | He | اندام های هوایی: مدر، محرک<br>اشتها                                  |
|                 | <i>Xanthium strumarium</i> L.                                     | زردپنه - چسبونک            | Cosm          | Th | بذر، برگ، ساقه و ریشه: درمان<br>زخمها، دمل ها                        |
| Berberidaceae   | <i>Berberis integririma</i> Bunge.                                | زرشک - زرشک<br>کوهی        | Es            | Ph | بذر: صفرا بر، تقویت کبد و<br>کلیه - پوست ریشه و ساقه:<br>درمان پیوست |
| Boraginaceae    | <i>Anchusa italica</i> Retz.                                      | گاوزبان - گاوزبون          | IT, M         | Th | همه اندام های گیاه: مدر،<br>ضدسرفه، خلط آور                          |
|                 | <i>Asperugo procumbens</i> L.                                     | چسبک - چسبونک              | IT            | Th | ساقه و بذر: آرام بخش و<br>خواب آور                                   |
|                 | <i>Allysum minus</i> var. <i>micranthum</i><br>(C.A.Mey.) Dudley. | قدومه - قدومه              | IT            | Th | بذر: ضد سرفه، خلط آور،<br>بازکننده صدا                               |
|                 | <i>Descurinia sophia</i> (L.) Prantl                              | خاکشیر - خاکشی             | IT, M, ES     | Th | بذر: متعادل کننده مزاج، ضد<br>عطش، مدر، تب بر و مقوی<br>معد          |
| Brassicaceae    | <i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav.                                  | منداب - مندو               | IT, M, ES, SS | Th | برگ: محرک و مقوی دستگاه<br>گوارش و قوای جنسی                         |
|                 | <i>Lepidium draba</i> L.                                          | ازمک - موچه                | Cosm          | Th | برگها: مدر و ملین                                                    |
|                 | <i>Lepidium latifolium</i> L.                                     | موچه - موچه                | IT, M, ES, SS | Th | برگ و ساقه: مغذی و تصفیه<br>کننده خون                                |
|                 | <i>Raphanus raphanistrum</i> L.                                   | ترب وحشی - ترب<br>وحشی     | IT, M, ES     | Th | ریشه: قی آور و به مقدار کم<br>اشتها آور                              |
|                 | <i>Sisymbrium irio</i> L.                                         | خاکشیر - خاکشی             | IT, M, ES, SS | Th | بذر: خلط آور و تب بر، ضد<br>عطش                                      |
|                 | <i>Sisymbrium Loeselii</i> L.                                     | خاکشیر - خاکشی             | IT, M, ES, SS | Th | برگ: خلط آور و تب بر، ضد<br>عطش                                      |
| Capparidaceae   | <i>Capparis spinosa</i> L.                                        | کبر - کور                  | IT, M, ES, SS | He | ریشه و بذر: مدر، قابض،<br>تقویت کننده کبد و طحال                     |
| Caryophyllaceae | <i>Acanthophyllum glandulsum</i> Bunge ex<br>Boiss.               | چوبک - چوبک                | IT            | Ch | ریشه: شوینده و ضد عفونی<br>کننده                                     |
|                 | <i>Acanthophyllum squarrosum</i> Boiss.                           | چوبک زبر - چوبوک           | IT            | Ch | ریشه: شوینده و ضد عفونی<br>کننده                                     |
| Convolvulaceae  | <i>Convolvulus arvensis</i> L.                                    | پیچک - علف<br>پیچوک        | Cosm          | He | ریشه: مسهل و مدر                                                     |
| Cuscutaceae     | <i>Cuscuta europaea</i> L.                                        | سس - سس                    | Cosm          | Th | تمامی اندام های گیاه: مسهل                                           |

|               |                                                      |                            |         |    |                                                                   |
|---------------|------------------------------------------------------|----------------------------|---------|----|-------------------------------------------------------------------|
| Cyperaceae    | <i>Cyperus rotundus</i> L.                           | آبیار سلام -<br>اوبیارسلام | Cosm    | Ge | غده زیر زمینی: تقویت کننده دستگاه گوارش، قاعده آور، ضد کرم و قایض |
| Ephedraceae   | <i>Ephedra major subsp. procera</i> (C.A.Mey.) Bornm | ارمک - ریش بز              | IT      | Ph | اندام های هوایی گیاه: ضد آسم و تنگی نفس، تب بر و ضد سرفه          |
| Euphorbiaceae | <i>Euphorbia helioscopia</i> L.                      | فرفیون - شیرسگ             | IT      | Th | بذر، بخشهای هوایی و شیرابه: مسهل، دافع کرم، درمان زگیل            |
|               | <i>Ricinus communis</i> L.                           | کرچک - پیدانجیل            | IT      | Th | دانه: مسهل و ضد عفونی کننده (این گیاه سمی است)                    |
|               | <i>Alhagi maurorum</i> Medik.                        | خارشتر - خارشتر            | IT      | Ch | بخش های هوایی و صمغ: ملین، ضد زردی نوزاد، دافع سنگ کلیه           |
| Fabaceae      | <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.                         | شیرین بیان - متک           | IT,M,ES | Ch | ریشه: ضد زخم معده، مدر و خلط آور، درمان زخم های سالک              |
|               | <i>Melilotus indicus</i> (L.) All.                   | یونجه زرد - یونجه          | IT,M,ES | He | سرشاخه گلدار - برگ ها و دانه: ضد دل درد و اسهال کودکان            |
|               | <i>Melilotus officinalis</i> Pall.                   | زرد                        | IT,M,ES | Th | ضد نفخ، ضد آسم، بواسیر، رماتیسم و دردهای یانسی                    |
|               | <i>Trifolium pratense</i> L.                         | شبدر سرخ - شبدر            | IT,M,ES | He | گل ها: قایض، خلط آور، آرامبخش، درمان زخم و سوختگی                 |
|               | <i>Fumaria parviflora</i> Lam.                       | شاهتره گل ریز - شاتره      | IT      | Th | اندام های هوایی و ریشه: اشتها آور، ضد کرم، ضد دلیپچه، تب بر       |
| Fumariaceae   | <i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.                    | شاهتره ایرانی - شاتره      | IT      | Th | اندام های هوایی و ریشه: اشتها آور، ضد کرم، ضد دلیپچه، تب بر       |
| Lamiaceae     | <i>Marrubium vulgare</i> L.                          | فراسیون - افنان            | IT,ES   | He | بخش های هوایی: اشتهاآور، خلط آور، تب بر، قاعده آور، بادشکن        |
|               | <i>Mentha longifolia</i> Hud.                        | پودنه - پودونه             | IT,ES   | Ge | بخش های هوایی: بادشکن، مقوی معده و ضد عفونی کننده                 |
|               | <i>Nepeta persica</i> Boiss.                         | پونه سای ایرانی - زوفا     | IT      | He | سرشاخه های گلدار: آرامبخش، ضد عفونی کننده، خلط آور و بادشکن       |
|               | <i>Salvia sclarea</i> L.                             | مریم گلی - استوخودوس       | IT      | He | برگ و سرشاخه گلدار: قاعده آور، ضد عفونی، آرامبخش، مقوی معده       |
|               | <i>Satureja bachtiarica</i> Bunge.                   | مرزه بختیاری - مرزه کوهی   | IT      | He | سرشاخه: ضد اسهال، بادشکن، ضد عفونی کننده                          |
|               | <i>Teucrium chamaedrys</i> L.                        | مریم نخودی - نعنا کوهی     | IT      | He | سرشاخه های گلدار: مقوی معده، ضد روماتیسم، درمان زخمهای چرکین      |
|               | <i>Teucrium polium</i> L.                            | مریم نخودی - کلیپوره       | IT,M    | He | برگ ها و سرشاخه های گلدار: ضد دیابت و تب بر                       |
|               | <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss & Hohen.             | آویشن - اوشن               | IT      | He | سرشاخه های گلدار: ضد نفخ، مقوی سیستم گوارشی و آرامبخش             |
|               | <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.                 | کاکوتی کوهی - کاکوتی       | IT      | Th | بخش های هوایی: مسکن، مقوی قلب و معده                              |

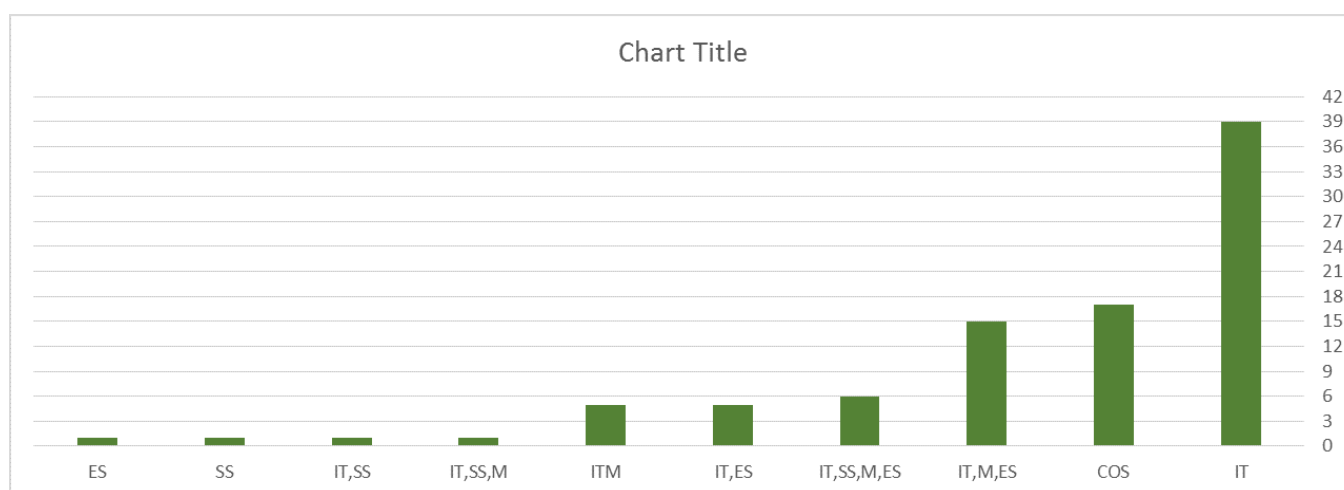
|                  |  |                                                        |         |    |                                                                        |
|------------------|--|--------------------------------------------------------|---------|----|------------------------------------------------------------------------|
|                  |  | کاکوتی - کاکوتی                                        | IT      | Th | بخش های هوایی: ضد تب،<br>باد شکن، خلط آور، مقوی<br>قلب و معده          |
|                  |  | <i>Ziziphora tenuior</i> L.                            |         |    |                                                                        |
|                  |  | پیاز کوهی - پیازک                                      | IT      | Ge | پیاز: ضد کرم و شیره تازه<br>برگ: ضد عفونی کننده                        |
| Liliaceae        |  | گل حسرت -<br>سورنچون                                   | IT      | Ge | پیاز: ضد نفرس (این گیاه<br>سمی است)                                    |
|                  |  | <i>Colchicum Persicum</i> Baker.                       |         |    |                                                                        |
| Loranthaceae     |  | دارواش - کشمش<br>کولی                                  | Cosm    | Ph | برگ: باز کننده دمل (این گیاه<br>سمی است)                               |
|                  |  | <i>Viscum album</i> L.                                 |         |    |                                                                        |
|                  |  | ختمی - ختمی                                            | IT,M    | Th | گل ها: ضد سرفه، خلط آور،<br>نرم کننده پوست و ضد<br>حساسیت پوستی        |
| Malvaceae        |  | پنیرک - گل خواصی                                       | IT,M,ES | Th | گل و برگ: ملین، خلط آور،<br>ضد خارش، گزیدگی حشرات<br>و التهاب مهبل     |
|                  |  | <i>Alcea fasciculiflora</i> Zohary.                    |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Malva sylvestris</i> L.                             |         |    |                                                                        |
| Papaveraceae     |  | شقایق زرد - شقایق<br>زرد                               | IT      | Th | اندام های هوایی و بذر: ضد<br>سرفه                                      |
|                  |  | <i>Glaucium oxylobum</i> Boiss & Buhse.                |         |    |                                                                        |
|                  |  | شقایق - شقایق                                          | IT,M,ES | Th | بذر: مسکن                                                              |
|                  |  | <i>Papaver tenuifolium</i> Boiss & Hohen.              |         |    |                                                                        |
|                  |  | باهنگ سرنیزه ای -<br>بارهنگ                            | Cosm    | He | دانه و برگ: مسهل، مدر و<br>درمان زخم و نیش حشرات                       |
| Plantaginaceae   |  | بارهنگ بزرگ - بارهنگ<br>پهن                            | Cosm    | He | دانه و برگ: ضد التهاب<br>دستگاه گوارش و یبوست،<br>بندآورنده خون بواسیر |
|                  |  | <i>Plantago lanceolata</i> L.                          |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Plantago major</i> L.                               |         |    |                                                                        |
|                  |  | قمیش - نی                                              | SS, IT  | He | ریزوم: قاعده آور                                                       |
| Poaceae          |  | یولاف - جو دوسر                                        | Cosm    | Th | بذر: ضد التهاب، مقوی گوارش                                             |
|                  |  | <i>Arundo donax</i> L.                                 |         |    |                                                                        |
|                  |  | مرغ - مور                                              | Cosm    | Ge | همه اندام های گیاه: ضد جرب،<br>مدر                                     |
|                  |  | <i>Avena sativa</i> L.                                 |         |    |                                                                        |
|                  |  | نی - نی                                                | Cosm    | He | ریشه و ریزوم: مدر و معرق                                               |
|                  |  | <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.                     |         |    |                                                                        |
|                  |  | هفت بند - هفت بند                                      | IT,ES   | He | سرشاخه ها: بند آورنده خون،<br>ضد اسهال                                 |
| Polygonaceae     |  | ترشک - تروشوک                                          | IT,ES,M | Th | بخش های هوایی: تقویت لته<br>ها، بواسیر، اکژما، آبسه                    |
|                  |  | <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Steud.              |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Polygonum aviculare</i> L.                          |         |    |                                                                        |
|                  |  | خرقه - قلفه                                            | Cosm    | Th | برگ و ساقه: اشتها آور و مدر،<br>ضد تاول، کورک، میخچه                   |
| Portulacaceae    |  | ورث - ورث                                              | IT,M    | Th | ریشه و سرشاخه: مقوی معده،<br>دافع کرم                                  |
| Resedaceae       |  | بی تی راخ - علف<br>جوو                                 | IT,ES,M | Th | بخش های هوایی: مدر، ضد<br>عفونی کننده، کاهنده فشار<br>خون              |
|                  |  | <i>Portulaca oleracea</i> L.                           |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Reseda lutea</i> L.                                 |         |    |                                                                        |
|                  |  | گل ماهور - خرگوشی                                      | IT      | He | گل ها: خلط آور، درمان کننده<br>بواسیر                                  |
| Scrophulariaceae |  | سیزاب آبی - سیزاب                                      | Cosm    | He | اندام های هوایی: قایض و مدر                                            |
|                  |  | <i>Verbascum songaricum</i> Schrenk                    |         |    |                                                                        |
|                  |  | تاتوره - شیپوری                                        | IT,ES,M | Th | برگ: ضد درد، بی حس<br>کننده، خلط آور، ضد سرفه<br>(این گیاه سمی است)    |
|                  |  | <i>Veronica Anagallis-aquatica</i> L.                  |         |    |                                                                        |
|                  |  | تاتوره - شیپوری                                        | Cosm    | Th | برگ و دانه: مسکن، مخدر،<br>خواب آور، ضد آسم (این گیاه<br>سمی است)      |
| Solanaceae       |  | تاجریزی - انگور توره                                   | Cosm    | Th | اندام های هوایی: ضد درد، ضد<br>تب، مدر، مسهل و کاهش<br>فشار خون        |
|                  |  | <i>Datura innoxia</i> Mill.                            |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Datura stramonium</i> L.                            |         |    |                                                                        |
|                  |  | پنج انگشت - بنگرو                                      | SS      | Ph | برگ، بذر و ریشه: شیر افزا،<br>تنظیم کننده قاعدگی، تب بر<br>و خلط آور   |
| Verbenaceae      |  | <i>Solanum nigrum</i> L.                               |         |    |                                                                        |
|                  |  | <i>Vitex pseudo-negundo</i> (Hausskn.) Hand.<br>-Mazz. |         |    |                                                                        |

|                |                               |                  |            |    |                                                             |
|----------------|-------------------------------|------------------|------------|----|-------------------------------------------------------------|
| Zygophyllaceae | <i>Peganum harmala</i> L.     | اسپند- اسفند     | IT,ES,M,SS | He | دانه: ضد آسم ضد تشنج، ضد قاعدگی و قی آور (این گیاه سمی است) |
|                | <i>Tribulus terrestris</i> L. | خارخاسک- خارخسوک | IT,SS,M    | Th | بذر: مدر، مسکن، ضد سنگ کلیه                                 |

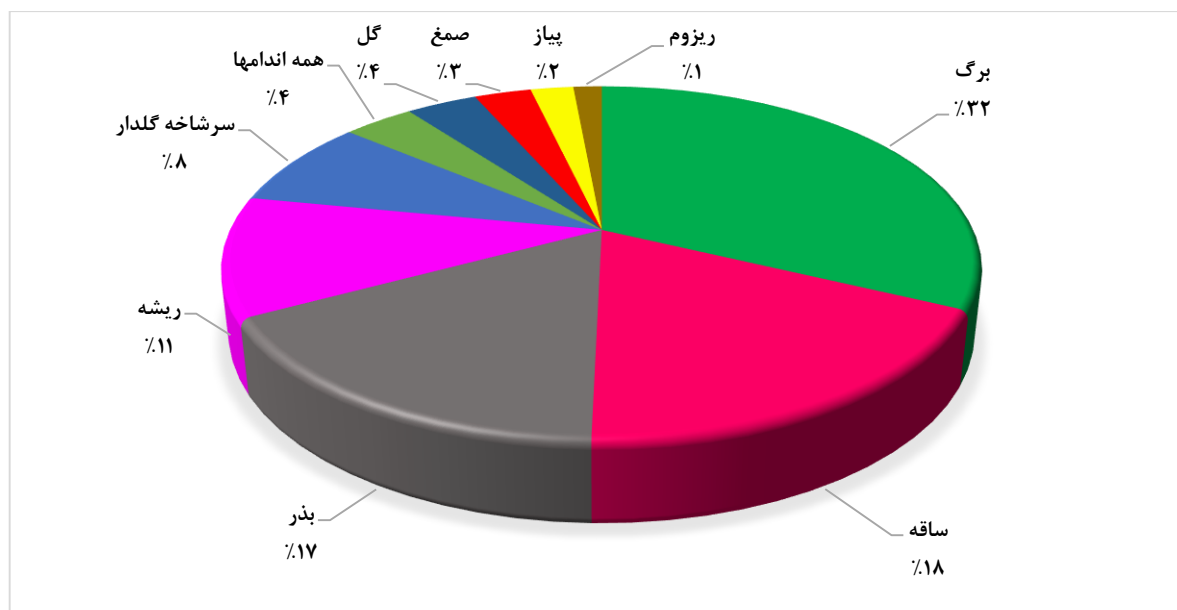
شکل زیستی: PH: فانروفیت، CH: کاموفیت، He: همی کریپتوفیت، Ge: ژئوفیت و Th: تروفیت (IT: ایرانی و تورانی، SS: صحرا-سندی، M: مدیترانه ای، ES: اروپا-سیبری، Cosm: همه جازی)



شکل ۲: نام تیره‌های گیاهی براساس تعداد گونه‌های دارویی خودرو جمع‌آوری شده از شهرستان تفت



شکل ۳: کروتیپ گونه‌های دارویی شناسایی شده در شهرستان تفت (IT: ایرانی و تورانی، SS: صحرا-سندی، M: مدیترانه ای، ES: اروپا-سیبری، Cos: همه جازی)



شکل ۴: اندام‌های گیاهی که بیشترین استفاده دارویی را بر اساس این تحقیق داشته‌اند

## بحث و نتیجه‌گیری

شهرستان تفت به دلیل کوهستانی بودن و قرار داشتن مرتفع‌ترین قله‌ی استان یزد (شیرکوه ۴۰۷۵ متر) در آن یکی از شهرستان‌های بیابانی استان کویری یزد محسوب می‌گردد، حضور گونه‌های همی‌کریپتوفیت به‌عنوان دومین شکل زیستی غالب در این منطقه (بیش از ۳۴ درصد گونه‌ها) نیز موید کوهستانی بودن این منطقه است (Archibold, 1995). هرچند میانگین ارتفاع و دریافت نزولات جوی این شهرستان نسبت به میانگین استان یزد بالاتر است اما حاکمیت اقلیم خشک در این منطقه نیز مشهود می‌باشد، از بین ۹۱ گونه دارویی خودرو در شهرستان تفت، حدود ۵ درصد دارای شکل رویشی درختی و درختچه‌ای هستند، در حالی که فرم رویشی علفی، فرم غالب در این منطقه می‌باشد (بیش از ۴۰ درصد)، در منطقه‌ی مورد بررسی، غالبیت گونه‌های تروفیت و اقلیت گونه‌های فانروفیت بازتابی از شرایط اقلیمی خشک شهرستان می‌باشد. تروفیت‌ها با به‌کارگیری مکانیسم گریز از خشکی شرایطی را فراهم می‌نمایند که دوره‌ی خشکی را در خواب و به شکل بذر سپری نمایند و در صورت وجود شرایط رطوبتی مناسب، چرخه زندگی خود را تکمیل کنند. عواملی از قبیل میزان متغیر بارش در منطقه و شرایط نامساعد چرای نیز در فراوانی بروز این فرم رویشی مؤثرند (Solinska et al., 1997). تفت اگرچه در اقلیم خشکی واقع شده است اما به‌واسطه وجود ارتفاعات کوهستانی دارای تنوع قابل توجهی از گونه‌های گیاهان دارویی است. در این منطقه عواملی مانند وسعت زیاد، تنوع رویشگاهی، بارندگی نسبتاً مناسب و شرایط کوهستانی منطقه سبب پیدایش تنوع فلوریستیکی نسبتاً غنی شده است. غالب بودن فرم زیستی تروفیت و همی‌کریپتوفیت که مجموعاً حدود ۷۵ درصد کل گونه‌ها می‌باشند، نشان دهنده‌ی پوشش گیاهی مناطق کوهستانی ایران مرکزی است و غالب بودن عناصر ایران و تورانی نیز مؤید این مطلب است (Wendelbo and Hedge, 1970).

در بین گیاهان جمع‌آوری شده تیره‌ی کاسنیان (Asteraceae) بیشترین گونه را به خود اختصاص داده است به نحوی که بیش از یک پنجم گونه‌های شناسایی شده متعلق به این تیره است، دلیل فراوانی گونه‌های تیره‌ی کاسنیان می‌تواند به دلیل برخی از ویژگی‌های ریخت شناسی، تشریحی و فیزیولوژی خاص این تیره، مانند تولید بذرها و فراوان و کوچک با قدرت انتشار بالا، وجود خار و متابولیت‌های ثانویه بازدارنده چرای دام و همچنین سازش‌پذیری بالای گونه‌های این تیره با شرایط کوهستانی باشد (Nouri, 2018). از طرف دیگر فشار ناشی از بهره‌برداری و چرای بیش از حد دام به دلیل حضور روستاهای متعدد در این منطقه نیز می‌تواند از دیگر دلایل فراوانی نسبی گیاهان تیره‌ی کاسنی در این منطقه باشد.

تیره‌ی نعنائیان از لحاظ تعداد گونه دومین تیره پس از تیره‌ی کاسنیان می‌باشد. حضور گونه‌های تیره‌ی Lamiaceae می‌تواند به دلیل تحمل گونه‌های این تیره در مقابل گرما و خشکی باشد و همچنین گیاهان تیره‌ی نعنائیان به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه معطر کمتر مورد توجه دام ها قرار می‌گیرند (Dehshiri, 2016).

تحقیقات در زمینه‌ی جغرافیای گیاهان دارویی یک منطقه برای ارزیابی و شناسایی گیاهان دارویی به عنوان ذخایر ملی ضروری می‌باشد. تنوع گونه‌های دارویی خودرو در شهرستان تفت که در منطقه‌ای بیابانی واقع شده است نشان می‌دهد که چه پتانسیل عظیمی در مورد منابع دارویی گیاهی در کل کشور وجود دارد، کما اینکه اخیراً به دلیل توجه به دانش بومی، مقالات منتشر شده‌ی مختلفی در مورد دانش بومی و گیاهان دارویی مناطق مختلف کشور به چشم می‌خورد (Hajalimohammadi et al., 2006 ; Zolfaghari et al., 2012; Akbarzadeh et al., 2010; Heydari et al., 2014; Razavi, 2014; Ramezani and Minaifar, 2016; Forouzeh et al., 2014)، در این مقاله به گیاهان دارویی کشت شده اشاره‌ای نشده است تا صرفاً منابع دارویی بکر شهرستان که بدون دخالت و حمایت انسانی رشد می‌نمایند مشخص گردد. گیاهان بومی هر منطقه، ذخایر وراثتی آن منطقه محسوب می‌شوند و به دلیل دارا بودن صفات مطلوبی چون مقاومت به آفات و بیماری‌ها و سازگاری به شرایط محیطی به عنوان ذخیره‌های دارویی و غذایی قابل اتکا به حساب می‌آیند. استفاده از ظرفیت‌های بومی و خدادادی به صورت اصولی و حساب شده می‌تواند زمینه ساز دستیابی به توسعه‌ی پایدار در همه‌ی زمینه‌ها از جمله دارو و درمان باشد (Emadi & Amiri, 2002)، در این خصوص جمع‌آوری اطلاعات مربوط به دانش بومی گیاهی و طب سنتی محلی اقوام مختلف ایران از اهمیت خاصی برخوردار است.

## نتیجه‌گیری کلی

شاخه‌های مختلف علم زیست‌شناسی حتی گرایش‌هایی که به ظاهر صرفاً به صورت علوم محض می‌باشند مانند سیستماتیک گیاهی می‌توانند در مباحث کاربردی و برنامه‌ریزی‌های کلان اقتصادی و زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرند. این پژوهش و پژوهش‌های دیگری از این دست، علاوه بر نشان دادن اهمیت رشته گیاه‌شناسی در پژوهش‌های کاربردی، زمینه

ساز ورود منابع دارویی سنتی به عرصه‌ی درمان هستند و همچنین می‌توانند منجر به برنامه‌ریزی صحیح زیست‌محیطی شوند تا با رعایت اصول برداشت از منابع طبیعی علاوه بر حفاظت از تنوع گونه‌های گیاهی زمینه بهره‌برداری پایدار از این منابع ارزشمند فراهم آید.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاران موسسه‌ی تحقیقات جنگلها و مراتع که در شناسایی برخی از گونه‌ها همکاری نموده‌اند قدردانی می‌شود. از دانشجویان زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور یزد و تفت نیز که در جمع‌آوری گونه‌ها و تکمیل اطلاعات بومی و محلی همکاری داشته‌اند قدردانی می‌گردد، همچنین از همه‌ی مردم محلی شهرستان که در تکمیل پرسشنامه و مصاحبه‌ی حضوری همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند خصوصاً مرحوم جناب آقای سید حسین مرامی قدردانی می‌گردد.

## منابع

- Akbarzadeh, A., Jahandand, K., Hemmati, A. and Khanjani Shiraz, B. (2010). Medicinal plants of Gilan province and their parts. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 26 (3): 326-347.
- Amiri Ardakani, M. & Shahwali, M. (1999). *Fundamentals, Concepts and Studies of Indigenous Knowledge*. First Edition, Rural and Development Publications, 148 pages.
- Archibold, O.W. (1995). *Ecology of world vegetation*. Chapman and Hall INC 510 pp. London.
- Asri, Y., Jalili, A., and Asadi, M. (2000). An Attitude Toward Flora of Turan Biosphere Reserve. *Journal of Research and Construction*, 13 (2): 4-19.
- Assadi, M., Maassoumi A.A., Khatamsaz, M. and Mozaffarian. V. (1990 – 2013) *Flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangeland Press. Tehran., Vol 1 – 77, 5730 pp.
- Baghestani, N. (2009). Final report of research project, collection and identification Plants of Yazd province and formation a Herbarium. Agricultural and Resource research center of Yazd. 130pp.
- Baghestani, N., Mirvakili. S.M. and Zarezazeh, A. (2010). Introduction of flora, biological form and geographical distribution of steppe range plants (Case study: watershed of khod-Newk in Yazd province). *Journal of Renewable Natural Resources Research*. 1 (2): 43-58.
- Dashatkian, K. and Baghestani, N. (2001). Recognition plan of ecological regions and plant types of Yazd province, Research institute of forests and rangelands. 240 pp.
- Davis, P.H. (1965 – 1985). *Flora of Turkey*. Edinburgh University Press, Edinburgh., Vol. 1-11. 7789 pp.
- Dehshiri, M.M., Safikhani, K. and Mostafavi, H. (2016). part of Alvand Mountain in Hamadan province. *Iranian Plant Biology*, 8 (30): 89-104.
- Emadi, M. H. and Abbasi, A. (1998). Indigenous knowledge in the sustainable development of villages: a long-term perspective in a new area. *Village and Development*, 2 (1): 17-54.

- Emadi, M. H. and Amiri Ardakani, M. (2002). The combination of indigenous knowledge and formal knowledge is a necessity in establishing sustainable agricultural development. *Agricultural Economics and Development*, 10 (37): 11-36.
- Entekhabi, H., Moghimi, H. and Qannadi F. (2008). Atlas of natural appearance of Yazd province. General Department of Environmental Protection of Yazd province. 40 pp.
- Forouzeh, M., Heshmati, A. And Barani, H. (2014), Collection and study of selected car tires from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Provinces. *Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran*, 5 (2): 131-139.
- Ghahraman, A. (1978). Flore de l'Iran. Société nationale pour la conservation des ressources naturelles et de l'environnement humain avec la collaboration de l'Université de Tehran. Vol. 1 - 26. 3250 pp.
- Gouchani, R. (2004). Study of flora and plant communities in Khezrabad region in Yazd province. Payamenoor University. Department of Biolnogy. Tehran. Iran. 117 pp.
- Haj Ali Mohammadi, H., Taghavi Shirazi, M. and the victim, A. (2016). Atlas of Iranian Herbalists. Quarterly Journal of Social Sciences, Allameh Tabatabai University, 13 (34-35): 175-198
- Hawkes, J.G., Maxted, N. and Loyd, B.V. (2000). The ex situ Conservation of Plant Genetic Resources. Dordrecht. 250 pp .Kluwer
- Heydari, A., Zali, H. and Heydari, Q. (2014). Demographic plant of Nimarstag summer area, Amol city (Mazandaran province). *Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran*, 5 (4): 330-339.
- Irannejad parizi, M.H. (2012). Shirkuh mountain plant diversity with emphasis on species with conservation value. The first national conference on environmental protection and planning. 22 February. Hamadan. Iran
- Jones, S.B. and Luch Singer A. E. Plant systematic -Principles and Methods of Classification- Translated By Rahiminejad, M.R. Center of Academic Publication. Tehran, Iran. 2004, 343 pp.
- Komarov V.L. and Shishkin B.K. (1963 – 1974). Flora of the U.S.S.R, (Translated, by Landau N, Lavoott R, Blake Z and Behrman L.). Keter and IPST press, Jerusalem., Vol. 1 — 32. 19500 pp.
- Leonard, J. and White, F. (1991). Phytogeographical links between Africa and Southwest Asia. *Flora et Vegetatio Mundi*, 9: 229–246.
- Martin, G.J. (1995). *Ethnobotany: A Method Manual*. Chapman and Hall 268 Pp. London.
- Mozaffarian V. A. (1998). Dictionary of Iranian Plant names. Farhang Moaser Publishing. Tehran. 750 pp.
- Mozaffarian, W., Mirokili, S. M. and Barzegari, Gh. (2000), Flora of Yazd Province. First Edition, Yazd Publishing Institute, 636 pages
- Nouri, S., Sepehri, A., Barani, H. And Fadai, F. (2018). Investigation of flora, biological form and vegetative elements of plants in the transition region of Iran's and Turanian and desert-Indigenous vegetation areas in Sistan and Baluchestan province. *Journal of Plant Research*, 31 (2): 373-381.
- Komarov, V.L. and Shishkin, B.K. (1963-1974). Flora of the U.S.S.R, (Translated by Landau N., Lavoott R., Blake Z. and Behrman L.). Keter and IPST press, Jerusalem. Vol. 1 – 32. 19500 pp.
- Qalasimoud, Sh., Jalili, Sh. and Khaniki, P. (2006). Introducing the flora and biodiversity of plants in the western region. *Research and Construction*, 19 (4): 65-73.
- Ramezani, M. and Minaifar, A.A. (2016). Ethnobotany of medicinal plants in Fasa city. *Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran*, 7 (2): 221-231.

- Raunkiaer, C. (1934). The life forms of plants and statistical plant geography. Being the collected papers of C. Raunkiaer. Clarendon Press 632 Pp. Oxford.
- Razavi, M. (2014). An overview of the native knowledge of botany, its history and importance. Social Sciences Quarterly, 67: 125-152.
- Solinska, G. B., Namura, O. A. and Symonides, E. (1997). Long term dynamics of a relict forest in an urban area, *Floristica et Geobotanica*, 42: 423-479.
- Takhtajan, A. (1986). Floristic regions of the world. University of California Press 544 Pp. Berkley.
- Talebi, A., Vazifehdoost, M., Talebi S. and Fatehzadeh, A. (2010). Investigating the possibility of determining the physical properties of snow with use of optical and microwave satellite data (Case study of Shirkuh Yazd). Regional Research Institute. 112 pp.
- Wendelbo, P. and Hedge, I. C. (1970) Patterns of Distribution and Endemism in Iran. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh, 36: 441-464.
- Yari, R., Heshmati, Gh. And Rafiei, H. (2018). Introduction of flora, biological form, geographical distribution and identification of plant protection status (Case study: summer pastures of four gardens of Golestan province). *Journal of Plant Research*, 31 (3): 842-853.
- Zareei, G.R., Assadi, M. and Masomi A. A. (2008). Introduction of flora, biological form, habitat and geographical distribution of Abarkooh desert plants in Yazd province. *Journal of Research and Construction*. 21(4): 28-38.
- Zarezadeh, A. (2000). Final report of research project, collection, identification and domestication of medical plants in Yazd province. . Agricultural and Resource research center of Yazd. 433 pp.
- Zarezadeh, A., Mirvakili, S. M. and Mirhosseini A. (2007). Introduction of flora, biological form and distribution geographical plants of Dam gahan mehriz valley plants (Yazd province). *Journal of Research and Construction*. 74: 129-137.
- Zohary, M. (1973) *Geobotanical foundations of the Middle East*, 2 vols, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Amsterdam.
- Zolfaghari, A., Adeli, A., Mozaffarian, V., Babaei, S. And Habibi Bi Balani, AH. (2012), Identification of Medicinal Plants in Arasbaran Region and Study of Indigenous Knowledge of Local People (Case Study: Arasbaran Forests, Mardan Ghom Chai watershed). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28 (3): 534-550.

## **Floristic, Life forms, Chorotype and Ethnobotanical studies of medicinal plants in the Taft County (Iran)**

**A.A. Minaeifar<sup>1\*</sup>, S. Dehghanpour Farashah<sup>2</sup>, S.S. Mirzadeh Vaghefi<sup>3</sup>**

**Received:2020.6.19**

**Accepted:2020.7.26**

### **Abstract**

There are many medicinal plants in Iran that are not endangered but their indigenous knowledge is rapidly eroding due to lifestyle changes. In this paper, along with the study of flora, Life forms, and chorotype of medicinal plants of Taft County, tried to collect and record the ethnobotanical knowledge of medicinal plants in this county. After determining the different habitat areas of the county, collecting of medicinal plants and indigenous knowledge about the medicinal properties of tgem were done. According to the results of this study, 91 species of medicinal plants were identified. The Asteraceae, Lamiaceae, and Brassicaceae families, have the most species frequency. species belonging to the Iran- Turanian region show most frequency and The most common life form was therophytes. Ethnobotanical knowledge shows these species are mainly used to treat digestive, respiratory and urinary problems. One of the basic prerequisites for achieving sustainable development is the proper management of natural areas exploitations. it is important to identify species of medicinal plants in order to prevent them from being extincted. This research, In addition to demonstrate the importance of botany in applied research, can also leads to the proper environmental planning and the basis for sustainable exploitation of natural resources.

**Keywords:** Applied botany, Biological form, Sustainable development

---

1-Assistant Professor, Department of Biology. Payame Noor University, Tehran, Iran

\*(Corresponding author: aaminaeifar@pnu.ac.ir)

2-Assistant Professor, Department of Agriculture. Payame Noor University, Tehran, Iran

3-Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

## تأثیر تیمار نانو ذرات نقره بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گلرنگ

عارفه محمدی سنجانی<sup>۱</sup>، منیر حسین زاده نمین<sup>۲\*</sup>، منا صراحی نوبر<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶

### چکیده

نانو ذرات نقره در زمینه‌های مختلف از جمله در صنعت، پزشکی، بیوتکنولوژی و کشاورزی به‌طور وسیعی به‌کار گرفته می‌شوند. از این رو ورود این مواد به محیط‌زیست به‌عنوان مواد زائد امری اجتناب ناپذیر است که می‌تواند اثرات منفی بر محیط زیست و از جمله بر گیاهان داشته باشد. در این مطالعه تأثیر دو غلظت ۵ و ۷ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره بر گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در شرایط در شیشه مورد بررسی قرار گرفت. وجود نانوذرات نقره درصد جوانه زنی بذرها را از حدود ۷۰ درصد در نمونه شاهد تا ۹۰ درصد در نمونه‌های تحت تیمار نانونقره افزایش داد. همچنین میزان زی‌توده‌ی خشک گیاه در نمونه‌های تحت تیمار ۵ به میزان ۱۲ درصد افزایش و در تیمار ۷ پی‌پی‌ام نانو نقره به مقدار ۲۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد که این مسئله نشان می‌دهد سطح آستانه سمیت نانونقره در سطحی بین دو غلظت مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. افزایش ضخامت لایه‌ی اپیدرم و همچنین افزایش طول تارهای کشنده و حذف سلول‌های اسکلرانشیمی در ریشه‌های تحت تیمار نانو ذرات نقره در مطالعات آناتومیکی گیاه گلرنگ مشاهده شد. نتایج همچنین حاکی از کاهش قابل توجه محتوای پروتئین در ریشه و القای MDA و پروتئین در اندام هوایی تحت تیمار با نانو ذرات نقره می‌باشد که می‌تواند نشانه‌ای از القای استرس اکسیداتیو در اندام هوایی این گیاه تحت تیمار باشد. علاوه بر این نانو ذرات نقره باعث القای محتوای کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاه گلرنگ شده است.

**واژه‌های کلیدی:** استرس اکسیداتیو، پروتئین، کاروتنوئید، کلروفیل، گلرنگ، نانوذرات نقره

### مقدمه

ذراتی با اندازه ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به عنوان نانوذرات طبقه‌بندی می‌شوند. نانو ذرات از یک‌سو به دلیل پتانسیل بالقوه ای که در تقویت رشد گیاهان و همچنین حفاظت از آنها بازی می‌کنند؛ توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Nair et al., 2010; Khot et al., 2012). از سوی دیگر استفاده‌ی گسترده از نانوذرات در صنایع مختلف ورود آنها را به منابع آبی کشاورزی

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: (Monirhosseinzade@yahoo.com)

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

ناگزیر کرده است و اثرات منفی آنها بر تولید انواع مختلف محصولات کشاورزی نیز ممکن است اتفاق بیافتد. نانوذرات نقره که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند، یکی از رایج‌ترین نانوذرات مورد استفاده در مطالعات زیست‌شناسی می‌باشند. مطالعات نشان داده است؛ تیمار نانو ذرات نقره در دانه‌های برنج آلوده با عامل بیماری زای *Gibberella fujicuroi* منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای علائم بیماری شده است (Jo et al., 2015). همچنین القای رشد و وضعیت آنتی اکسیدانی گیاهچه‌های *Brassica juncea* L تحت این تیمار گزارش شده است (Sharma et al., 2012). از سوی دیگر مهار رشد گیاه، کاهش سرعت جوانه‌زنی بذر، افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی و ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در بسیاری از گیاهان هنگام در معرض قرار گرفتن با نانوذرات نقره گزارش شده است (Lee et al., 2012; Patlolla et al., 2012; Oukarroum et al., 2013; Cui et al., 2014).

در کشاورزی، از طریق اسپری کردن نانوذرات نقره در گیاهانی از قبیل مرکبات، غلات و درختان زیتون افزایش جوانه‌زنی دانه، افزایش پارامترهای رشد (مانند افزایش حجم زی‌توده، طولیل شدن ریشه‌ها و افزایش اندازه‌ی برگ)، ایجاد میوه‌های بزرگتر و مقاومت در برابر بیماری‌ها مشاهده شده است (Pulit et al., 2011). Gruyer و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات نقره می‌توانند اثر مثبت یا منفی روی افزایش طول ریشه داشته باشند. آنها گزارش کردند که طول ریشه در جو افزایش و در کاهو مهار شده است. در پژوهشی که توسط Homaee و Ehsanpour در سال (۲۰۱۵) انجام شده است نشان داده شد که میزان کلروفیل به صورت معنی‌داری در غلظت‌های پایین نانوذرات نقره افزایش و در سطح بالاتر این تیمار کاهش داشته است. پژوهشگران با بررسی اثر نانو ذرات نقره بر رشد گیاه *Bacopa monnieri* در شرایط کشت هیدروپونیک دریافتند که تیمار نانوذرات نقره تاثیر قابل توجهی بر جوانه زنی، القای سنتز پروتئین، کربوهیدرات، کاهش محتویات فنل کل و فعالیت کاتالاز و پراکسیداز نشان می‌دهد (Krishnaraj et al., 2012). نانوذرات نقره مشخصات رشدی گیاه (طول ساقه و ریشه و سطح برگ) و محتویات کلروفیل، کربوهیدرات و پروتئین را در گیاهان خردل برگی، لوبیا و ذرت افزایش داده است (Salama, 2012; Sharma et al., 2012).

گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) گیاه یک‌ساله علفی و یکی از گونه‌های زراعی تیره کاسنی (Asteraceae) است (Foruzn, 1999). این گیاه به منظور تولید روغن و رنگ خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای خواص دارویی زیادی شامل خاصیت مسهلی، مسکن، معرق، ضد التهاب، تحلیل برنده تومور، قاعده‌آور، محرک جنسی و موثر در فعالیت‌های تولیدمثلی می‌باشد (مروتی و همکاران، ۱۳۸۹).

در تحقیق حاضر اثر تیمار نانو ذرات نقره بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تشریحی و فیزیولوژیکی گیاه گلرنگ بررسی شد؛ تا ضمن مطالعه‌ی اثرات آن بر نمو گیاه، درک بهتری از پاسخ گیاه به حضور این ترکیبات در محیط طبیعی به عنوان عامل تنش به‌دست آید و پتانسیل استفاده از آن به عنوان بهبود دهنده‌ی رشد بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه بذر و محیط کشت گیاه گلرنگ

بذر گیاه گلرنگ (رقم محلی اصفهان) از شهرستان فرمهین استان مرکزی تهیه شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. بذر ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱٪ غوطه‌ور و سپس با آب مقطر سترون ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. کلیه مراحل در زیر هود لامینار انجام شد (Talat et al., 2009). محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) با دو غلظت ۵ppm و ۷ppm نانو ذرات نقره با مشخصات اندازه ذرات ۲۰ تا ۳۰ نانومتر (شرکت پیام آوران نانو فناوری فردانگر) و شاهد بدون نانو ذرات تهیه گردید. برای هر تیمار ۲۰ پتری دیش و در هر پتری دیش ۵ بذر استفاده شد. پتری دیش ها در اتاق کشت و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای  $25 \pm ^\circ\text{C}$  نگهداری شدند. تیمار با نانونقره در دو نوبت و به فاصله یک ماه با عمل واکشت انجام شد. دانه‌رست‌ها بعد از ۶۰ روز برداشت شدند و برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد و نیز آنالیزهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

### بررسی آناتومی

نمونه‌ها ابتدا در مخلوط آب، گلیسرین و الکل اتانول ۹۶٪ با نسبت‌های برابر تثبیت شدند. سپس با روش دستی و به کمک تیغ از ساقه و ریشه مقطع عرضی تهیه شد. نمونه‌ها برای رنگ آمیزی به ترتیب ۶۰ دقیقه در آب ژاول، یک دقیقه در آب اسید ۴٪، یک دقیقه در سبز متیل و در خاتمه ۶۰ دقیقه در داخل کارمن زاجی قرار گرفتند؛ در فاصله‌ی هر مرحله مقاطع تهیه شده با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از پایان رنگ آمیزی، نمونه‌ها با میکروسکوپ (Olympus BX51) بررسی شدند سپس بهترین نمونه انتخاب و با دوربین Olympus DP12 عکس‌برداری شد. کلیه‌ی اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نرم افزار Image tools (version 3) انجام شد.

### مطالعه‌ی محتوای پروتئین

برای استخراج پروتئین، یک گرم از بافت تر گیاه با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=7.2$  محتوی ۱ میلی مولار EDTA در دمای ۴ درجه سلیسیوس در هاون سرد، ساییده و هموژنیزه شد. در خاتمه محلول هموژنیزه شده با استفاده از میکروسانتریفیوژ (spectrafuge مدل ۲۴) در دمای ۴ درجه سلیسیوس در 12236 g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور حاصل بعد از تعیین حجم، برای تعیین محتوای پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. محتوای پروتئین کل به روش برادفورد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CE1021 در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین مقدار گردید (Bradford, 1976).

### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها و سنجش پرولین آزاد

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) ۰/۱ درصد استخراج شد. سپس عصاره‌ی به‌دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مرحله بعدی به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل از سانتریفوژ مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیو باریتوریک اسید اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس حمام آب گرم قرار داده شد و نمونه‌ها به سرعت سرد گردید. بعد از این مراحل مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و ۱۳۰۰۰ 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 میلی‌مول بر سانتی متر) براساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید

برای سنجش پرولین آزاد، مقدار ۰/۱ گرم از نمونه‌ی خشک تا یکنواخت شدن کامل با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ درون هاون به مدت ۵ دقیقه ساییده شد؛ سپس با ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ و حجم روشناور تعیین گردید. ۲ میلی‌لیتر از روشناور حاصل، ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال در لوله آزمایش به مدت یک ساعت در حمام آب جوش (دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) قرار گرفت؛ پس از طی این زمان برای رسیدن محلول به دمای محیط بلافاصله به حمام یخ انتقال یافت و واکنش در این مرحله پایان یافت. سپس به هر لوله میزان ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شد؛ سپس جذب فاز فوقانی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل E80K در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. (Bates et al., 1973).

### سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و تغییرات فلورسانس کلروفیل

برای سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی ۰/۲ گرم بافت تر برگ با کمک ۴ml استون ۸۰٪ ساییده شد و پس از سانتریفوژ، جذب روشناور در طول موج‌های ۶۶۳/۲ nm، ۶۴۶/۸ nm و ۴۷۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (مدل CE1021) خوانده شد. میزان رنگیزه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر برحسب mg/g وزن تر محاسبه شد (Lichthenthale, 1987).

$$\text{Chl a} = (12/25 A_{663/2} - 2/79 A_{646/8})$$

$$\text{Chl b} = (12/21 A_{646/8} - 5/1 A_{663/2})$$

$$\text{Chl T} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{670} - 1/8 \text{Chl a} - 85/0.2 \text{Chl b})/198$$

Chl T = کلروفیل کل، C = کاروتنوئید، x = گزانتوفیل، c = کاروتن

اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس کلروفیل به کمک دستگاه PAM 2500 انجام شد. داده‌های حاصل برای محاسبه میزان فلورسانس کلروفیل استفاده شد.

### سنجش عناصر

یک گرم ماده خشک از هرتیمار با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ (۶۵٪) و ۵ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۷۰٪ هضم اسیدی شدند سپس محلول حاصل با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و با کمک کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد (Richard, 1954). برای سنجش عناصر سدیم و پتاسیم از دستگاه فلیم فتومتر JENWAY مدل PFP7 و عنصر فسفر از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل LE80K استفاده شد.

### آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS (Version 18) استفاده گردید. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین آنها، آنالیزها از طریق واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Duncan در سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism (ویرایش ۸) رسم گردید.

### نتایج

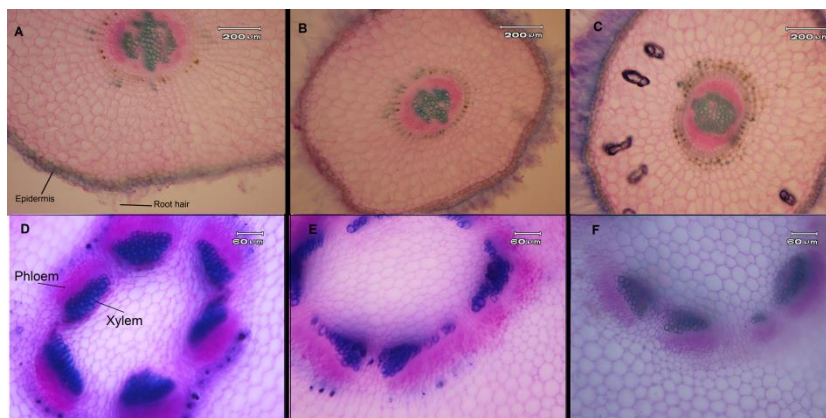
#### بررسی تغییرات مورفولوژیک و تشریحی

وجود نانوذرات نقره در محیط کشت درصد جوانه زنی بذرها را از حدود ۷۰ درصد در نمونه شاهد تا ۸۷ و ۹۰ درصد در نمونه‌های تحت تیمار ۵ و ۷ پی‌پی‌ام افزایش داد. همچنین میزان زی‌توده‌ی خشک گیاه در نمونه‌های تحت تیمار ۵ پی‌پی‌ام به میزان ۱۲ درصد افزایش و در تیمار ۷ پی‌پی‌ام نانو نقره به مقدار ۲۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (محمدی و حسین زاده، ۱۳۹۳). بررسی‌های ریخت‌شناسی وضعیت تارهای کشنده مشخص کرد که طول تار کشنده در دو غلظت ۵ و ۷ ppm نانونقره نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار داشتند. همچنین ضخامت اپیدرم در غلظت ۵ پی‌پی‌ام افزایش غیر معنی‌دار ولی در غلظت ۷ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات آناتومیک ریشه گیاه گلرنگ تحت تیمار با نانو نقره. اعداد میانگین سه بار تکرار هستند. حروف غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $p \leq 0.05$ ).

| عناصر/تیمار                         | شاهد             | ۵ پی پی ام         | ۷ پی پی ام         |
|-------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| طول تار کشنده ( $\mu\text{m}$ )     | $58.26 \pm 1.05$ | $11.0 \pm 0.42$ b  | $18.43 \pm 0.58$ c |
| ضخامت اپیدرم ریشه ( $\mu\text{m}$ ) | $24.47 \pm 1.09$ | $26.63 \pm 0.14$ a | $31.54 \pm 1.13$ b |

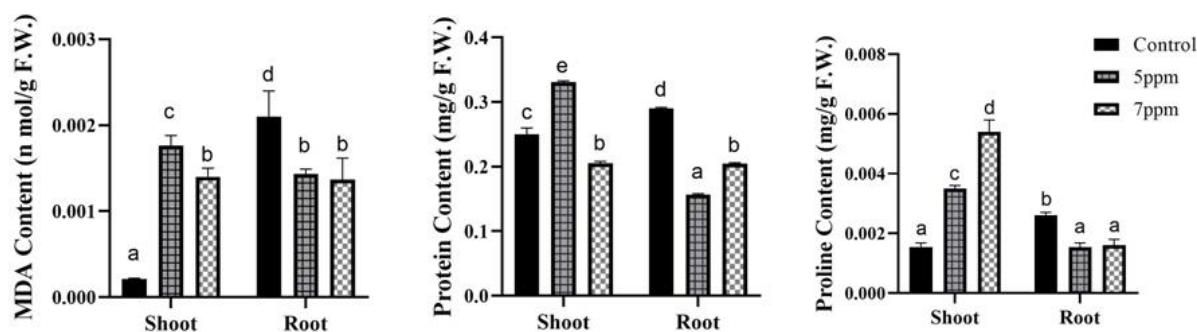
همراه با افزایش غلظت نانونقره ضخامت ناحیه گزیلمی ساقه به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد. همچنین لایه‌ی اسکلرانسیم در غلظت ۵ پی‌پی‌ام نانونقره نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش نشان داد و این لایه در غلظت ۷ ppm نانونقره به کلی آسیب دید و اثری از آن در برش‌گیری‌های عرضی مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱: نمایش مقطع عرضی ریشه (بالا) و ساقه (پایین) گیاه گلرنگ: (A و D) شاهد، (B و E) نمونه‌ی رویش یافته در غلظت ۵ ppm نانونقره (C و F) نمونه‌ی رویش یافته در غلظت ۷ ppm نانونقره

#### بررسی تغییرات بیوشیمیایی

بررسی میزان MDA در غلظت‌های به کار رفته نانو نقره نشان داد میزان پراکسیداسیون لیپید در ریشه نسبت به شاهد کاهش و در اندام هوایی به طرز معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). محتوای پروتئین در اندام هوایی گیاه گلرنگ در غلظت ۷ ppm



۵ نانونقره نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش و در غلظت ۷ ppm نانونقره نسبت به شاهد کاهش یافت. همچنین مقادیر پروتئین در ریشه در هر دو غلظت نانونقره نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (شکل ۲). میزان پرولین نیز در اندام هوایی گیاه در غلظت‌های ۵ و ۷ پی‌پی‌ام نانونقره در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد در حالی که این روند در ارتباط با ریشه کاهشی بود (شکل ۲).

شکل ۲: تغییرات محتوای MDA، پروتئین و اسید آمینه‌ی پرولین در گیاه گلرنگ در اندام هوایی و ریشه تحت تیمار با نانو نقره در دو غلظت ۵ و ۷ ppm. اعداد میانگین سه‌بار تکرار هستند. ستون‌هایی با حروف غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ( $p \leq 0.05$ ).

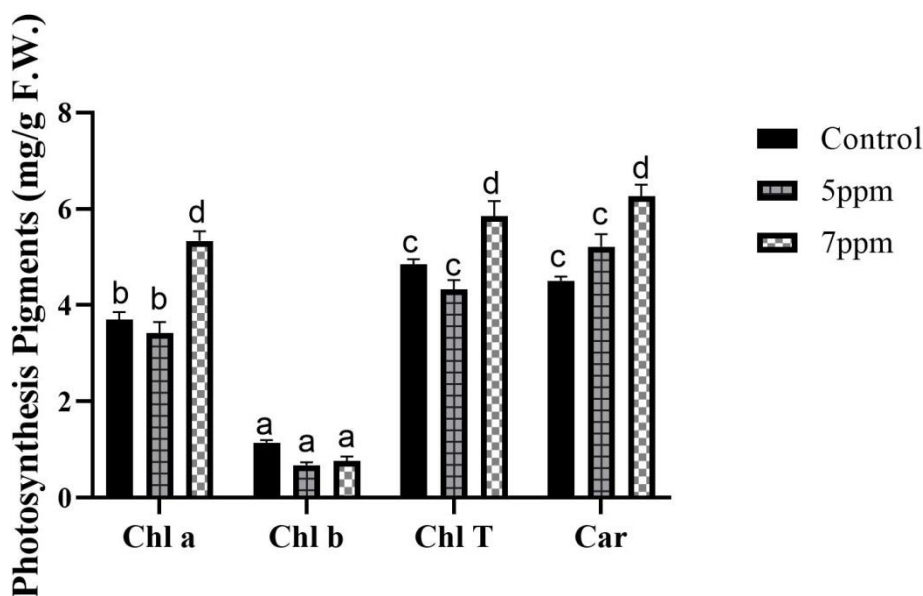
محتوای سدیم و فسفر تحت تیمار ۵ پی پی ام نانو نقره کاهش معنی داری نشان داد در حالی که محتوای این عناصر در غلظت ۷ پی پی ام نانو نقره به صورت غیر معنی داری افزایش یافت. نتایج همچنین نشان داد تیمار با نانو نقره در هر دو غلظت میزان عنصر پتاسیم را به صورت معنی داری کاهش داده است (جدول ۲).

جدول ۲: مقدار عناصر (mg/g D.W.) در اندام هوایی نمونه های شاهد و تحت تیمار ۵ و ۷ ppm نانو نقره. اعداد میانگین سه بار تکرار هستند. حروف غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ( $p \leq 0.05$ ).

| عنصر / تیمار | شاهد             | ۵ پی پی ام     | ۷ پی پی ام      |
|--------------|------------------|----------------|-----------------|
| سدیم         | $132.2 \pm 47.0$ | $48.0 \pm 0.2$ | $28.0 \pm 1.0$  |
| پتاسیم       | $237.0 \pm 15.0$ | $27.0 \pm 0.2$ | $182.0 \pm 0.3$ |
| فسفر         | $61.0 \pm 0.2$   | $12.0 \pm 0.1$ | $70.0 \pm 0.1$  |

### بررسی اثر نانو نقره بر فتوسنتز

به منظور بررسی اثر تیمار نانوذره ی نقره بر رنگیزه های فتوسنتزی، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در اندام هوایی گیاه مورد سنجش قرار گرفت. مقدار کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید تحت تیمار با نانو ذرات نقره با غلظت ۷ پی پی ام نسبت به شاهد روند افزایشی نشان داد؛ در حالی که غلظت ۵ پی پی ام نانو نقره منجر به کاهش غیر معنی دار در محتوای این ترکیبات گردید. محتوای کلروفیل b تحت تیمار با نانو نقره تغییر معنی داری نشان نداد (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات محتوای رنگیزه های فتوسنتزی در گیاه گلرنگ در اندام هوایی و ریشه ی تیمار با نانو نقره در دو غلظت ۵ و ۷ ppm. اعداد میانگین سه بار تکرار هستند. ستون هایی با حروف غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ( $p \leq 0.05$ ).

مقادیر  $F_o$  و  $F_m$  در تیمارهای ۵ و ۷ پی‌پی‌ام نانونقره نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. در حالی که  $F_v/F_m$  در هر دو غلظت نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳: فلورسانس کلروفیل در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار ۵ و ۷ ppm نانو نقره. اعداد میانگین سه بار تکرار هستند. حروف غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند ( $p \leq 0.05$ ).

| پارامترهای فتوسنتزی / تیمار | شاهد         | ۵ پی پی ام   | ۷ پی پی ام    |
|-----------------------------|--------------|--------------|---------------|
| Fo                          | 0/19±0/02 a  | 0/42±0/015 b | 0/52±0/02 c   |
| Fm                          | 0/38±0/03 a  | 1/39±0/03 b  | 1/68±0/03 c   |
| Fv/Fm                       | 0/74±0/017 a | 0/69±0/014 a | 0/69±0/0018 a |

## بحث

با در نظر گرفتن مقدار وزن خشک به عنوان فاکتور نهایی تاثیر گذاری نانوذرات نقره بر گیاه، می توان این جمع بندی را مطرح کرد که نانوذره نقره در غلظت ۵ پی پی ام اثر مثبت و در غلظت ۷ پی پی ام اثر منفی بر رشد گیاه داشته است، اما تعیین سطح آستانه سمیت نیازمند مطالعه بیشتر است. مطالعات پیشین نیز در گیاهان مختلف که در آنها گیاهان تحت تاثیر تیمارهای زیر ۱۰ پی پی ام نانونقره قرار داده شدند، اثرات منفی و مثبت بر رشد گزارش شده است که این موضوع بسته به غلظت تیمار و گونه ی گیاه پاسخ متفاوتی داده است (جدول ۴).

جدول ۴: اثر مثبت (+) و منفی (-) غلظت‌های  $\leq 10 \text{ ppm}$  نانوذرات نقره بر فاکتورهای مختلف در گیاهان مختلف

| منبع                                                                       | کلروفیل | تنش اکسایشی | پروکلین | محتوای پروتئین | تنش اکسایشی | MDA | افتای رشد ریشه | بیوماس | جوانه زنی                        |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|---------|----------------|-------------|-----|----------------|--------|----------------------------------|
| Al-Huqail <i>et al.</i> , 2018                                             | -       |             | +       | -              |             |     | -              | -      | <i>Lupinus termis</i> L.         |
| Vishwakarma <i>et al.</i> , 2017                                           |         | +           |         |                | +           |     |                | -      | <i>Brassica</i> sp.              |
| Abd-Alla <i>et al.</i> , 2016                                              |         |             |         |                |             |     |                | -      | <i>Vicia faba</i> L.             |
| Homaee and Ehsanpour 2016                                                  |         | +           |         |                | +           |     |                |        | <i>Solanum tuberosum</i> L       |
| Zou <i>et al.</i> , 2016                                                   | -       | +           |         | -              | +           | +   |                |        | <i>Wolffia globosa</i>           |
| Nair and Chung 2014, Kaveh <i>et al.</i> , 2013, Wang <i>et al.</i> , 2013 | -       |             |         |                | +           | +   | +              | +      | <i>Arabidopsis thaliana</i>      |
| Nair and Chung 2014b, Thuesombat <i>et al.</i> , 2014                      | -       |             | +       |                |             | +   |                | -      | <i>Oryza sativa</i> L.           |
| Jasim <i>et al.</i> , 2017                                                 |         |             |         |                |             |     | +              | +      | <i>Trigonella foenum-graecum</i> |

یعد از قرار گرفتن گیاهان در معرض نانو ذرات نقره تغییراتی در مورفولوژی گیاهان در معرض گزارش شده است . Krizkova و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند با افزایش مقدار نقره، چوب پنبه ای شدن اپیدرم در گیاه آفتابگردان افزایش می یابد. افزایش ضخامت اپیدرم که توسط برخی محققان تحت تیمار با فلزات سنگین گزارش شده است می تواند به علت تلاش گیاه در جلوگیری از جذب بیشتر فلزات سنگین باشد (Melo et al., 2007). چنانچه در مطالعه ای که توسط Al-Saadi و همکاران (۲۰۱۳) بر گیاه پتاژتون تحت تیمار با نقره در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر صورت گرفت نشان داده شده است که ضخامت لایه های اپیدرمی تحت تیمار افزایش یافته است. همچنین علت افزایش تعداد و طول تارهای کشنده ممکن است در ارتباط با نقش آنها در جذب آب و املاح باشد. با توجه به اینکه گیاه برای مقابله با تنش به مواد بیشتری نیاز دارد، این کار را با افزایش تارهای کشنده انجام می دهد.

یکی از سازوکارهای اصلی سمیت سلولی توسط نانوذرات نقره، تولید انواع فعال اکسیژن (ROS) است که منجر به تنش اکسیداتیو در سلول های گیاهی می شود (Tripathi et al., 2017, Nair et al., 2010). لیپیدها و پروتئین ها در شرایط تنش زا به علت وجود انواع فعال اکسیژن در معرض تخریب قرار دارند (Prasad, 1996). در این تحقیق افزایش محتوای مالون دی آلدئید در اندام هوایی تحت تیمار نانو نقره نشان از پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش اکسایشی حاصل از ذرات نانو نقره دارد (Parveen et al., 2014). گزارش هایی پیرامون القای تنش اکسایشی و افزایش محتوای مالون دی آلدئید در گیاهان مختلف وجود دارد که در جدول ۴ ذکر شده و در تطابق با یافته های پژوهش حاضر است.

پروتئین ها محصولات نهایی مسیرهای اطلاعاتی سلول هستند که در پاسخ به نیازهای سلول در شرایط مختلف ساخته می شوند و در صورت نیاز تخریب می گردند و یا میزان بیان آنها تغییر می یابد. در مطالعه ای که توسط رضوی زاده (۱۳۹۸) بر گیاه گوجه فرنگی تحت تیمار نانو نقره انجام گرفت، نشان داده شد که پروتئین کل محلول گیاه با افزایش غلظت نانو ذره در اندام هوایی افزایش و در ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (جدول ۴). کاهش محتوای پروتئین تحت تنش فلزات سنگین ممکن است به علت افزایش فعالیت پروتئاز (Palma et al., 2002)، تغییرات عملکردی و ساختاری ناشی از دناتوره شدن و قطعه قطعه شدن پروتئین ها و فعل و انفعال با باقیمانده های تیول پروتئین (John et al., 2009) باشد. همچنین افزایش محتوای پروتئین تحت تنش فلزات سنگین ممکن است در ارتباط با تحریک سنتز پروتئین های تنشی (Mishra et al., 2006, Verma et al., 2003) باشد.

به منظور جلوگیری از اثرات مخرب ناشی از ROS ها، مجموعه ای از مکانیسم های دفاعی پاداکسایشی در سلول های گیاهی فعال می شوند (Rico et al., 2015). اسمولیت های سازگار از جمله پرولین به عنوان سیستم پاداکسایشی غیر آنزیمی نقش مهمی در جاروب کردن انواع فعال اکسیژن بر عهده دارند (Chen & Murata, 2002). پرولین همچنین در تنظیم اسمزی،

بازسازی ساختار کلروفیل، حفاظت از آنزیم‌ها در برابر دنا توره شدن، پایدار کردن ماکرومولکول‌ها و اندامک‌ها دارای نقش می‌باشد (Rastgoo *et al.*, 2011). در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار مقدار پرولین در برگ گیاه گلرنگ تحت تیمار با نانو نقره مشاهده شد که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (جدول ۴).

آنالیز فلورسانس کلروفیل یکی از تکنیک‌های مورد استفاده در بررسی فیزیولوژی و اکوفیزیولوژی گیاه است (Maxwell *et al.*, 2000).

در حقیقت مقدار فلورسانس کلروفیل، سالم بودن غشای تیلاکوئیدی و کارایی نسبی انتقال الکترون را از فتوسیستم II به فتوسیستم I نشان می‌دهد. نسبت  $F_v/F_m$  نشان دهنده‌ی هرگونه آسیب به فتوسیستم II می‌باشد. فلورسانس کلروفیل به طور مستقیم به فعالیت کلروفیل در مرکز واکنش فتوسیستم‌ها ارتباط دارد و وجود هرگونه آشفستگی، منجر به کاهش حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم در شرایط سازگار با تاریکی ( $F_v/F_m$ ) می‌گردد. شاخص  $F_v/F_m$  میزان تولید کوانتومی ذاتی PSII را اندازه گیری می‌کند و به همین ترتیب باید برای تولید حداکثر کوانتومی با مبادله‌ی گاز فتوسنتز ارتباط داشته باشد و در صورت بروز تنش سبب کاهش کارایی انتقال الکترون می‌شود (Tezara *et al.*, 2002). در تحقیق حاضر مقدار  $F_o$  و  $F_m$  با افزایش غلظت نانونقره، افزایش داشته است. هر عاملی که باعث اختلال در کارایی زنجیره انتقال الکترون گردد، می‌تواند فلورسانس کلروفیل را تشدید نماید (اسدی نسب، ۱۳۹۰)، بنابراین مشخص می‌شود که نانونقره تا حدی در کارایی زنجیره‌ی انتقال الکترون اختلال ایجاد کرده است. همچنین تیمار با نانو نقره نسبت  $F_v/F_m$  را به طور غیر معنی‌داری کاهش داده است. Jowkar و همکاران (۲۰۱۳) تغییرات فلورسانس کلروفیل را در گل‌های رز بررسی کردند و نشان دادند که در گل‌های رز با افزایش غلظت نانونقره کاهش نسبت  $F_v/F_m$  مشاهده شد.

اتیلن در افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز موثر است (Nejatzadeh *et al.*, 2014). در نتیجه با افزایش غلظت نانونقره و به عنوان بازدارنده اتیلن، انتظار می‌رود مقدار کلروفیل افزایش یابد (Reid *et al.*, 1980) که چنین حالتی نیز در این تحقیق مشاهده گردید. از سوی دیگر کاهش در مقدار کلروفیل ممکن است به دلیل اثرگذاری فلز سنگین نقره بر فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی کلروفیل و جایگزین شدن آن به جای Mg در ساختار کلروفیل رخ دهد (Rastgoo *et al.*, 2011). افزایش محتوای کاروتنوئید می‌تواند در حفاظت از سلول در برابر تنش فلزات سنگین (در اینجا نقره) نقش داشته باشد. کاروتنوئیدها به عنوان رنگیزه آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی می‌تواند کلروفیل را در برابر ROS تحت تنش محافظت کند (Rastgoo *et al.*, 2011). نتایج به‌دست آمده نشان داد غلظت ۷ ppm توانست با افزایش میزان کاروتنوئیدها تا حدودی کلروفیل  $a$  را که در مراکز واکنش فتوسیستم‌ها است حفظ کند تا بتواند به فتوسنتز خود ادامه دهد. Jowkar و همکاران (۲۰۱۳) افزایش معنی‌دار کلروفیل را در تمام نمونه‌های تحت تیمار نانونقره مشاهده کردند. اثرات منفی نانو ذرات نقره بر میزان کلروفیل پیشتر گزارش شده است (جدول ۴). اما در مواردی نیز اثر القایی نانوذره‌ی نقره بر تولید کلروفیل اعلام شده است؛ در پژوهشی که توسط Homaee و Ehsanpour

در سال ۲۰۱۵ انجام شده است نشان داده است که میزان کلروفیل به طور معنی داری در غلظت‌های پایین نانو ذرات نقره افزایش و در سطوح بالاتر این تیمار کاهش داشته است. بنابراین در گیاهان مختلف بسته به غلظت تیمار پاسخ‌های متفاوتی مشاهده شده است.

نانو ذرات نقره در فضای بین سلولی گیاه تجمع پیدا می‌کنند. به نظر می‌رسد نقره از میان پلاسمالما از طریق بخش شناسایی کننده کاتیون جذب می‌شود. (Koontz et al., 1980). پتاسیم، از عناصر معدنی پرمصرف است که در داخل گیاه به صورت  $K^+$  حضور دارد و در تنظیم اسمزی سلول‌های گیاهی نقش مهمی بازی می‌کند. پتاسیم در فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌های تنفسی و فتوسنتزی نقش دارد. فسفر در ذخیره انرژی و یکپارچگی ساختمانی اهمیت دارد و به صورت فسفات جزء لازمی از ترکیبات مهم سلول‌های گیاهی از جمله حدواسط‌های قند-فسفات تنفس و فتوسنتز می‌باشد و فسفولیپیدهای غشایی را به وجود می‌آورد. همچنین فسفر جزئی از نوکلئوتیدهای مصرف شده در متابولیسم انرژی (مثل ATP) و سنتز DNA و RNA می‌باشد (کریمی مریدانی، ۱۳۹۲).

Bhatti و همکاران (۲۰۱۳) محتوای سدیم و پتاسیم را در ریشه و ساقه‌ی گندم تحت تنش فلزات سنگین (Pb) سنجیدند؛ در هر دو اندام، محتوای سدیم و پتاسیم کاهش نشان داد زیرا فلزات سنگین تغییرات بیوشیمیایی و ساختاری در گیاه ایجاد می‌کنند. Karimi و همکاران (۲۰۱۳) مقدار عناصر فسفر و پتاسیم و سدیم را تحت تنش فلزات سنگین در ساقه‌ی لوبیا بررسی کردند. آنها با افزایش غلظت کادمیوم و نیکل، کاهش فسفر را مشاهده کردند؛ همچنین مقدار پتاسیم در برابر فلز نیکل، افزایش و با افزایش غلظت سرب، کاهش نشان داد. غلظت سدیم در تنش کادمیوم، سرب و نیکل نسبت به شاهد افزایش نشان داد. آنها همچنین ریشه‌ی لوبیا را بررسی کردند فسفر در تیمار با نیکل در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد زیرا فلزات سنگین با اثر سمیت خود در جذب مواد مغذی و رشد گیاه موثرند.

## نتیجه‌گیری

تیمار نانوذره‌ی نقره در غلظت‌های ۵ و ۷ پی‌پی‌ام می‌تواند در افزایش میزان جوانه زنی بذرهای گیاه گلرنگ به کار گرفته شود. غلظت ۵ پی‌پی‌ام نانونقره اثر تحریکی بر رشد گیاه گلرنگ دارد ولی اثرات سمی غلظت ۷ پی‌پی‌ام بر رشد گیاه مشهود است. بطور کلی به نظر می‌رسد اثرات منفی نانوذره‌ی نقره بر رشد گیاه گلرنگ از طریق ایجاد تنش اکسایشی، اختلال در جذب مواد مغذی و تا حدی اثر بر فتوسنتز ایجاد می‌شود. گیاه گلرنگ نیز با افزایش تعداد لایه‌های اپیدرمی در ریشه به منظور ممانعت در جذب این فلز سنگین، القای تولید پرولین و کارتنوئید برای مقابله با تنش اکسایشی ایجاد شده و نیز تغییر در مقدار سایر پروتئین‌ها به حضور نانونقره واکنش نشان می‌دهد.

## منابع

- اسدی نسب، نفیسه، حسیبی، پیمان، روشنفکر، حبیب الله، مسکرباشی، موسی (۱۳۹۳). « اثر تنش شوری بر رشد، فتوسنتز، تبادلات گازی و فلئورسانس کلروفیل در ارقام چغندر (*Beta vulgaris*) در مرحله گیاهچه ای تحت شرایط کنترل شده». نشریه پژوهش های زراعی ایران. شماره ۴، جلد ۱۲، ص ۶۲۱-۶۳۱.
- رضوی زاده، رویا (۱۳۹۸). « اثر نانو ذرات نقره بر ظرفیت آنتی اکسیدان و الگوی پروتئین محلول کل در گیاهچه‌های گوجه در شرایط این ویترو». مجله زیست شناسی کاربردی. شماره ۳، دوره ۳۳، ص ۲۲-۳۸.
- کریمی مریدانی، محمد (۱۳۹۲). « نقش فسفر در حاصلخیزی خاک شالیزار ». فصلنامه نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی، سال یازدهم، شماره چهل.
- مروتی، عفت. سحری، محمدعلی. برزگر، محسن (۱۳۸۹). « خواص فیزیکیوشیمیایی بذر و روغن گلرنگ ارقام/ لاین های ایرانی به عنوان منبع غنی از امگا ۶». فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم، دوره چهارم، شماره مسلسل سی و ششم
- محمدی سنجانی، عارفه، حسین زاده نمین، منیر (۱۳۹۳). « تاثیر نانو نقره کلوئیدی بر خواص آناتومی گلرنگ». کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران.
- Abd-Alla, M.H., Nafady, N.A., Khalaf, D.M. (2016). "Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean-Rhizobium leguminosarum bv. viciae-Glomus aggregatum symbiosis: implications for induction of autophagy process in root nodule ". Agriculture, Ecosystems & Environment, 218:163-177.
- Al-Huqail, A.A., Hatata, M.M., Al-Huqail, A.A., Ibrahim, M.M. (2018). "Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings". Saudi Journal of Biological Sciences", 25:313-319.
- Al-Saadi, S., Al-Asaadi, W., Al-Waheeb, A. (2013). "The effect of some heavy metals accumulation on physiological and anatomical characteristic of some *Potamogeton* L plant". Journal of Ecology and Environmental Sciences", 4:100-108.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I. (1973). "Rapid determination of free proline for water-stress studies". Plant and soil, 39:205-207.
- Bhatti, K. et al. (2013). "Effect of heavy metal Lead (Pb) stress of different concentration on wheat (*Triticum aestivum* L.) ". Middle East Journal of Scientific Research, 14:148-154.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Analytical Biochemistry, 72:248-254.
- Chen, T.H., Murata, N. (2002). "Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes". Current Opinion in Plant Biology, 5:250-257.
- Cui, Z. et al. (2014). Susceptibility of opportunistic *Burkholderia glumae* to copper surfaces following wet or dry surface contact. Molecules, 19:9975-9985.
- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N. (2013). "Triffault-Bouchet G Interaction between silver nanoparticles and plant growth". In: International Symposium on New Technologies for Environment Control, Energy-Saving and Crop Production in Greenhouse and Plant, 1037, pp 795-800.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968). "Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation". Archives of Biochemistry and Biophysics, 125:189-198.

- Homaei, M.B., Ehsanpour, A.A. (2015). "Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under in vitro conditions". *Indian Journal of Plant Physiology*, 20:353-359.
- Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., Radhakrishnan, E. (2017). "Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) ". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25:443-447.
- Jo, Y-K, Cromwell, W., Jeong, H-K., Thorkelson, J., Roh, J-H., Shin, D-B. (2015). "Use of silver nanoparticles for managing *Gibberella fujikuroi* on rice seedlings". *Crop Protection*, 74:65-69.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. (2009). "Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L". *Archives of Agronomy and Soil Science*. 55:395-405.
- Jowkar, M.M., Khalighi, A., Kafi, M., Hassanzadeh, N. (2013). "Nano silver application impact as vase solution biocide on postharvest microbial and physiological properties of 'Cherry Brandy' rose". *Journal Food Agricultur and Environment*, 11:1045-1050.
- Karimi, R., Solhi, S., Salehi, M., Solhi, M., Mollahosaini, H. (2013). "Effects of Cd, Pb and Ni on growth and macronutrient contents of *Vicia faba* L. and *Brassica arvensis* L". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4:739-744.
- Kaveh, R., Li, Y-S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L., Van Aken, B. (2013). "Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions". *Environmental Science & Technology*, 47:10637-10644
- Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R., Schuster, E.W. (2012). "Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection": a review *Crop protection*, 35:64-70.
- Koontz, H.V., Berle, K.L. (1980). "Silver uptake, distribution, and effect on calcium, phosphorus, and sulfur uptake". *Plant Physiology*, 65:336-339.
- Krishnaraj, C., Jagan, E., Ramachandran, R., Abirami, S., Mohan, N., Kalaichelvan, P. (2012). "Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst". *Plant Growth Metabolism Process Biochemistry*, 47:651-658.
- Krizkova, S. et al. (2008). "Multi-instrumental analysis of tissues of sunflower plants treated with silver (I) ions—plants as bioindicators of environmental pollution". *Sensors*, 8:445-463
- Lee, J.H., Mun, J., Park, J.D., Yu, I.J. (2012). "A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials". *Nanotoxicology*, 6:667-669.
- Lichthenthale, H. (1987). "Chlorophylls end carotenoids: Pigments of photosynthetic bio membranes Methods in Enzimilogy". Academic Press, San Diego, 148:350-382.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000). "Chlorophyll fluorescence—a practical guide". *Journal of Experimental Botany*, 51:659-668.
- Melo, H., Castro, E., Soares, A., Melo, L., Alves, J. (2007). "Anatomical and physiological alterations in *Setaria anceps* Stapf ex Massey and *Paspalum paniculatum* L. under water deficit conditions". *Hoehnea*, 34:145-153
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Kumar, R., Seth, C., Gupta, D. (2006). "Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation". *Chemosphere*, 65:1027-1039.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia plantarum*, 15:473-497.
- Nair, P.M.G., Chung, I.M. (2014a). "Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*". *Environmental Science and Pollution Research*, 21:8858-8869.
- Nair, P.M.G., Chung, I.M. (2014b). "Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings". *Chemosphere*, 112:105-113.
- Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D.S. (2010). "Nanoparticulate material delivery to plants". *Plant Science*, 179:154-163.
- Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F., Aminkhani, A. (2014). "Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.) Organic and medicinal ". *Chemistry Letters*, 4:11.
- Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L., Dewez, D. (2013). "Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*". *Environmental toxicology and chemistry*, 32:902-907.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Luis, A. (2002). "Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes". *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:521-530.
- Parveen, A., Rao, S. (2015). "Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*". *Journal of Cluster Science*, 26:693-701.
- Patlolla, A.K., Berry, A., May, L., Tchounwou, P.B. (2012). "Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9:1649-1662.
- Pulit, J., Banach, M., Kowalski, Z. (2011). "Nanosilver-making difficult decisions". *Ecological Chemistry Engineering*, 1:185-196.
- Rastgoo, L., Alemzadeh, A. (2011). "Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress". *Australian Journal of Crop Science*, 5:375.
- Reid, M.S., Paul, J., Farhoomand, M., Kofranek, A., Staby, G. (1980). "Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations". *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 105:25-27.
- Rico, C., Peralta-Videa, J., Gardea-Torresdey, J. (2015). "Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants". In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. Springer, pp 1-17
- Salama, H.M. (2012). "Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) ". *International Research Journal of Biotechnology*, 3:190-197.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M., Saradhi, P.P., Khanna, P., Arora, S. (2012). "Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167:2225-2233.
- Talat, K., Anwar, S. (2009). "Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) ". *Biotechnology Advances*, 9:28-31.
- Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S., Lawlor, D. (2002). "Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower". *Journal of Experimental Botany*, 53:1781-1791.

- Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S., Chadchawan, S. (2014). "Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104:302-309.
- Tripathi, D.K. et al. (2017). "Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric". *Frontiers in microbiology*, 8:7
- Verma, S., Dubey, R. (2003). "Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants". *Plant Science*, 164:645-655.
- Vishwakarma, K. et al. (2017). "Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on Brassica sp". *Frontiers in Plant Science*, 8:1501.
- Wang, J. et al. (2013). "Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations". *Environmental science & technology*, 47:5442-5449.
- Zou, X., Li, P., Huang, Q., Zhang, H. (2016). "The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: light-induced silver nanoparticle toxicity". *Aquatic Toxicology*, 176:97-105.

## The effect of silver nanoparticles treatment on some physiological and biochemical responses of safflower

A. Mohammadi Sanjani<sup>1</sup>, M. Hosseinzadeh Namin<sup>2\*</sup>, M. Sorahinobar<sup>3</sup>

Received:2020.4.18

Accepted:2020.9.6

### Abstract

Silver nanoparticles are widely used in industry, medicine, biotechnology and agriculture. As a consequence, these nanoparticles are reaching the environment as waste products, which might have a negative impact on the environment, especially on plants. In this study, the effects of two concentrations (5 and 7 ppm) of silver nanoparticles on safflower (*Carthamus tinctorius*) were investigated in vitro. Increased germination rate of plants from 70% (in non treated control) up to 90% (in 7 ppm nanosilver treated seeds) was observed. 5% higher dry weight biomass in 5 ppm nanosilver treated plants and 12% lower biomass in 7% treated ones compared to their non-treated controls confirmed that the toxicity threshold level is between these two concentrations. Increased thickness of epidermis layer and root hairs length as well as deletion of scleranchima cells in roots under silver nanoparticle treatment was observed in anatomical study of safflower. The results also showed a remarkable decrease in proline content in root while induction of MDA and proline contents were observed in shoot under nanosilver treatment which can be an indicator for induction of oxidative stress in shoot. Moreover, nanosilver causes induction of chlorophyll a, total chlorophyll and carotenoid content in safflower.

**Keywords:** Carotenoid, Chlorophyll, Oxidative stress, Proline, Safflower, Silver nanoparticles

---

1-Master Student of Plant Physiology, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

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

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

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

## الگوی انتشار گلابی وحشی (*Pyrus spp.*) در جنگل‌های استان کرمانشاه

علی اصغر زهره وندی<sup>۱\*</sup>، خسرو ثاقب طالبی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵

### چکیده

پژوهش پیش‌رو به منظور بررسی نیاز رویشگاهی گلابی وحشی (*Pyrus spp.*) انجام شد. برای بررسی عوامل محیطی مؤثر بر پراکنش گلابی وحشی در جنگل‌های زاگرس با توجه به سه دامنه‌ی مختلف ارتفاعی، جهات جغرافیایی، فرم‌های زمین، تراکم گونه‌ی مورد مطالعه (حضور درخت مورد نظر به صورت گروهی در یک پلات) و پراکنش ناهمگن و پراکنده آن در مناطقی از سطح استان کرمانشاه، برداشت‌های عرصه‌ای به صورت انتخابی در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که فرم دامنه با جهت غربی، شرایط رویشی مناسب‌تری را برای گونه گلابی وحشی فراهم می‌آورد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) مربوط به خاک این رویشگاه‌ها، تاثیر مثبت عناصر شیمیایی EC، C و pH و تاثیر منفی CaCO<sub>3</sub> را در حضور گونه گلابی وحشی نشان داد، ضمن آنکه عناصر فیزیکی سیلت و رس در لایه سطحی خاک در حضور این گونه تاثیر مثبت داشتند. نتیجه آنکه دامنه‌های با جهت جغرافیایی غربی که دارای خاک‌های حاصلخیز و فاقد آهک هستند بهترین شرایط رویشگاهی را برای رویش و گسترش گلابی وحشی فراهم می‌آورند.

**واژه‌های کلیدی:** آنالیز مولفه‌های اصلی، جنگل‌های زاگرس، گلابی وحشی، نیاز رویشگاهی.

### مقدمه

جنس گلابی (*Pyrus L.*) دارای محصولات مهم میوه از خانواده‌ی گل‌سرخیان بعد از سیب است که در آسیا طی ۳۰۰۰ سال اخیر کشت شده است. در حال حاضر گلابی به صورت تجاری در بیش از ۵۰ کشور در مناطق معتدله کشت می‌شود. جنس *Pyrus* حداقل ۲۲ گونه شناخته شده‌ی اولیه دارد که همه‌ی آن‌ها بومی آسیا، اروپا و نواحی کوهستانی شمال آمریکا هستند (Bell et al., 1996). گلابی یک گیاه دگرگشن است که همین مسئله منجر به بوجود آمدن سطح بالایی از هتروزیگوتی و تنوع آلی در این جنس شده است.

۱- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران

\* (نویسنده مسئول: Ali.zohrevandi1@gmail.com)

۲- دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

در گونه‌ی اروپایی (*P. communis* L.) بیش از ۵۰۰۰ رقم وجود دارد (Monte-Corvo et al., 2001) که فقط درصد بسیار کمی از آنها به صورت تجاری کشت می‌شوند (Bell et al., 1996). براساس نتایج برخی پژوهشگران ۸۷/۷ درصد گلابی موجود در قرن ۱۹ در آمریکا از بین رفته‌اند (Fowler & Mooney, 1990). این روند فرسایش منابع ژنتیکی در گلابی در مناطق دیگر جهان نیز اتفاق افتاده است. در واقع تولید گلابی دنیای امروزی به تعداد محدودی از ارقام مانند ویلیامز، آنجو، بوره بوسک، کومیس و کنفرنس وابسته است که همگی در قرنهای ۱۸ و ۱۹ انتخاب شده‌اند. گزینه‌های موجود برای انتخاب ارقام جدید گلابی مطابق با نیازهای امروز بازار دنیا بسیار کم است. به همین دلیل نیاز مبرمی به مدیریت ژرم پلاس و شناسایی ارقام حفاظت شده‌ی گلابی برای دستیابی به سطح کافی سرمایه‌ی ژنتیکی در برنامه‌ی اصلاحی وجود دارد. نتایج برخی بررسی‌ها نشان می‌دهد تنوع بالایی در این محصول وجود دارد که هنوز بهره‌برداری نشده است (Wunsch & Hormaza, 2007). گزارش‌های مختلفی نشان می‌دهد که عملکرد باغ‌های گلابی ممکن است تا ۹۰ تن در هکتار برسد، اما آمار نشان می‌دهد که عملکرد این محصول در بسیاری از کشورها و مخصوصاً کشور ایران بسیار کمتر از حد ممکن است. پژوهشگران یکی از علل پایین بودن عملکرد باغ‌های گلابی را ویژگی‌های ژنتیکی ارقام بیان کرده‌اند. بنابراین، انتخاب و شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب که بهره‌ی ژنتیکی غنی داشته باشند باید صورت گیرد. حفاظت از منابع ژرم پلاس گیاهان در سال‌های اخیر همواره از دیدگاه اجتماعی، علمی و سیاسی مورد توجه بوده است (Tribe, 1994).

در ایران ۱۵ تاکسون شامل ۱۲ گونه و ۳ واریته (*P. boissieriana*- *P. kandevanica*- *P. communis*- *P. grossheimii*- *P. hyrcana*- *P. turcomanica*- *P. farsistanica*- *P. syriaca*- *P. syriaca* var. *oxyprion*- *P. syriaca* var. *syriaca*- *P. syriaca* var. *microphylla*- *P. mazanderanica*- *P. glabra*- *P. salicifolia*- *P. elaeagnifolia*) از این جنس در اقلیم مختلف رویش یافته‌اند که از این بابت به عنوان منابع ژنتیکی با ارزش در سطح جهان مطرح هستند (خاتم‌ساز، ۱۳۷۱).

جنگل‌های غرب ایران، در طول سلسله جبال زاگرس با طول متوسط ۱۱۵۰ کیلومتر و عرض متوسط ۷۵ کیلومتر، از شمال غرب ایران (جنوب پیرانشهر واقع در آذربایجان غربی) با طول جغرافیایی ۴۵ درجه و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه شروع، و در جنوب و جنوب شرقی (در حوالی میان جنگل در جنوب شیراز) با طول ۵۲ درجه و ۳۰ دقیقه و عرض جغرافیایی ۲۹ درجه پایان می‌یابد (فتاحی، ۱۳۷۶). جنگل‌های زاگرس تحت عنوان جنگل‌های نیمه خشک طبقه بندی شده و با ۵ میلیون هکتار وسعت، ۴۰ درصد کل جنگل‌های ایران را به خود اختصاص داده است (طالبی و همکاران، ۱۳۸۵). توده‌های جنگلی نواحی رویشی غرب ایران (جنگل‌های زاگرس) به لحاظ شدت تخریب دچار تغییر در ساختار اولیه و پیچیدگی در شناخت جوامع جنگلی شده است (خانلری، ۱۳۸۵). این وضعیت سبب فقیر شدن خاک جنگل و کاهش تنوع گونه‌های چوبی در این جنگل‌ها شده است. با افزایش جمعیت انسانی و تقاضا برای منابع و زیستگاه، فشار مخرب انسان در طبیعت در حال افزایش خواهد بود و این شروع نابودی تنوع زیستی است (Lund et al., 2004). این جنگل‌ها به لحاظ وسعت، ارزش‌های محیط زیستی، توسعه منابع آبی و

حفاظت خاک از اهمیت خاصی برخوردارند. از این رو اهمیت حفظ، نگهداری و احیای این جنگل‌های با ارزش بیش از قبل نمایان می‌شود، برای احیای این جنگل‌ها و غنی سازی آن‌ها، شناسایی نحوه پراکنش درختان جنگلی، نحوه آمیختگی، فراوانی، غلبه و حضور آن‌ها، همراه با مشخصات و شرایط رویشگاهی از مهم‌ترین اصول برنامه‌ریزی مدیریت جنگل محسوب می‌گردد (پارما و شتایی جویباری، ۱۳۸۹).

دامنه‌ی پراکنش گونه‌های درختی متفاوت است و درختان باتوجه به نیاز رویشگاهی خاص خود در مناطق رویشی (Phytogeographical region) مختلف انتشار دارند. در منطقه‌ی اکولوژیک زاگرس گونه‌های متفاوتی انتشار دارند که در فرم‌های مختلف زمین، جهت‌های جغرافیایی مختلف، ارتفاعات متفاوت از سطح دریا و بر روی خاک‌های مختلف با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوت حضور دارند.

در رویشگاه‌های مختلف کشورمان گونه گلابی وحشی با توجه به شرایط اقلیمی حاکم بر مناطق تحت پوشش، سطوح کم و بیش وسیعی را در قالب تیپ بلوط - گلابی (*Quercus brantii - Pyrus spp.*)، تیپ گلابی (*Pyrus spp.*) و تیپ در هم آمیخته گلابی - بلوط - پلاخور (*Pyrus sp - Q. brantii - Lonicera nummularifolia*) به خود اختصاص داده‌اند. در این تیپ‌ها گونه‌هایی مانند زالزالک (*Cerataegus spp.*)، آلبالو وحشی (*Cerasus mahaleb*)، کیکم (*Acer monspessulanum*) و بنه (*Pistacia atlantica*) کم و بیش حضور دارند. گستره‌ی انتشار گلابی وحشی عمدتاً در نواحی شمال غربی ایران شامل آذربایجان - غربی و اطراف ارومیه، آذربایجان شرقی، جنگل‌های ارسباران و جنگل‌های گیلان و مازندران و گلستان از جلگه تا ارتفاع ۲۴۰۰ متر از سطح دریا و همچنین در نواحی غربی در مناطق بانه و سردشت در کردستان و استان‌های کرمانشاه، لرستان، چهارمحال بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد تا استان فارس قرار دارد و صرف‌نظر از ارزش‌های ژنتیکی به‌عنوان مکمل معیشت حاشیه‌نشینان جنگل در این مناطق از جنبه‌ی اقتصادی نیز مطرح هستند (حمزه‌پور و همکاران، ۱۳۸۹).

زهره‌وندی (۱۳۹۷) عوامل توپوگرافی مؤثر برای انتشار گلابی وحشی در استان کرمانشاه را مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که گونه‌ی گلابی وحشی در فرم دامنه با جهت غربی و دامنه ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا بیشترین تاج‌پوشش را دارد و از شرایط رویشی مناسب‌تری برخوردار است. در بررسی برخی از خصوصیات کمی و کیفی تیپ گلابی وحشی و شن (*Lonicera nummulariifolia* Jaub & Spach) در منطقه‌ی سپیدان گزارش شده است که تیپ غالب منطقه را گونه گلابی وحشی تشکیل می‌دهد که عمدتاً در حد ارتفاعی ۲۲۵۰ تا ۲۴۰۰ متر از سطح دریا و در جهات رو به شمال (شمال غرب و شمال شرق) و در شیب‌های بین ۵ تا ۴۰ درصد گسترش یافته‌اند (حمزه‌پور و همکاران، ۱۳۸۹).

هدف این پژوهش تعیین الگوی انتشار گونه گلابی وحشی بود. ایران با بیش از ۱۵ تاکسون از جنس گلابی و نزدیکی به مراکز تنوع گلابی به عنوان یکی از منابع مهم ژنتیکی این محصول در دنیا شناخته شده است. به‌رغم این موقعیت ممتاز جغرافیایی

برای گلابی در کشور، مطالعه‌ی این ذخایر مهم ژنتیکی می‌تواند زمینه‌ی مناسبی را برای استفاده‌ی مناسب از ژنوتیپ‌های بومی برای اهداف اصلاحی گلابی فراهم آورد. اهمیت فراوان گونه‌های درختی و درختچه‌ای از جمله گونه گلابی وحشی در حفظ آب و خاک و همچنین نداشتن اطلاعات کافی در خصوص نیاز رویشگاهی آن‌ها، ضرورت شناخت سرشت و نیازهای اکولوژیک این گونه‌ها را مشخص می‌کند تا علاوه بر افزایش دانش پایه، اطلاعات کافی را در مورد این گونه‌ها برای جنگل‌کاری با اهداف مختلف (به‌خصوص نقش مهمی که در اقتصاد و معیشت عشایر و جنگل‌نشینان دارد) در اختیار ما قرار دهد. همچنین، بهترین خصوصیات کمی و کیفی درختان گلابی وحشی را در بهترین رویشگاه معرفی کند، ضمن آنکه استفاده‌ی مناسب و بهینه از گونه‌ها در جنگل‌کاری و در رویشگاه‌های مناسب از اتلاف سرمایه و زمان نیز می‌کاهد.

## مواد و روش‌ها

### منطقه‌ی مورد مطالعه

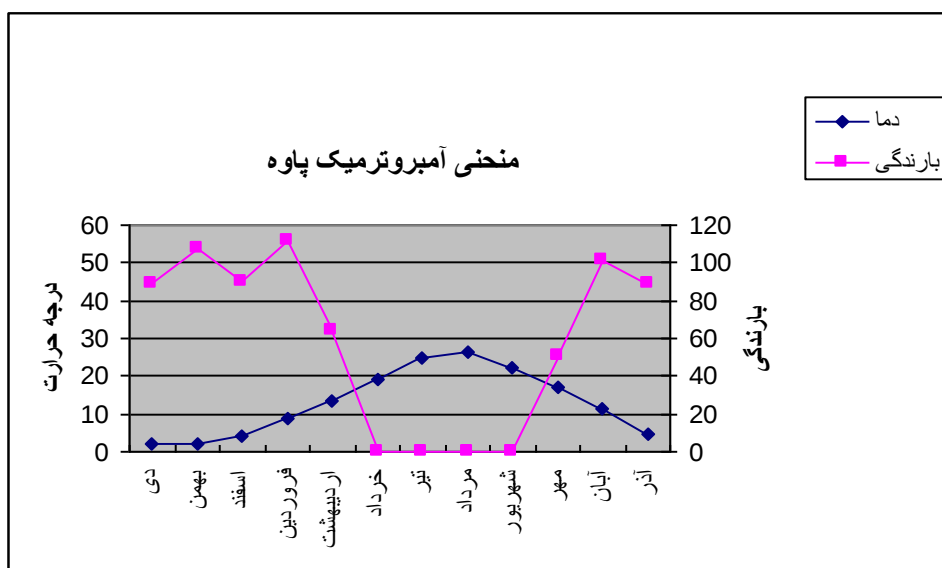
استان کرمانشاه با وسعت حدود ۲۴۶۲۲/۶۲۳ کیلومتر مربع در میانه‌ی غربی کشور و در محدوده‌ی ۳۲ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۵ درجه و ۲۴ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۳۰ دقیقه طول شرقی قرار گرفته و از شمال به استان کردستان، از جنوب به استان‌های لرستان و ایلام، از شرق به همدان و از غرب به کشور عراق محدود شده است.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه در استان کرمانشاه (سازمان جغرافیایی ارتش)

میانگین بارندگی در مناطق مختلف استان کرمانشاه از حدود ۳۰۰ میلی‌متر در بخش جنوب‌غربی در منطقه‌ی سومار و نفت شهر تا حدود ۸۰۰ میلیمتر و بیشتر در ارتفاعات متغیر می‌باشد (قیطوری، ۱۳۸۲). مطالعه‌ی اقلیم مناطق مورد مطالعه، بر اساس تیپ اقلیمی آمبرژه، نشان می‌دهد که رویشگاه‌های گلابی وحشی در تیپ اقلیمی ارتفاعات با گرایش به نیمه مرطوب سرد قرار دارند. و بر اساس منحنی‌های آمبروترمیک موجود این گونه تا پنج ماه خشکی در سال را تحمل می‌کند. بررسی شرایط اقلیمی رویشگاه‌های مورد مطالعه نشان داد که گونه گلابی وحشی علی‌رغم میانگین بارندگی سالیانه تا حدود ۷۰۰ میلیمتر (در

بعضی از نقاط رویشگاه)، در فصل رویش عمدتاً از نزولات جوی بی بهره و مقاومت مناسبی به شرایط خشکی در طول دوره‌ی رویش از خود نشان می‌دهد. این گونه همچنین حد پائین درجه حرارت (تا حدود ۲۷- درجه سانتیگراد) را تحمل می‌کند که نشان از مقاومت اکولوژیک آن به شرایط سخت اقلیمی است. در مطالعه‌ای که بر اساس نمایه‌ی خشکی دومارتون انجام شده است طول مدت خشکی در جنگل‌های زاگرس، بر حسب موقعیت جغرافیائی برای مناطق مرطوب ۴ ماه، برای مناطق نیمه مرطوب ۴ تا ۵ ماه و برای مناطق مدیترانه‌ای و نیمه خشک ۴ تا ۶ ماه اعلام شد (جزیره‌ای و ابراهیمی رستاقی، ۱۳۸۲). از نظر زمین شناسی قسمت عمده‌ی استان کرمانشاه در سمت غرب و جنوب غربی رواندگی (گسل) اصلی زاگرس قرار دارد. با توجه به واحدهای مهم ساختمانی ایران دو زون مهم ساختمانی یعنی زاگرس و سهند - سیرجان ساختار کلی زمین شناسی استان کرمانشاه را تشکیل می‌دهد. خاک‌های استان کرمانشاه به طور کلی از دو بخش سردسیری و گرمسیری تشکیل شده است که مناطق گرمسیری آن در نوار مرزی غربی و جنوب غربی به دلیل گسترش سازندهای مارنی، از نظر مواد تشکیل دهنده‌ی خاک چهره‌ی ویژه‌ای دارد، بدین ترتیب که مقدار گچ در این خاک‌ها قابل توجه است، اما در سایر نقاط استان درصد آهک خاک بیشتر است.



شکل ۲: نمودار آمبروترمیک منطقه مورد مطالعه (پاوه)

## روش تحقیق

به منظور اجرای این تحقیق، از داده‌های متنوع اعم از فلور ایران (خاتم‌ساز، ۱۳۷۱)، شناخت مناطق اکولوژیک ایران - کرمانشاه (قیطوری، ۱۳۸۲)، جنگل گردشی‌های متعدد و همچنین اطلاعات موجود در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه استفاده گردید که حاصل طرح‌ها و پروژه‌های مختلف بخش تحقیقات منابع طبیعی می‌باشد. بدین ترتیب رویشگاه‌های عمده‌ی گونه گل‌ابی وحشی در سطح استان کرمانشاه شناسایی شدند. پس از شناسایی عرصه‌ها و رویشگاه‌های گونه

مورد نظر، جنگل گردشی آغاز و بر مبنای عوامل فیزیوگرافی با توجه به سه دامنه ارتفاعی (پایین‌تر از ۱۵۰۰، بین ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ و بالاتر از ۲۰۰۰ متر از سطح دریا)، جهات جغرافیایی (شمالی، جنوبی، غربی و شرقی)، فرم‌های مختلف زمین (یال، دره، دامنه و مسطح)، حداقل سه تکرار برای هر یک از موارد فوق در نظر گرفته شد. (Howard and Mitchell 1985) در تحقیقی با عنوان ژئومورفولوژی گیاهی در نزدیکی شهر نیویورک واقع در آمریکا با هدف تعیین کاربری اراضی برای مدیریت بهینه جنگل‌ها نشان دادند که پراکنش مکانی گیاهان در ارتباط مستقیم با عوامل فیزیوگرافی است. ضمن آنکه در مجموعه پژوهش‌ها، نیاز رویشگاهی گونه‌های مختلف جنگلی مثل کیکم *Acer monspessulanum* (خداکرمی و همکاران، ۱۳۹۰)، بلوط ایرانی *Q. brantii* (زهره‌وندی و همکاران، ۱۳۹۰)، مازو *Q. infectoria* (مهدی‌فر و ثاقب طالبی، ۱۳۸۵) و آلبالو وحشی *Cerasus mahaleb* (خان‌حسینی و همکاران، ۱۳۹۵) عوامل فیزیوگرافی، مبنای روش تحقیق بوده است.

اما با توجه به شرایط طبیعی و عدم حضور گلابی وحشی در تمام این ماتریس ترکیبی، تنها ۱۳ قطعه نمونه از مناطق پناه و باینگان در شمال غربی استان، سرفیروزآباد در جنوب تا جنوب شرقی استان کرمانشاه که شرایط مورد نظر را داشتند، مورد مطالعه قرار گرفتند. مساحت هر قطعه نمونه ۱۰۰۰ متر مربع در نظر گرفته شد. در هر قطعه نمونه تمامی گونه‌های درختی و درختچه‌ای شمارش و مشخصه‌های قطر برابر سینه، ارتفاع کل، طول تنه و دو قطر عمود بر هم تاج برای گونه گلابی وحشی اندازه‌گیری و در فرم‌های مربوطه ثبت شدند. در ضمن یک پلات دایره‌ای شکل ۱۰۰ متر مربعی در مرکز هر قطعه نمونه در نظر گرفته شد تا تجدید حیات گونه مورد نظر شمارش شود. به منظور مطالعات خاک‌شناسی نیز در هر پلات یک پروفیل خاک تهیه و ضمن تشریح پروفیل، افق‌های خاک تعیین و از هر افق نمونه خاک برداشت شد و در آزمایشگاه خاک‌شناسی مورد آزمایش‌های روتین (تعیین بافت، ازت، فسفر، کربن آلی، pH و EC) قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و اطلاعات حاصل از آزمایشات خاک‌شناسی در قالب داده‌های مربوط به هر پلات توسط نرم افزار PCORD و با استفاده از تجزیه‌ی مولفه‌های اصلی (PCA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## نتایج و بحث

### بررسی مشخصه‌های کمی گلابی وحشی در شرایط مختلف رویشگاهی

نتایج تجزیه واریانس اثر جهات‌های جغرافیایی بر مشخصه‌های اندازه‌گیری شده‌ی گلابی وحشی در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود و سطح تاج با میانگین ۳۳/۶۳ متر مربع، قطر برابر سینه با میانگین ۳۷/۴ سانتی‌متر، ارتفاع تنه با میانگین ۱/۷۷ متر و ارتفاع کل با میانگین ۶/۹۶ متر بیشترین مقدار را در جهت جغرافیایی غربی و دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰-۱۵۰۰ متر از سطح دریا داشتند (جداول ۱ و ۳). بیشترین مقدار تمامی مشخصه‌های اندازه‌گیری شده در یک شرایط رویشگاهی بدین معنی است که بهترین شرایط رویشی برای گلابی وحشی در جهت غربی، فرم دامنه و در دامنه ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح

دریا فراهم است. با توجه به مطالب فوق، عوامل رویشی مورد اندازه گیری در جهت جغرافیائی غربی وضعیت بهتری داشتند که علت این وضعیت را می توان در ورود جریانات غربی و برخورد با ارتفاعات منطقه ذکر کرد. به همین دلیل، دامنه های رو به غرب دارای رطوبت بیشتر و دامنه های رو به شرق خشک و دارای نزولات جوی کمتری است. کمترین مقدار قطر برابر سینه و سطح تاج پوشش مربوط به دامنه شمالی و رنج ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا است. ضمن آنکه دامنه شرقی فاقد پراکنش گونه گلابی وحشی است (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین مشخصه های کمی گلابی وحشی در عوامل مختلف فیزیوگرافی

| فرم زمین | جهت جغرافیائی | دامنه (متر از سطح دریا) | ارتفاعی | میانگین تعداد درخت در پلات | قطر برابر سینه (سانتیمتر) | ارتفاع (متر) | تنه (متر) | ارتفاع (متر) | کل مساحت تاج (متر مربع) |
|----------|---------------|-------------------------|---------|----------------------------|---------------------------|--------------|-----------|--------------|-------------------------|
| یال      | شمالی         | پایین تر از ۱۵۰۰        | ۸       | ۱۶/۶۵                      | ۱/۲۹                      | ۴/۳۰         | ۸/۰۳      |              |                         |
| دامنه    | شمالی         | پایین تر از ۱۵۰۰        | ۳       | ۲۴/۳۳                      | ۱/۵۵                      | ۴/۶۰         | ۹/۶۲      |              |                         |
| دامنه    | شمالی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۵       | ۱۳/۶۶                      | ۱/۶۲                      | ۳/۶۳         | ۷/۰۵      |              |                         |
| دامنه    | شمالی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۸       | ۵                          | ۰/۹۶                      | ۲/۳۴         | ۴/۰۶      |              |                         |
| دامنه    | غربی          | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۵       | ۳۷/۴۰                      | ۱/۷۷                      | ۶/۹۶         | ۳۳/۶۳     |              |                         |
| دامنه    | جنوبی         | پایین تر از ۱۵۰۰        | ۴       | ۱۵/۵۰                      | ۱/۴۰                      | ۴/۷۵         | ۷/۰۴      |              |                         |
| دامنه    | جنوبی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۳       | ۱۳/۳۳                      | ۱/۴۳                      | ۴/۱۳         | ۹/۱۸      |              |                         |
| دامنه    | جنوبی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۵       | ۱۴                         | ۱/۷۱                      | ۳/۷۲         | ۶/۵۱      |              |                         |
| دره      | شمالی         | پایین تر از ۱۵۰۰        | ۶       | ۱۳/۴۲                      | ۱/۱۶                      | ۴/۱۳         | ۷/۵۹      |              |                         |
| دره      | شمالی         | پایین تر از ۱۵۰۰        | ۴       | ۱۶                         | ۱/۷۵                      | ۴/۳۰         | ۱۲/۵۶     |              |                         |
| دره      | شمالی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۵       | ۱۳/۵۰                      | ۱/۰۸                      | ۳/۵۲         | ۳/۴۵      |              |                         |
| دره      | شمالی         | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۵       | ۱۲/۶۲                      | ۰/۸۱                      | ۲/۲۲         | ۵/۳۰      |              |                         |
| دره      | غربی          | ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰            | ۴       | ۱۴/۱۲                      | ۰/۸۷۵                     | ۳/۲۰         | ۷/۶۲      |              |                         |

جدول ۲: آنالیز واریانس اثر فرم زمین بر مشخصه های رویشی گلابی وحشی

| مشخصه های رویشی | درجه آزادی | میانگین مربعات | معنی داری |
|-----------------|------------|----------------|-----------|
| قطر برابر سینه  | ۲          | ۶۹/۵۶۹         | ۰/۴۸۴ ns  |
| ارتفاع تنه      | ۲          | ۰/۶۹۱          | ۰/۰۶۱ ns  |
| ارتفاع کل       | ۲          | ۳/۷۲۴          | ۰/۱۳۴ ns  |
| مساحت تاج       | ۲          | ۱۱۹/۳۵۳        | ۰/۲۶۶ ns  |

ns - اختلاف معنی دار نیست

جدول ۳: آنالیز واریانس اثر جهت جغرافیائی بر مشخصه های رویشی گلابی وحشی

| مشخصه های رویشی | درجه آزادی | میانگین مربعات | معنی داری |
|-----------------|------------|----------------|-----------|
| قطر برابر سینه  | ۲          | ۶۸۱/۱۱۳        | ۰/۰۰۰**   |
| ارتفاع تنه      | ۲          | ۰/۴۳۶          | ۰/۱۷۷ ns  |
| ارتفاع کل       | ۲          | ۱۱/۰۷۳         | ۰/۰۰۲**   |
| مساحت تاج       | ۲          | ۸۶۷/۱۸۴        | ۰/۰۰۰**   |

\*\* - اختلاف در سطح یک درصد معنی دار. ns - اختلاف معنی دار نیست

در مورد تجدید حیات نیز تأثیر فرم زمین و جهت شیب در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود و با توجه به بررسی‌های انجام شده، شکل یال و جهت غربی وضعیت بهتری از نظر زادآوری داشتند (جدول ۴). حمزه‌پور و همکاران (۱۳۸۹) در پژوهشی مشابه در مورد این گونه در منطقه سپیدان استان فارس عنوان داشتند که از نظر تعداد پایه‌ها، دامنه‌های واقع در جهت غرب بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده بودند. آن‌ها عامل شکل زمین را نیز از عامل‌های گسترش این گونه در رویشگاه سپیدان معرفی کردند.

جدول ۴: آنالیز واریانس اثر فرم زمین و جهت جغرافیائی بر زادآوری گلابی وحشی

| منابع تغییر   | درجه آزادی | میانگین مربعات | معنی داری |
|---------------|------------|----------------|-----------|
| فرم زمین      | ۲          | ۸۲/۸۷۷         | ۰/۰۰۱**   |
| جهت جغرافیائی | ۲          | ۱۴۴/۴۷۱        | ۰/۰۰۰**   |

\*\* - اختلاف در سطح یک درصد معنی دار است

### خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

بررسی نتایج حاصل از آنالیز عناصر خاک نشان داد که بافت خاک در رویشگاه گلابی وحشی در فرم دره به طور کلی متوسط تا سنگین بود، به این معنی که به‌طور معمول در طبقات مختلف خاک رس وجود دارد. برای فرم دامنه به‌طور کلی بافت خاک در جهات مختلف از سطح به عمق از متوسط به سنگین تبدیل می‌شود. در فرم یال نیز به طور کلی بافت خاک از متوسط به سنگین متغیر است. در سایر شرایط زمین و جهت‌های جغرافیائی بافت خاک در لایه‌های مختلف دارای رس است و این به این معنی است که گونه گلابی وحشی در رویشگاه‌هایی با خاک سنگین به خوبی رشد می‌کند. اسیدیته خاک در تمامی فرم‌های زمین و لایه‌های خاک کمی بالاتر از خنثی است (۷ تا ۷/۸۸) و بیشتر تمایل به حالت قلیائی دارد و به طور کلی از سطح به عمق قلیائی‌تر می‌شود. میزان کربنات کلسیم در فرم دره به طور معمول از سطح به عمق افزایش دارد ولی در فرم دامنه میزان این ماده در لایه‌ی وسط کاهش دارد. درصد کربن آلی از سطح به عمق کاهش دارد که در این مورد نیز استثناء وجود دارد، مثلاً در دامنه ۱۵۰۰-۲۰۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا متعلق به دامنه جنوبی در لایه تحتانی (افق C) درصد کربن آلی بیشترین مقدار را دارد (جدول ۵).

جدول ۵: میانگین مشخصه‌های خاک در لایه‌های سطحی تا عمیق

| شماره پلات | موقعیت قطعه نمونه | دامنه ارتفاعی (متر از سطح دریا) | افق خاک | اسیدیته (pH) | هدایت الکتریکی (EC) | درصد کربنات کلسیم (CaCO <sub>3</sub> ) | درصد کربن آلی (O.C.%) | بافت خاک |
|------------|-------------------|---------------------------------|---------|--------------|---------------------|----------------------------------------|-----------------------|----------|
| ۱          | دامنه جنوبی       | ۱۵۰۰ - ۲۰۰۰                     | A1      | ۷/۳۰         | ۰/۹۸                | ۳۴/۵                                   | ۱/۱۷                  | رسی لومی |
|            |                   |                                 | B2      | ۷/۷۰         | ۰/۴۳                | ۲۳                                     | ۰/۳۵                  | رسی      |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۷۰         | ۰/۱۳                | ۳۲/۵                                   | ۰/۲۷                  | رسی لومی |
| ۲          | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | AO      | ۷/۵۳         | ۰/۵۱                | ۴۰/۵                                   | ۰/۸۴                  | لومی     |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۷۳         | ۰/۴۸                | ۱۰/۲                                   | ۲/۵۵                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A1      | ۷/۵۰         | ۱/۲                 | ۲۷                                     | ۳/۵                   | لومی     |
| ۳          | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | B2      | ۷/۶۰         | ۰/۷                 | ۱۹/۵                                   | ۱/۱                   | رسی لومی |
|            |                   |                                 | A1      | ۷/۵۵         | ۰/۵۷                | ۳۱/۷                                   | ۱/۴۷                  | رسی لومی |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۵۵         | ۰/۳۷                | ۳۷/۵                                   | ۱/۴۳                  | رسی      |
| ۴          | دره شمالی         | ۱۵۰۰ - ۲۰۰۰                     | A1      | ۷/۵۷         | ۰/۸۷                | ۲۲                                     | ۲/۰۵                  | شنی رسی  |
|            |                   |                                 | A2      | ۷/۴۸         | ۰/۵۳                | ۲۶                                     | ۲/۵                   | رسی      |
|            |                   |                                 | B       | ۷/۳۹         | ۲/۳۳                | ۲۵                                     | ۱/۴۶                  | شنی رسی  |
| ۵          | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | C       | ۷/۶۸         | ۰/۸                 | ۲۹                                     | ۱/۳                   | شنی رسی  |
|            |                   |                                 | A       | ۷/۵۸         | ۰/۶۳                | ۲۸                                     | ۱/۶۴                  | رسی لومی |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۶۱         | ۰/۴۶                | ۳۶/۵                                   | ۱/۰۳                  | رسی لومی |
| ۶          | دره غربی          | ۱۵۰۰ - ۲۰۰۰                     | A       | ۷/۵۲         | ۰/۵۱                | ۲۸/۵                                   | ۳/۸                   | رسی لومی |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۵۸         | ۰/۳۵                | ۴۰/۳                                   | ۱/۳                   | رسی لومی |
| ۷          | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | A       | ۷/۳۳         | ۰/۴۳                | ۵                                      | ۲/۰۴                  | رسی      |
|            |                   |                                 | AC      | ۷/۵۲         | ۰/۴۱                | ۱۱                                     | ۱/۴۵                  | رسی      |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۶۱         | ۰/۳۵                | ۱۱/۵                                   | ۱/۰۸                  | رسی      |
| ۸          | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | A1      | ۷/۲          | ۰/۸۲                | ۵                                      | ۳/۹۶                  | رسی لومی |
|            |                   |                                 | C       | ۷            | ۰/۶۵                | ۶                                      | ۳/۶                   | لومی     |
| ۹          | دره شمالی         | ۱۵۰۰ - ۲۰۰۰                     | A1      | ۷/۴۱         | ۰/۶۶                | ۳۷/۵                                   | ۲/۱۵                  | لومی     |
|            |                   |                                 | AB      | ۷/۳۳         | ۰/۳۸                | ۵۱/۷                                   | ۱/۱۲                  | رسی      |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۳۸         | ۰/۴۰                | ۵۹/۷                                   | ۰/۶۱                  | شنی رسی  |
| ۱۰         | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | M2      | ۷/۴۱         | ۰/۴                 | ۴۲/۲                                   | ۱/۴۱                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A1      | ۷/۶۰         | ۰/۴۶                | ۲۲                                     | ۱/۹۷                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A2      | ۷/۶۵         | ۰/۳۷                | ۴۰                                     | ۱/۵۲                  | رسی      |
| ۱۱         | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | C       | ۷/۱۶         | ۵/۳۵                | ۳۲/۵                                   | ۲/۳۱                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A       | ۷/۵۳         | ۰/۵۱                | ۴۰/۵                                   | ۰/۸۴                  | لومی     |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۷۳         | ۰/۴۸                | ۱۰/۲                                   | ۲/۵۵                  | رسی      |
| ۱۲         | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | A1      | ۷/۵۳         | ۰/۵۱                | ۴۰/۵                                   | ۰/۸۴                  | لومی     |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۷۳         | ۰/۴۸                | ۱۰/۲                                   | ۲/۵۵                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A1      | ۷/۵۳         | ۰/۵۱                | ۴۰/۵                                   | ۰/۸۴                  | لومی     |
| ۱۳         | پایین تر از ۱۵۰۰  | پایین تر از ۱۵۰۰                | C       | ۷/۷۳         | ۰/۴۸                | ۱۰/۲                                   | ۲/۵۵                  | رسی      |
|            |                   |                                 | A1      | ۷/۵۳         | ۰/۵۱                | ۴۰/۵                                   | ۰/۸۴                  | لومی     |
|            |                   |                                 | C       | ۷/۷۳         | ۰/۴۸                | ۱۰/۲                                   | ۲/۵۵                  | رسی      |

#### آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA)

به منظور آنالیز مؤلفه‌های اصلی، از عناصر افق‌های هر پروفیل میانگین وزنی گرفته شد، سپس داده‌های به دست آمده

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از ویژگی‌های خاک‌شناسی (میانگین وزنی عناصر در افق‌های مختلف) در پلات‌های

مورد مطالعه برای رویشگاه گلابی وحشی، آنالیز انجام شد. نتایج حاصل از آنالیز مولفه‌های اصلی نشان می‌دهد که ۴۴/۶۲۶ درصد از کل واریانس میان داده‌ها توسط مولفه‌ی اول و ۲۱/۱۷۹ درصد توسط مولفه‌ی دوم بیان می‌شود. بنابراین در مجموع ۶۵/۸۰۴ درصد واریانس‌ها توسط دو مولفه اول و دوم بیان شده است (جدول ۶).

جدول ۶: مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی دو مولفه اول

| مولفه | مقدار ویژه | درصد واریانس | درصد واریانس تجمعی |
|-------|------------|--------------|--------------------|
| ۱     | ۳/۱۲۴      | ۴۴/۶۲۶       | ۴۴/۶۲۶             |
| ۲     | ۱/۴۸۳      | ۲۱/۱۷۹       | ۶۵/۸۰۴             |

بردارهای ویژه برای ویژگی‌های خاک و پلات‌های مورد مطالعه در دو مولفه‌ی اول و دوم مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۷ و ۸). عناصر شیمیایی خاک نسبت به مولفه‌ی اول همبستگی بیشتری دارند. به این صورت که عناصر EC، C و pH به ترتیب با مقادیر ۴/۱۸۳، ۳/۹۵۹ و ۲/۶۷۳ دارای همبستگی مثبت با محور اول هستند (بیانگر خصوصیات شیمیایی خاک که با محور اول به‌خوبی قابل تفسیر هستند). رس (Clay)، سیلت و آهک (Caco3) با سمت منفی محور اول و شن (Sand) با سمت مثبت محور دوم همبستگی دارند. محور دوم تا حدودی بیانگر خصوصیات فیزیکی خاک است (جدول ۷).

جدول ۷: بردارهای ویژه دو مولفه‌ی اول برای ویژگی‌های خاک

| صفات  | مولفه‌ی اول | مولفه‌ی دوم |
|-------|-------------|-------------|
| PH    | ۲/۶۷۳       | -۰/۱۶۸      |
| EC    | ۴/۱۸۳       | -۰/۳۳۲      |
| Caco3 | -۲/۰۴۳      | -۰/۷۷۱      |
| C     | ۳/۹۵۹       | -۰/۲۴۰      |
| Clay  | -۴/۵۳۸      | -۱/۱۴۴      |
| Sand  | -۱/۵۶۰      | ۲/۸۰۷       |
| Silt  | -۲/۶۷۳      | -۰/۱۵۰      |

جدول ۸: بردارهای ویژه دو مولفه‌ی اول برای پلات‌های مورد مطالعه

| شماره پلات | مولفه اول | مولفه دوم |
|------------|-----------|-----------|
| ۱          | ۱/۰۱۲۲    | -۱/۴۲۰۶   |
| ۲          | ۰/۱۳۴۶    | -۰/۴۷۲۹   |
| ۳          | -۱/۰۱۹۹   | -۰/۵۱۶۰   |
| ۴          | ۰/۱۰۳۴    | -۱/۰۱۳۸   |
| ۵          | ۱/۳۰۷۳    | ۱/۶۹۰۲    |
| ۶          | ۰/۳۲۹۳    | -۱/۱۰۴۸   |
| ۷          | ۰/۳۹۰۹    | -۰/۴۶۲۱   |
| ۸          | ۰/۵۳۶۹    | ۰/۵۳۸۹    |
| ۹          | -۵/۷۸۸۳   | ۰/۶۱۹۶    |
| ۱۰         | ۰/۹۳۳۵    | -۰/۳۷۱۴   |
| ۱۱         | ۰/۸۹۰۹    | -۰/۲۳۲۳   |
| ۱۲         | ۱/۰۳۴۶    | ۳/۲۱۸۱    |
| ۱۳         | ۰/۱۳۴۶    | -۰/۴۷۲۹   |

چنان که در شکل ۲ مشاهده می شود پلات های شماره ۱۰ (دره شمالی) و ۱۱ (دامنه شمالی) با سمت مثبت محور اول همبستگی دارند، پلات های ۹ (دره شمالی) و ۳ (دامنه جنوبی) به ترتیب با سمت منفی محور اول، پلات های ۱۲ (دامنه جنوبی) و ۵ (دامنه شمالی) با سمت مثبت محور دوم و پلات های ۶ (دره غربی)، ۴ (دره شمالی)، ۲ (پال شمالی) و ۱۳ (دامنه غربی) با سمت منفی محور دوم همبستگی دارند.



شکل ۳: جایگاه پلاتها در محورهای اول و دوم

تجزیه و تحلیل اطلاعات خاک و تلفیق آنها با شرایط رویشی گلابی وحشی در فرم های زمین و جهات جغرافیائی مختلف نیز قابل توجه است. با توجه به همبستگی عناصر خاک و قطعات نمونه مورد بررسی با محورهای اول و دوم بای پلات حاصل از آنالیز مولفه های اصلی، عناصر شیمیایی EC، C و pH، پارامترهای رویشی گلابی وحشی را در دره ی شمالی تحت تاثیر قرار می دهند و عناصر فیزیکی سیلت و رس به ترتیب پارامترهای رویشی گلابی وحشی را در فرم های پال شمالی، دامنه ی غربی و دره شمالی متأثر می کنند. نتیجه کلی مطالعه ی خاک رویشگاه گلابی وحشی، تاثیر مثبت عناصر شیمیایی EC، C و pH و تاثیر منفی  $\text{CaCO}_3$  را در پارامترهای رویشی گلابی وحشی نشان می دهد. همچنین عناصر فیزیکی سیلت و رس در لایه سطحی خاک، بر پارامترهای رویشی گلابی وحشی تاثیر مثبت دارند، بدین معنی که پارامترهای رویشی گلابی وحشی در خاک های حاصلخیز وضعیت مناسبتری دارند. این نتیجه با تحقیق حمزه پور و همکاران (۱۳۸۹) که عنوان داشتند شکل زمین و حاصلخیزی خاک از عوامل موثر در تعیین گسترش گاه گونه گلابی وحشی است تطابق دارد.

## نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج فوق بهترین شرایط رویشی برای گونه گلابی وحشی در فرم دامنه، جهت‌های غربی و شمالی و دامنه ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا با خاک‌های حاصلخیز و کم‌آهک فراهم است. در این شرایط رویشی ۲ تیپ رویشی در هم آمیخته گلابی - بلوط - پلاخور (*Pyrus spp. - Q. brantii - Lonicera nummularifolia*) و تیپ خالص گلابی وحشی (*Pyrus spp.*) به همراهی گونه‌های زالزالک (*Cerataegus spp.*)، آلبالو وحشی (*Cerasus mahaleb*)، بنه (*Pistacia atlantica*) و کیکم (*Acer monspessulanum*) حضور دارند و بیشترین تنوع و هم‌زیستی گیاهان چوبی را در شرایط رویشگاهی مذکور شاهد هستیم. در دامنه جنوبی تیپ بلوط - گلابی (*Q. brantii - Pyrus spp.*) به همراهی زالزالک (*Cerataegus spp.*) و آلبالو وحشی (*Cerasus mahaleb*) نمایان می‌شود که نسبت به دامنه‌های غربی و شمالی از تنوع گونه‌ای کمتری برخوردار است.

## منابع

- پارما، ر.، شتایی جویباری، ش. (۱۳۸۹). اثر عوامل فیزیوگرافی و انسانی بر تاج‌پوشش و تنوع گونه‌های چوبی در جنگل‌های زاگرس. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. (۴) ۱۸ : ۵۵۵ - ۵۳۹.
- جزیره‌ای، م.، ابراهیمی رستاقی، م. (۱۳۸۲). جنگل‌شناسی زاگرس. چاپ اول، دانشگاه تهران، ۵۶۰ صفحه.
- حمزه‌پور، م.، ثاقب‌طالبی، خ.، بردبار، س.، جوکار، ل.، پاک‌پرور، م.، عباسی، ع. (۱۳۸۹). عوامل محیطی موثر بر گسترش گلابی وحشی (*Pyrus glabra Boiss.*) در منطقه‌ی سپیدان استان فارس. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. (۴) ۱۸ : ۵۱۶ - ۴۹۹.
- خاتم‌ساز، م. (۱۳۷۱). فلور ایران تیره گل‌سرخ (*Rosaceae*). شماره ۶، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۳۵۲ صفحه.
- خان‌حسینی، م.، ثاقب‌طالبی، خ.، خداکرمی، ی.، صفری، ه. (۱۳۹۵). تأثیر ویژگی‌های خاک و عوامل فیزیوگرافی بر صفات رویشی آلبالو وحشی (*Cerasus microcarpa*). فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، (۲) ۲۴ : ۲۳۵ - ۲۲۷.
- خانلری، د. (۱۳۸۵). جنگل‌شناسی و جنگلداری ایران (هیرکانی، زاگرس و ارسباران). نشر علوم کشاورزی کاربردی، تهران، ۳۶۰ صفحه.
- خداکرمی، ی.، خان‌حسینی، م.، ثاقب‌طالبی، خ.، زهره‌وندی، ع.، پور رضا، م.، مشایخی، ش. (۱۳۹۰). بررسی برخی عوامل اکولوژیک موثر بر پراکنش گونه افرای کیکم (*Acer monspesulanum*) در جنگل‌های استان کرمانشاه. نشریه اکوسیستم‌های طبیعی ایران، (۴) ۱ : ۷۳ - ۶۷.
- زهره‌وندی، ع.، ثاقب‌طالبی، خ.، پور رضا، م.، خان‌حسینی، م.، خداکرمی، ی. (۱۳۹۰). بررسی نیاز رویشگاهی گونه بلوط ایرانی در جنگل‌های استان کرمانشاه. نشریه اکوسیستم‌های طبیعی ایران، (۲) ۲ : ۶۲ - ۵۳.

زهره‌وندی، ع.، ثاقب‌طالبی، خ.، خداکرمی، ی. (۱۳۹۷). عوامل توپوگرافی موثر بر انتشار گلابی وحشی (*Pyrus glabra*). نشریه طبیعت ایران، (۵) ۳: ۶۰ - ۵۶.

طالبی، س.، ثاقب‌طالبی، خ.، جهانبازی گوجانی، ح. (۱۳۸۵). بررسی نیاز رویشگاهی و برخی خصوصیات کمی و کیفی بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) در جنگل‌های استان چهارمحال بختیاری. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، (۱) ۱۴: ۷۹ - ۶۷.

فتاحی، م. (۱۳۷۶). بررسی جنگل‌های بلوط زاگرس. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۶۳ صفحه.

قیطوری، م. (۱۳۸۲). تیپ‌های مرتعی استان کرمانشاه. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۵۲ صفحه.

مهدی‌فر، د.، ثاقب‌طالبی، خ. (۱۳۸۵). مشخصات کمی و کیفی خصوصیات رویشگاهی مازو (*Quercus infectoria*) در منطقه شینه استان لرستان. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، (۳) ۱۴: ۲۰۶ - ۱۹۳.

Bell, R. L., Quamme, H. A., Layne, R. E. C. and Skirvin, R. M. (1996). Pears. In: J. Janick & J. N. Moore (Ed.), Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits, pp. 441-514. John Wiley & Sons, Inc.- Browicz, K., 1982. Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Regions. Polish Scientific Publishers, Warszawa, Volume one: 33- 39.

Fowler, C. and Mooney, P. (1990). Shattering Food, Politics, and the Loss of Genetic Diversity. The University of Arizona Press, Tucson.

Howard, J.A. and C.W. Mitchell. (1985). Phytogeomorphology, New York, John Wiley and Sons, 225 p.

Lund, H.G., Dallmeier, F and Alonso, A. (2004). Biodiversity in forest. Elsevier Ltd.: 33-51.

Monte-Corvo, L., Goulao, L. and Oliveira, C. (2001). ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126, 517-522.

Tribe, D. (1994). Feeding and Greening the World: The Role of Agricultural Research. CAB International, Wallingford, UK.

Wunsch, A. and Hormaza, J. I. (2007). Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. Scientia Horticulturae, 113, 37-43.

## Distribution pattern of Wild pear (*Pyrus* spp.) in the forests of Kermanshah province of Iran

A.A. zohrevandi<sup>1\*</sup>, Kh. Sagheb Talebi<sup>2</sup>

Received:2019.9.4

Accepted:2020.9.5

### Abstract

In this paper, the propagation pattern of wild pears (*Pyrus* spp.), in Kermanshah province, has been investigated. First, by collecting sample data from 1000 m<sup>2</sup> of plots, the distribution of the considered specie (the number in a plot) was determined in different lands of Kermanshah. Then, the distribution areas were classified into three altitudinal ranges (>1500, 1500-2000, < 2000m a.s.l.), four geographical directions (North, South, West and East) and also different land forms (Valley, Slope, Slope edge and Flat). To gather informations, some 1000m<sup>2</sup> plots were established in each mentioned situation at least with three replications. To consider the density of the studied species (the presence of the desired tree in a group in a plot). Results showed that Slope form with west aspect at a range of 1500m to 2000 m a.s.l. prepared the best position for distribution of *Pyrus* spp.. Also Principle Component Analysis(PCA) of soil in *Pyrus* spp. showed, positive effect of chemical elements such as: EC ,C,pH and negative effect of Caco3 on growth parameters of *Pyrus* spp. were indicated Mean while physic elements such as: Silt and Clay preferred positive effect on growth parameters at surface layer.

**Keywords:** Principle Component Analysis (PCA), *Pyrus* L., Site demand, Zagros forests.

---

1-Assistant Prof., Research Division of Natural Resources, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Kermanshah, Iran

\*(Corresponding author: Ali.zohrevandi1@gmail.com)

2- Associate Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

## Content

### **Inhibitory effects and mechanism of silver nanoparticles in control of *Agrobacterium rhizogenes* growth after co-cultivation and genetic transformation in tobacco**

M. Khoshhal Sarmast, H. Salehi.....25

### **Chemical composition of the essential oil and investigation of antioxidant activity an extract of *Melissa officinalis* from Behshahr**

S.A. Rezaei Jamnani, A. Mirabi.....41

### **Evaluation of allelopathic stress of *Cyperus esculentus* remains on some aggressive weeds**

A. Saeedipour, E. Gholamalipour Alamdari, A. Biabani, Z. Avarseji, A. Nakhzari Moghadam.....60

### **Leaf macro and micro- morphological study of Iranian *Anemone* L. and *Pulsatilla* Mill. (Ranunculaceae)F.**

M. Shojae, F. Sharifnia, M.Assadi, I. Mehregan.....79

### **The Study of structural and aggregation changes of human hemoglobin in the presence of Cartap**

M. Emadi, P. Maghami, Kh. Khorsandi, R. Hosseinzadeh.....95

### **Effects of plant growth regulators on some physiological and biochemical characteristics and vase life of rose cut flower (*Rosa hybrida* L. cv. *Royal Bacara*)**

M.Farazmandi, A. Mirzakhani, N.A. Sajedi, M. Nasri, M. Gomariyan.....112

### **The effect of calcium carbonate pretreatment at different temperatures on reducing the toxicity of copper sulfate in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)**

A. Qasemzadeh, M. Bahrekazemi.....130

### **Floristic, Life forms, Chorotype and Ethobotanical studies of medicinal plants in the Taft County**

A.A. Minaeifar, S. Dehghanpour Farashah, S. Sadat Mirzadeh Vaghefi .....148

### **The effect of silver nanoparticles treatment on some physiological and biochemical responses of safflower**

Mohammadi Sanjani, M. Hosseinzadeh Namin, M.Sorahinobar .....164

### **Wild pear (*Pyrus* spp.) distribution pattern in the forests of Kermanshah province**

A.A. Zohrevandi, Kh. Sagheb Talebi.....178

Journal of Applied Biology  
Winter 2020

**Alzahra University - Vice Chancellery for Research**

**Chief Editor: M.R.Soudi, Professor of Alzahra University**

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

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

**Editorial Boards**

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

**M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University**

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

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

**F. Darvishi, Professor of Alzahra University**

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

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

**A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University**

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

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

**T. Valinassabpour, Research Professor of Iranian Fisheries Science Research Institute**

**International Editorial Board:**

**H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn**

**SH. SHahabi, Professor, Research Director, Highland Pharmaceutical Company, Southwest Nechropathy Medical College**

**Executive Manager: Sh. Borjian**

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

**English & Persian Editor: Banafsheh Mohamadi**

**Printing and Binding: Graduate Publishing**

**Circulation: 10 copies**

**Publication Frequency: Quarterly**

**Price: 10000 Rls**

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

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

**Tel/Fax: 021- 85692205**

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

**ISSN: 1607- 9884**

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